

**Interaktionen der vier essentiellen Spurenelemente Selen,
Kupfer, Zink und Eisen unter Berücksichtigung des redox-
sensitiven Transkriptionsfaktors Nrf2**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades eines
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Fakultät für Biowissenschaften
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Maria Schwarz (geb. Wildgrube)

geboren am 14.11.1994 in Wolfen

Gutachter*innen

1. Prof. Dr. Anna Patricia Kipp, Jena
2. Prof. Dr. Hajo Haase, Berlin
3. Prof. Dr. Anika Wagner, Gießen

Tag der öffentlichen Verteidigung

22.09.2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Zusammenfassung.....	1
Summary.....	3
1 Einleitung	5
1.1 Spurenelemente in der Ernährung.....	5
1.1.1 Weltweite Versorgung mit Selen, Kupfer, Zink und Eisen.....	5
1.1.2 Veränderungen in der Spurenelementhomöostase.....	6
1.2 Selen und Selenoproteine	8
1.2.1 Selenaufnahme und Biomarkerbestimmung zur Selenversorgung.....	8
1.2.2 Biosynthese der Selenoproteine	9
1.2.3 Regulation der Selenoproteinexpression	12
1.2.4 Funktionen der Selenoproteine	13
1.2.4.1 Die Glutathionperoxidasen.....	14
1.2.4.2 Die Thioredoxinreduktasen	14
1.2.4.3 Selenoprotein P	15
1.3 Kupfer	17
1.4 Zink.....	21
1.5 Eisen	23
1.6 Oxidativer Stress und ein redox-sensitiver Transkriptionsfaktor.....	25
1.6.1 Nrf2 - ein redox-sensitiver Transkriptionsfaktor	25
1.6.2 Der Einfluss von Selen, Kupfer, Zink und Eisen auf den Redoxstatus.....	27
1.7 Interaktionen von Spurenelementen.....	28
2 Zielstellung und Strukturierung der Dissertation	30
3 Übersicht zu den Manuskripten	32
3.1 Manuskript 1 (veröffentlicht)	32
3.2 Manuskript 2 (veröffentlicht)	33

3.3	Manuskript 3 (veröffentlicht)	34
4	Manuskripte	35
4.1	Crosstalk of Nrf2 with the Trace Elements Selenium, Iron, Zinc, and Copper	35
4.2	Copper interferes with Selenoprotein synthesis and activity	55
4.3	N-Acetylcysteine as Modulator of the Essential Trace Elements Copper and Zinc.....	74
5	Diskussion.....	87
5.1	Der Einfluss von Nrf2 auf die Spurenelementhomöostase	87
5.2	Die Beeinflussung von Nrf2 durch Selen, Kupfer, Zink und Eisen.....	89
5.2.1	Einfluss der einzelnen Spurenelemente auf Nrf2.....	89
5.2.2	Interaktion von Kupfer und Zink im Hinblick auf Nrf2 und MTF1	95
5.2.3	Interaktion von Selen und Kupfer im Hinblick auf Nrf2	99
5.3	Veränderungen in der Spurenelementhomöostase von Kupfer, Zink und Eisen durch eine Modulation des Selenstatus	100
5.4	Interaktionen des Selen- und Kupfermetabolismus.....	101
5.5	Schlussfolgerung und Ausblick	108
	Literaturverzeichnis	A
	Anhang.....	BB
	Angaben zu Eigenanteilen.....	DD
	Danksagung	JJ
	Publikationsliste	LL
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	OO

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Globale Versorgung mit den essentiellen Spurenelementen Selen, Kupfer, Zink und Eisen.	6
Abbildung 2. Syntheseweg der Selenoproteine unter Berücksichtigung der Selenzufuhr.	10
Abbildung 3. Synthesekomplex zur Selenoproteinbiosynthese.	11
Abbildung 4. Übersicht des zellulären Thioredoxin (TRX)- und Glutathion (GSH-)systems.	15
Abbildung 5. Übersicht des Kupfermetabolismus in Entero- und Hepatozyten.	20
Abbildung 6. Zellulärer Zinkmetabolismus.	23
Abbildung 7. Der Eisenstoffwechsel in Entero- und Hepatozyten.	24
Abbildung 8. Die Regulation von Nrf2 unter basalen und aktivierten Bedingungen.	26
Abbildung 9. Spurenelement-assoziierte Nrf2-Zielgene.	27
Abbildung 10. Die Wechselwirkungen zwischen den essentiellen Spurenelementen Selen, Kupfer, Zink und Eisen und dem Transkriptionsfaktor Nrf2.	93
Abbildung 11. Die Interaktionen von Kupfer und Zink in verschiedenen Zelllinien.	98
Abbildung 12. Der Einfluss von Kupfer auf die Selenhomöostase.	106
Abbildung 13. NQO1-Aktivität in verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes.	BB
Abbildung 14. Hepatische und intestinale NQO1-Expression.	BB
Abbildung 15. Die nukleäre Expression der Transkriptionsfaktoren MTF1 und Nrf2 sowie die Expression von Metallothionein und der intrazelluläre GSH-Gehalt nach Kurzzeitinkubation mit Kupfer und Zink.	CC

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Übersicht zu Funktion und Vorkommen humaner Selenoproteine.	16
Tabelle 2. Funktionen von Kupfer-abhängigen Proteinen	17

Abkürzungsverzeichnis

In der vorgelegten Dissertation wird keine Unterscheidung der Schreibweise von Gen- bzw. Proteinnomenklatur bzw. verschiedener Spezies vorgenommen, sondern mit Großbuchstaben gearbeitet.

ALKBH8	<i>Alkylated DNA repair protein alkB homolog 8</i>
ARE	antioxidativ-responsives Element
ATOX1	<i>Antioxidant 1 copper chaperone</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATP7A/MNK	<i>ATPase Cu-transporting alpha/Menkes-Protein</i>
ATP7B/WND	<i>ATPase Cu-transporting beta/Wilson-Protein</i>
BLVRA/B	Biliverdin Reduktase A/B
CCO	Cytochrom-C-Oxidase
CCS	Cu-Chaperon für die SOD
COMMD1	<i>copper metabolism domain containing 1</i>
COX17	Cytochrom-C-Oxidase-Cu-Chaperon 17
CP	Ceruloplasmin
CTR	Cu-Transporter
Cu	Kupfer
Cul3	Cullin 3
Cys	Cystein
DCYTB	duodenales Cytochrom B
DIO	Deiodinase
DMT1	divalenter-Metalltransporter 1
EEFSec	Sec-spezifischer Elongationsfaktor
EIF4a3	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4a3
EpRE	Elektrophil-responsives Element
Fe	Eisen
FECH	Ferrochelatase
FPN1	Ferroportin 1
FTL/H	<i>Ferritin light/heavy chain</i>

G418	Geneticin
GCLC/M	Glutamat-Cystein-Ligase katalytische/modifizierende Untereinheit
GPX	Glutathionperoxidase
GSH	reduziertes Glutathion
GSK3 β	Glykogensynthase Kinase 3 β
GSR	Glutathiondisulfid-Reduktase
GSSG	oxidiertes Gutathion
GST	Glutathion-Transferase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCP1	Häm-Carrier Protein 1
HO	Hämoxygenase
ISL	<i>Initiation stem loop</i>
KD	<i>knock-down</i>
KEAP1	Kelch-ähnliches-ECH-assoziertes Protein 1
KO	<i>knock-out</i>
LEC-Ratte	<i>long-evans Cinnamon-Ratte</i>
MRE	Metall-responsives Element
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MSRB1/SELENOX/SELENOR	Methionin-Sulfoxid-Reduktase 1
MT	Metallothionein
MTF1	<i>metal regulatory transcription factor 1</i>
NAC	N-Acetylcystein
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMD	<i>nonsense-mediated decay</i>
NQO1	NADPH-Chinon-Oxidoreduktase 1
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2</i>
NSEP1	Nuclease-sensitiv Element-Bindeprotein 1
Pi	anorganisches Phosphat
PPi	Pyrophosphat
PRX	Peroxiredoxin
PSTK	O-Phosphoseryl-tRNA-Kinase
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies

SBP2	SECIS-Bindeprotein 2
Se	Selen
Sec	Selenocystein
SECIS	Sec-Insertionssequenz
SECp43/TRNAU1AP	tRNA-Selenocystein 1-assoziiertes Protein 1
SELENO	Selenoprotein
SeMet	Selenomethionin
SEPHS2	Selenophosphatsynthetase 2
SEPSECS	Sec-Synthase
Ser	Serin
SerS	Seryl-tRNA-Synthetase
sMaf	<i>small musculoaponeurotic fibrosarcoma proteins</i>
SPUR	<i>SelS Positive UGA Recoding</i>
SRE	<i>selenocysteine codon redefinition elements</i>
SOD	Superoxiddismutase
TF	Transferrin
TFR	Transferrin-Rezeptor
tRNA	<i>transfer</i> RNA
tRNA ^{[Ser]Sec}	Selenocysteyl-tRNA
TRSP	tRNA ^{[Ser]Sec} Gen
TRX	Thioredoxin
TXNRD	Thioredoxinreduktase
UTR	untranslatierte Region
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
ZIP/SLC39A	ZRT/IRT-ähnlicher Proteine
Zn	Zink
ZnT/SLC30A	Zink Transporter

Zusammenfassung

Weltweit leiden ca. zwei Milliarden Menschen an einer Mikronährstoffdefizienz, zu der die Unterversorgung mit Selen, Zink und Eisen gehören, während die weltweite Versorgung mit Kupfer als adäquat eingestuft wird. Eine optimale Versorgung mit allen essentiellen Nährstoffen und somit auch den essentiellen Spurenelementen ist wichtig, da sowohl eine Spurenelementdefizienz als auch eine -überdosierung schwerwiegende gesundheitliche Folgen haben kann. Veränderungen von Spurenelementspiegeln treten unter physiologischen (z. B. Altern), aber auch unter vielen pathophysiologischen (z. B. Infektionen, Wilson-Erkrankung, Krebserkrankungen) Konditionen auf.

Bereits bei der Aufnahme der Spurenelemente im Dünndarm sind gemeinsame Transportmechanismen für die Spurenelemente bekannt. Für Kupfer und Eisen ist zudem eine gegenläufige Regulation der intrazellulären Spurenelementhomöostase beschrieben. Zink wird zudem beispielsweise als Therapie des Morbus Wilson, eine Krankheit mit hepatischer Kupferakkumulation, eingesetzt. Weiterhin sind die essentiellen Spurenelemente Selen, Kupfer, Zink und Eisen Bestandteil vieler antioxidativer Enzyme, können jedoch in hohen Konzentrationen oxidativen Stress und folglich Zellschädigung induzieren. Alle vier Spurenelemente sind folglich an der zellulären Redoxhomöostase beteiligt, an deren Regulation unter anderem der redox-sensitive Transkriptionsfaktor Nrf2 mitwirkt. Während der Metabolismus der einzelnen Spurenelemente weitgehend gut erforscht ist, sind Studien, welche die Interaktionen der Spurenelemente untereinander betrachten, deutlich seltener. Auch der Einfluss der kombinierten Spurenelemente auf die Redoxhomöostase ist in diesem Zusammenhang noch wenig untersucht.

Um ein besseres Verständnis zu den Interaktionen der essentiellen Spurenelemente untereinander und mit der Redoxhomöostase zu erlangen, wurden verschiedene Fütterungsstudien an Mäusen durchgeführt. Weiterhin wurde der Einfluss eines systemischen Nrf2-KOs auf die Spurenelementhomöostase untersucht. In *in vitro*-Experimenten wurden einzelne Kombinationen der Spurenelemente (Selen/Kupfer und Kupfer/Zink) in drei verschiedenen Krebszelllinien (HepG2-, HT29-, THP-1-Zellen) im Hinblick auf die Spurenelement- und Redoxhomöostase analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass alle vier Spurenelemente einen Einfluss auf den redox-sensitiven Transkriptionsfaktor Nrf2 haben. Während für Selen eine Aktivierung von Nrf2 bei unzureichender Zufuhr auftritt, wirkt Zink bei adäquater Zufuhr aktivierend auf Nrf2. Für Kupfer und Eisen wurde eine Nrf2-Aktivierung erst bei höheren Konzentrationen erreicht, die

intrazellulär oxidativen Stress induzieren. Umgekehrt moduliert Nrf2 am stärksten den Eisenmetabolismus, während die Selen-, Kupfer- und Zinkhomöostase nur marginal von Nrf2 beeinflusst wird.

Auf Ebene der einzelnen Interaktionen wurden Selen und Kupfer sowie Kupfer und Zink betrachtet. Kupfer führte zu einer deutlichen Reduktion der GPX- und TXNRD-Aktivität und beeinträchtigt so die Se-Homöostase. Dieser Effekt tritt bei adäquaten bis leicht supplementierten Kupferkonzentrationen auf und scheint somit von physiologischer Relevanz zu sein. Auch der Export des wichtigsten Selentransporters SELENOP ist durch Kupfer deutlich beeinträchtigt und könnte sich negativ auf die systemische Selenversorgung auswirken.

Die gegenseitige Beeinflussung von Kupfer und Zink unterschied sich zelltypenspezifisch. Während Kupfer die Zink-Aufnahme in Entero- und Monozyten steigerte, war der hepatische Zinkgehalt unbeeinflusst. Zink verringerte die Kupferaufnahme in Hepatozyten, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Kupferaufnahme in Entero- und Monozyten. Der Effekt einer Zinkbehandlung zur Reduktion der Kupferaufnahme wird beispielsweise bei der Therapie der Wilson-Erkrankung, die hepatische Kupferakkumulationen auslöst, genutzt. Die nukleäre Translokation der beiden Transkriptionsfaktoren MTF1 und Nrf2 wurde nur durch Zink gesteigert. Eine zusätzliche Kupfergabe verminderte die nukleäre MTF1-Translokation nur in Enterozyten. Welche Wirkmechanismen für die zelltypspezifischen Unterschiede verantwortlich sind, ist unklar.

Diese ersten Ergebnisse zu den Interaktionen der Spurenelemente und deren Einfluss auf Nrf2 zeigen, dass bereits im physiologischen Konzentrationsbereich starke Auswirkungen auf die Spurenelementhomöostase auftreten. Wie sich mögliche Interaktionen bei pathophysiologischen Veränderungen der Spurenelementgehalte auswirken, soll in nachfolgenden Arbeiten untersucht werden.

Summary

Up to two billion people worldwide suffer from a micronutrient deficiency, including selenium, zinc, and iron deficiencies, while the global supply of copper is classified as adequate. The optimal supply of essential nutrients, including essential trace elements, is important, as both a trace element deficiency and an oversupply can have serious health effects. Changes in trace elements occur under physiological (e. g., ageing) and also under many pathophysiological (e. g., infections, Wilson disease, cancer) conditions.

The trace elements partly share equal transport mechanisms when they are absorbed in the small intestine. For copper and iron, an opposite regulation of intracellular trace element levels has already been described, and zinc is used, for example, as a therapy for Wilson's disease, a disease with severe hepatic copper accumulation. Furthermore, the essential trace elements selenium, copper, zinc, and iron are part of many antioxidant enzymes, but they can enhance oxidative stress and thus, induce cell damage at high concentrations. Hence, all four trace elements are involved in cellular redox homeostasis, which among other things, is regulated by the redox-sensitive transcription factor Nrf2. While the metabolism of the individual trace elements has largely been investigated, studies that describe the interactions of the trace elements with one another are much rarer. The influence of the combined trace elements on redox homeostasis has also been addressed to a lower extent.

To better understand the interactions of the essential trace elements with each other and with redox homeostasis, various feeding studies were carried out using mice. Furthermore, the influence of a systemic Nrf2 KO on trace element homeostasis was investigated. In *in vitro* experiments, individual combinations of trace elements (selenium/copper and copper/zinc) in three different cancer cell lines (HepG2, HT29, THP-1 cells) were analyzed regarding trace element and redox homeostasis.

All four trace elements have an impact on the redox-sensitive transcription factor Nrf2. Whereas for selenium, an activation of Nrf2 occurred in the case of insufficient intake, zinc has an activating effect on Nrf2 with adequate intake. For copper and iron, Nrf2 activation was only achieved at higher concentrations, which induce intracellular oxidative stress. Vice versa, Nrf2 has the greatest influence on Iron metabolism, while zinc, copper, and selenium homeostasis is only marginally affected by Nrf2.

At the level of the individual interactions, selenium and copper, as well as copper and zinc, were considered. copper led to a significant reduction in the GPX and TXNRD activity, thus interfering with the selenium homeostasis. This effect occurred with adequate to slightly supplemented

copper concentrations and, therefore, seems to be of physiological relevance. The secretion of the most important selenium transporter SELENOP is also significantly impaired by copper and could have a negative effect on the systemic selenium status.

The mutual influence of copper and zinc differed depending on the cell type. While copper increased the zinc uptake in enterocytes and monocytes, the hepatic zinc content was unaffected. Zinc reduced copper uptake in hepatocytes but did not affect copper uptake in enterocytes and monocytes. The nuclear translocation of the two transcription factors MTF1 and Nrf2 was only increased by Zinc. An additional dose of copper reduced the nuclear MTF1 translocation in enterocytes. It is unclear which mechanisms of action are responsible for the cell type-specific differences.

This first research on the interactions of trace elements and their influence on Nrf2 showed that substantial effects on trace element homeostasis occurred already in the physiological concentration range. How possible interactions affect pathophysiological changes in the trace element content will be examined in subsequent studies.

1 Einleitung

1.1 Spurenelemente in der Ernährung

Das Ziel einer ausgewogenen Ernährung ist es, die Zufuhr von allen Makro- und Mikronährstoffen zu gewährleisten. Zu den Mikronährstoffen werden Vitamine, Mengenelemente, Spurenelemente und Ultraspurenelemente gezählt [1]. Mengen-, Spuren- und Ultraspurenelemente unterscheiden sich in der Menge des Gesamtkörperspeichers und der täglichen Zufuhrempfehlung. Spurenelemente weisen, mit Ausnahme von Eisen, einen Körperspeicher von <50 mg/kg Körpergewicht und eine Zufuhrempfehlung von <100 mg auf. Spurenelemente werden weiterhin in essentielle und möglicherweise essentielle eingeteilt [1]. Die Defizienz eines essentiellen Spurenelementes führt zu Mangelerscheinungen, welche nur durch Verabreichung des entsprechenden Elements rückgängig gemacht bzw. ausgeglichen werden können. Zu den essentiellen Spurenelementen gehören u. a. Eisen, Selen, Zink und Kupfer [1, 2].

1.1.1 Weltweite Versorgung mit Selen, Kupfer, Zink und Eisen

Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind weltweit bis zu zwei Milliarden Menschen von Mikronährstoff-Defizienzen betroffen [3]. Dabei zählen die Zink- und Eisendefizienz zu den weltweit am häufigsten auftretenden Defizienzen [4-6]. Die höchste Prävalenz für eine inadäquate Zufuhr mit Zink und Eisen wird in Afrika und Südasien (>70 %) beobachtet, während die Prävalenz in Europa deutlich geringer ist (<20 %) [5, 7, 8] (**Abbildung 1**). Von einer Zink- und Eisendefizienz sind vornehmlich einzelne Bevölkerungsgruppen wie ältere Menschen, menstruierende Frauen oder Vegetarier und Veganer betroffen. Die Selenversorgung ist sehr stark vom Selengehalt im Boden abhängig, welcher global sehr stark variiert und in einer großen Varianz der Selenzufuhr ($7 \mu\text{g/d} - 4990 \mu\text{g/d}$) resultiert [9, 10]. Regionen mit niedrigen Selengehalten im Boden und somit hoher Prävalenz für Selendefizienz befinden sich vor allem in Afrika, Osteuropa und Neuseeland. In den meisten Teilen Westeuropas ist die Selenzufuhr ebenfalls leicht unterhalb der adäquaten Zufuhr (**Abbildung 1**). Auch in Deutschland ist aus diesem Grund eine unter der adäquaten Zufuhr liegende Selenversorgung weit verbreitet. Im Gegensatz zu Selen, Zink und Eisen wird die Versorgung mit Kupfer für gesunde Erwachsene weltweit als adäquat eingestuft [11-13] (**Abbildung 1**). Eine Unterversorgung mit Kupfer tritt bei Personen auf, die aufgrund von verschiedenen Erkrankungen eine gestörte Kupferabsorption aufzeigen oder durch genetische Defekte Störungen in der Kupferhomöostase aufweisen [13].

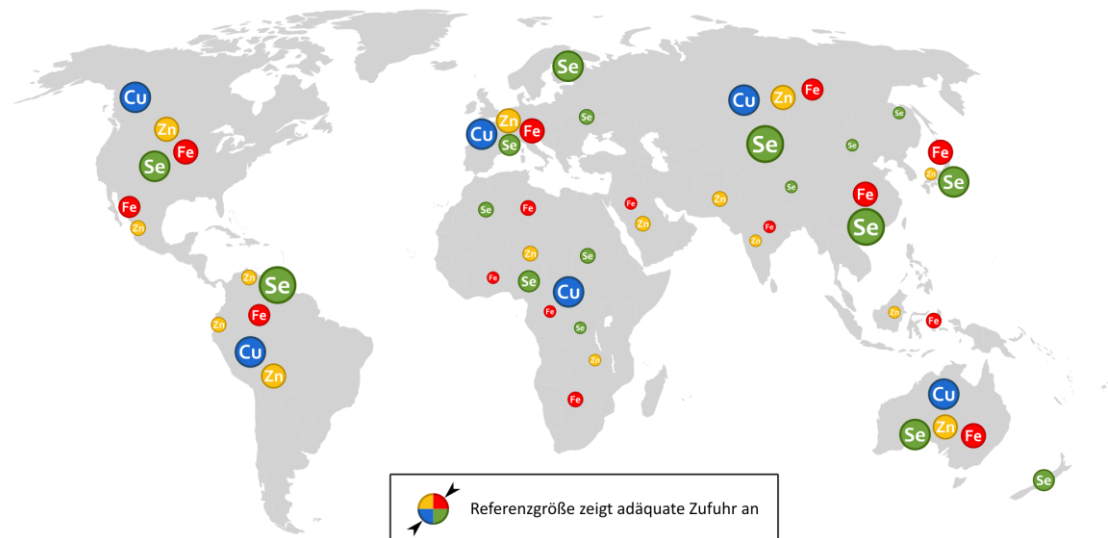


Abbildung 1. Globale Versorgung mit den essentiellen Spurenelementen Selen, Kupfer, Zink und Eisen. Die Daten für Zink basieren auf der Prävalenz für eine Zinkdefizienz [7], für Eisen auf dem Vorkommen einer Eisendefizienz-Anämie [5, 8] und für Selen auf Basis der geschätzten Zufuhr [9, 10] bzw. für Afrika anhand der geschätzten Selenverfügbarkeit [14]. Die Kupferzufuhr wird weltweit als adäquat eingestuft [11-13]. Befinden sich in einzelnen Kontinenten mehrmals die gleichen Spurenelementsymbole sind hier deutliche regionale Unterschiede beschrieben.

1.1.2 Veränderungen in der Spurenelementhomöostase

Jede Spurenelementdefizienz ist mit spezifischen Mangelsymptomen bzw. -erkrankungen assoziiert, die auf den Verlust von essentiellen Funktionen des Spurenelementes im Stoffwechsel zurückzuführen sind. Zwei Erkrankungen, die mit einer schweren Selendefizienz einhergehen, sind die Keshan-Erkrankung, eine juvenile Kardiomyopathie [15, 16], und die Kashin-Beck-Erkrankung, eine Gelenkkorpeldystrophie [17], welche in vereinzelt Regionen Chinas oder Osteuropas vermehrt auftreten. Mit einer Selensupplementation kann die Keshan-Erkrankung vermieden werden, während der Zusammenhang einer präventiven Selengabe mit der Kashin-Beck-Erkrankung unklar ist. Eine dauerhaft übermäßige Zufuhr von Selen führt neben unspezifischen Symptomen wie Müdigkeit, Gereiztheit oder gastrointestinalen Beschwerden, zu Haarverlust und Knoblauchatem, den beiden charakteristischen Merkmalen einer Selenose [18].

Störungen des Kupferstoffwechsels sind primär im Zusammenhang mit genetischen Defekten beschrieben. Hierbei spielen vor allem das Menkes- (MNK; ATP7A) und das Wilson-Protein (WND; ATP7B), die für den Kupferexport verantwortlich sind, eine wesentliche Rolle. Während Mutationen im Menkes-Gen einen systemischen Kupfermangel verursachen [19, 20], führen Mutationen im Wilson-Gen zu einer Akkumulation von Kupfer in Leber und Gehirn und dort zu entsprechender Kupfertoxizität [21]. Sowohl die Menkes-Erkrankung (Inzidenz: 1:50.000-1:300.000; Überblick in [22]) als auch die Wilson-Erkrankung (1:30.000-1:100.000; [23]) zählen jedoch zu den seltenen Erkrankungen.

In der systemischen Zinkhomöostase ist die Bedeutung einer Zinkdefizienz deutlich höher als die einer Zinkintoxikation, was darin begründet liegt, dass Zink insgesamt als relativ wenig toxisch eingeschätzt wird [24-26]. Eine Zinkdefizienz ist zumeist auf eine mangelhafte Absorption von Zink aus der Nahrung zurückzuführen. Diese kann durch die Nahrungszusammensetzung beeinflusst werden [27] oder auf genetischen Defekten von Zinktransportern [28] beruhen. Die Folgen einer Zinkdefizienz sind unter anderem Wachstums- und Entwicklungsstörungen, verzögerte Wundheilung, neurologische Auffälligkeiten und eine höhere Anfälligkeit für Infektionen [29].

Eine nutritive Eisendefizienz kann durch eine unzureichende Nahrungszufuhr bzw. eine gestörte Aufnahme durch wechselseitige Beeinflussung von Nahrungskomponenten auftreten [4]. Im Gegensatz zur nutritiven Eisendefizienz ist eine Eisenübersorgung (hereditäre Hämochromatose) primär durch genetische Defekte bedingt, die beispielsweise mit schweren Leberschädigungen einhergehen [30].

Veränderungen im Spurenelementstatus treten nicht nur als Folge von genetischen Defekten oder inadäquater Zufuhr auf, sondern werden auch im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen sowie dem Alterungsprozess beschrieben. Während des Alterns wurden beim Menschen verminderte Selen- und Zinkkonzentrationen im Serum gemessen, wohingegen die Kupfer- und Eisenkonzentrationen im Serum anstiegen [31-34]. Auch bei alten Mäusen wurden im Vergleich zu adulten Tieren gesteigerte zirkulierende Kupfer- und verminderte Zinkkonzentrationen im Serum beschrieben [35-37].

Als Folge von Infektionen oder Entzündungen wurden verminderte Serumgehalte von Zink, Selen und Eisen gemessen, während die zirkulierende Kupferkonzentration anstieg [38-43]. In einer kürzlich erschienenen Übersichtsarbeit wurden die Veränderungen der Spurenelementkonzentrationen von Selen, Kupfer, Zink und Eisen im Serum bzw. in Tumoren bei verschiedenen Krebserkrankungen zusammengefasst [44]. Vor allem bei Brustkrebspatienten sind die zirkulierenden Selen- und Zinkgehalte vermindert, während die Kupferkonzentration unabhängig von der Krebsart in Serum und Tumorgewebe deutlich gesteigert ist [44].

Ob diese Verschiebungen der Verhältnisse von Spurenelementen nur miteinander assoziiert sind oder kausale Zusammenhänge bestehen, ist bislang nur unzureichend verstanden. Um die Interaktionen genauer zu charakterisieren, ist es wichtig die Homöostase der einzelnen Spurenelemente und deren Regulation zu kennen. Aufgrund des in der Arbeitsgruppe bestehenden Forschungsschwerpunktes zu Selen und der Relevanz einer unter der adäquaten

Zufuhr liegenden Selenversorgung in Deutschland wurde Selen als Ausgangspunkt für die Betrachtung der Spurenelementinteraktion ausgewählt und wird deswegen im Folgenden ausführlicher als die anderen Spurenelemente betrachtet.

1.2 Selen und Selenoproteine

Die Essentialität von Selen wurde 1957 während Experimenten, bei denen durch präventive Selengabe einer Lebernekrose bei Ratten vorgebeugt werden konnte, das erste Mal beschrieben [45]. Mit der Entdeckung von Selen im Enzym Glutathionperoxidase 1 (GPX1), welche zunächst als eine kovalente Bindung beschrieben wurde, konnte erstmals eine genaue biochemische Funktion von Selen erkannt werden [46, 47]. Später wurde herausgefunden, dass Selen als Teil der Aminosäure Selenocystein (Sec) in Selenoproteine eingebaut ist [48, 49]. Selenoproteine umfassen eine Gruppe von Proteinen, die Sec enthalten. Bis heute sind im menschlichen Genom 25 und bei Nagern 24 Gene für Selenoproteine bekannt [50] (**Tabelle 1**).

1.2.1 Selenaufnahme und Biomarkerbestimmung zur Selenversorgung

Selen kann als organische oder anorganische Verbindung aufgenommen werden. Über die Nahrung spielen vor allem die organischen Verbindungen wie Selenomethionin (SeMet), Sec und Selen-methyl-Selenocystein eine große Rolle. Anorganische Selenverbindungen wie Selenit und Selenat werden vor allem über Supplemente aufgenommen und insgesamt etwas schlechter absorbiert als die organischen Verbindungen [51-54]. Der Hauptabsorptionsort für Selen ist der Dünndarm. Selenit wird vermutlich passiv [55], Selenat über einen Natrium-vermittelten Transportmechanismus [56, 57] und SeMet und Sec über Aminosäuretransporter aufgenommen [58, 59].

Als Biomarker für den Selenstatus werden die Selenkonzentration im Plasma bzw. Serum, die extrazelluläre GPX-Aktivität (GPX3) oder die Konzentration des zirkulierenden Selentransportproteins Selenoprotein P (SELENOP) analysiert [60]. Die GPX3-Aktivität erreicht ihr Maximum allerdings bei einer niedrigeren Selenkonzentration im Plasma als SELENOP (90-100 µg/L vs. ~120 µg/L) [61-64]. Da es das Ziel ist alle Selenoproteine zu exprimieren, gilt das Erreichen des SELENOP-Plateaus als adäquate Selenversorgung. Bei adäquat versorgten Personen konnte durch eine 16-wöchige Supplementation von SeMet im Vergleich zu Selenit eine konzentrationsabhängig-gesteigerte Plasmaselenkonzentration ermittelt werden. Diese hatte jedoch keinen Einfluss auf die Plasma-GPX3-Aktivität oder die SELENOP-Konzentration, sondern mündete in einer erhöhten Selenausscheidung im Urin innerhalb der Probandengruppe, die SeMet verabreicht bekommen hat [65]. Auch eine Kurzzeitgabe von

300 µg Selenat/Tag über einen Zeitraum von einer Woche führte zu einem Anstieg des Serumselengehaltes, nicht aber zu Veränderungen der GPX-Aktivität [66], was die begrenzte Aussagekraft der GPX-Aktivität als Biomarker unterstützt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass SeMet, aber nicht Selenat, verstärkt unspezifisch in Proteine wie Albumin eingebaut wird [67].

1.2.2 Biosynthese der Selenoproteine

Selen wird als Bestandteil der 21. proteinogenen Aminosäure Sec kotranslational in Selenoproteine eingebaut [48]. Sec wird hierbei durch das vormals nur als Stopcodon bekannte Basentriplett UGA codiert [68, 69] und direkt an der eigenen spezifischen *Transfer ribonucleic acid* (tRNA; tRNA^{[Ser]Sec}) synthetisiert [70, 71] (**Abbildung 2**). Eine Deletion des TRSP-Gens, welches für die tRNA^{[Ser]Sec} codiert, ist bei Mäusen embryonal letal [72], da es die Selenoproteinbiosynthese verhindert. Im ersten Schritt der Selenoproteinsynthese wird die spezifische tRNA^{[Ser]Sec} unter ATP-Verbrauch mit Hilfe der Seryl-tRNA-Synthetase (SerS) mit Serin beladen [71, 73] und im Folgenden durch die O-Phosphoserin-tRNA-Kinase (PSTK) phosphoryliert [74]. Die Selenophosphat synthetase 2 (SEPHS2), selbst ein Selenoprotein [75, 76], bildet im folgenden Monoselenophosphat [77, 78], welches im letzten Schritt der Selenoproteinbiosynthese von der Sec-Synthase (SEPSECS) verwendet wird, um die Selenocysteyl-tRNA^{[Ser]Sec} zu bilden [79, 80] (**Abbildung 2**).

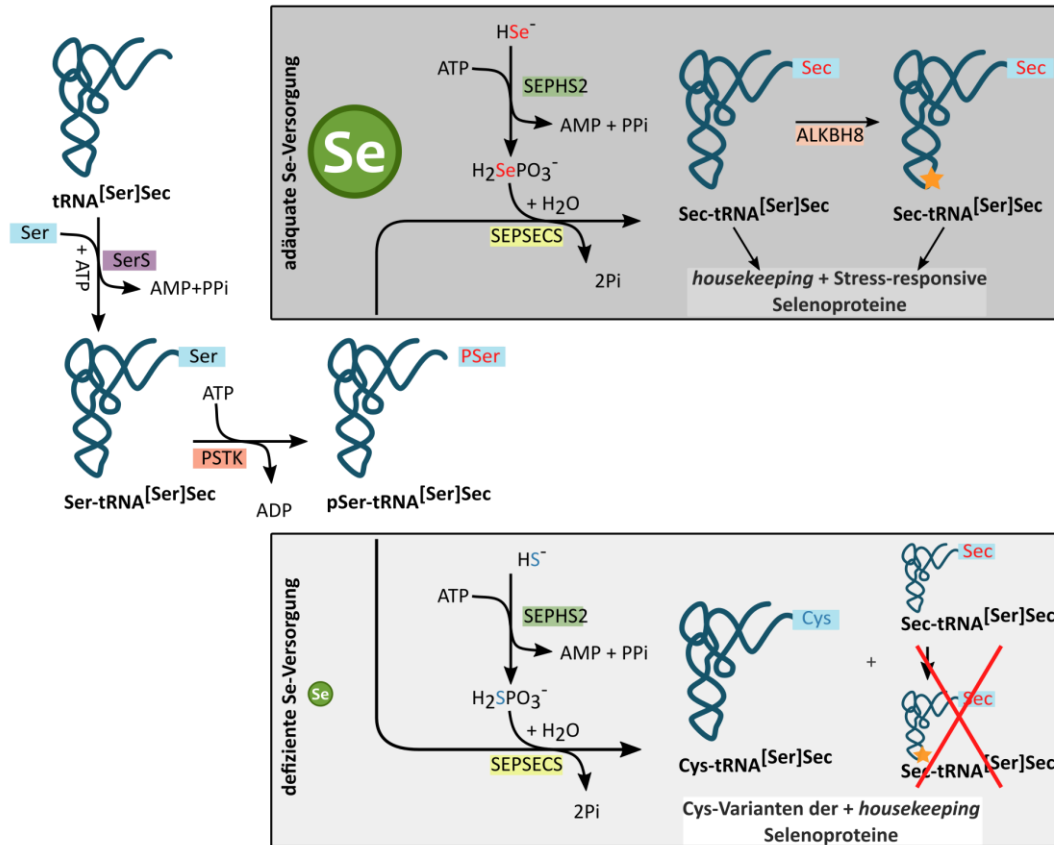


Abbildung 2. Syntheseweg der Selenoproteine unter Berücksichtigung der Selenzufuhr. Über verschiedene Enzyme (Seryl-tRNA-Synthetase (SerS); O-Phosphoserin-tRNA-Kinase (PSTK); Selenophosphatsynthetase 2 (SEPHS2); Sec-Synthase (SEPSECS)) wird Selenocystein (Sec) direkt an der für die Selenoproteinbiosynthese spezifischen tRNA^{[Ser]Sec} synthetisiert. Nach der Phosphorylierung des Serinrest (Ser -> pSer) an der tRNA^{[Ser]Sec} entscheidet die Selenverfügbarkeit über die Synthese der Sec-tRNA^{[Ser]Sec}. Bei adäquater Selenversorgung (oben) wird die Sec-tRNA gebildet und in einem weiteren Schritt durch das Alkylated DNA repair protein alkB homolog 8 (ALKBH8) an der Position 34 methyliert (Stern). Im Folgenden werden sowohl housekeeping, als auch stress-responsive Selenoproteine synthetisiert. Bei defizienter Selenversorgung (unten) ist es möglich, dass anstelle von Selen, Schwefel metabolisiert wird und es entsteht die Cys-tRNA^{[Ser]Sec}. Trotz defizienter Selenversorgung findet die Bildung von Sec-tRNA^{[Ser]Sec} statt, jedoch wird die Methylierung der tRNA unterdrückt, um weiterhin housekeeping Selenoproteine zu synthetisieren. Abbildung modifiziert nach [81, 82]. ADP – Adenosindiphosphat; AMP – Adenosinmonophosphat; ATP – Adenosintriphosphat; Cys – Cystein; Pi – anorganisches Phosphat; PPi – Pyrophosphat; Se – Selen; tRNA – transfer ribonucleic acid.

Damit das UGA-Codon nicht als Translationsstopp wirkt, befindet sich in der 3' untranslatierten Region (3'UTR) der messenger-RNA (mRNA) der Selenoproteine eine Haarnadelstruktur, die Sec-Insertionssequenz (SECIS) [83, 84] (**Abbildung 3**). Weiterhin sind neben der SECIS-Struktur weitere Proteine an der effizienten Translation des UGA-Codons beteiligt. Hierzu gehören das SECIS-Bindeprotein 2 (SBP2) [85, 86], der Sec-spezifische Elongationsfaktor (EEFSec) [87, 88], das ribosomale Protein L30 [89], das tRNA-Selenocystein 1-assoziierte Protein 1 (TRNAU1AP; SECp43) [90, 91] und das Nuklease-sensitive Element Bindeprotein 1 (NSEP1) [92] (**Abbildung 3**), die einen Komplex zur Stabilisierung des Ribosoms bilden. Für einzelne Selenoproteine sind weitere Komponenten, die an der UGA-Rekodierung beteiligt sind, beschrieben. So wurde in der

3'UTR von SELENOS das *Sels Positive UGA Recoding* (SPUR)-Element identifiziert [93]. Weiterhin wurde *downstream* Nahe der UGA-Codons einiger Selenoproteine (SELENON, SELENOT, SELENOO, SELENOH, SEPHS2) *selenocysteine codon redefinition elements* (SREs) erkannt [94, 95]. Für SELENOP wurde neben SREs zusätzlich der *Initiation Stem Loop* (ISL), welcher sich am Beginn der kodierenden Sequenz *downstream* des Start-Codons befindet, identifiziert [96].

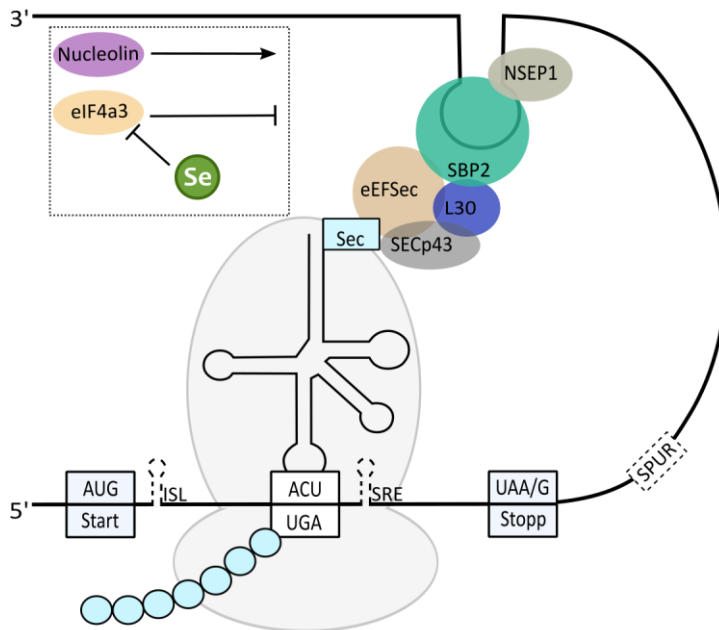


Abbildung 3. Synthesekomplex zur Selenoproteinbiosynthese.

Für den Einbau von Selenocystein in die wachsende Aminosäurekette müssen mehrere Voraussetzungen erfüllt sein, damit das UGA-Codon nicht als Stoppcodon erkannt wird. Zwischen der Sec-Insertionssequenz (SECIS)-Struktur in der 3' untranslatierten Region (3'UTR) der mRNA bildet sich ein Komplex aus verschiedenen Proteinen. Dazu gehören das SECIS-Bindeprotein 2 (SBP2), der Sec-spezifische Elongationsfaktor (eEFSec), das ribosomale Protein L30 und tRNA-Selenocystein 1-assoziierte Protein (TRNAU1AP, Secp43). Nucleolin und der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 4a3 (EIF4a3)

scheinen die Sec-Insertion gegensätzlich zu beeinflussen, wobei Nucleolin als positiver und EIF4a3 als negativer Regulator der Selenoproteinbiosynthese beschrieben ist. Zusätzlich beeinflusst Selen die Expression von eIF4a3 und somit die Selenoproteinsynthese. Weitere Komponenten, die die UGA-Rekodierung beeinflussen sind das *Sels Positive UGA Recoding* (SPUR)-Element, *selenocysteine codon redefinition element* (SRE) und der *Initiation Stem Loop* (ISL) (schematisch dargestellt), die für einzelne Selenoproteine identifiziert wurden.

Mutationen in Komponenten des humanen Selenoproteinsyntheseapparates sind bisher nur bei einzelnen Familien oder anhand eines einzelnen Krankheitsfalls identifiziert worden und gehören somit zu den sehr seltenen Erkrankungen. Eine bei einem Menschen identifizierte Mutation in der tRNA^{[Ser]Sec} löste Symptome wie Muskelschwäche, Schilddrüsendysfunktion, Müdigkeit und eine verminderte zirkulierende Selenkonzentration aus [97]. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass die Gen- und Proteinexpression der stress-responsiven Selenoproteine, nicht aber die der *housekeeping* Selenoproteine, deutlich vermindert waren. Der Defekt wurde auf die fehlende Methylierung der tRNA^{[Ser]Sec}, die für die Synthese von Stress-responsiven Selenoproteinen entscheidend ist, zurückgeführt [97]. Weitere bekannte Mutationen beim Menschen betreffen SBP2, die allesamt zu einer deutlich verminderten Selenoproteinexpression führten [98-100]. Zusätzlich wurden verschiedene neurologische Störungen mit Mutationen im SEPSECS-Gen in Verbindung gebracht [101, 102].

1.2.3 Regulation der Selenoproteinexpression

Die Selenverfügbarkeit hat einen entscheidenden Einfluss darauf, ob und wenn ja in welchen Organen Selenoproteine synthetisiert werden. Während einer Selendefizienz kommt es zu einer molekularen und systemisch hierarchischen Regulation der Selenoproteinexpression [103-106]. Die systemische Hierarchie bedingt, dass während einer Selendefizienz in stark Selen-abhängigen Organen wie dem Gehirn oder den Testes die Selenoproteinbiosynthese so lange wie möglich aufrechterhalten wird. Währenddessen wird die Selenoproteinsynthese in Organen wie der Leber und der Niere relativ schnell vermindert [103, 107, 108]. Die molekulare Hierarchie bedingt, dass auch verschiedene Selenoproteine einer Hierarchie unterliegen. Während die Expression von *housekeeping* Selenoproteinen lange aufrechterhalten wird, ist die Expression anderer Selenoproteine stark von der Verfügbarkeit von Selen abhängig (**Abbildung 2**). Letztere werden als Stress-responsive Selenoproteine bezeichnet. Während u. a. GPX1, SELENOH und SELENOW zu den Stress-responsiven Selenoproteinen zählen [109-111], gehören die Thioredoxinreduktase 1 (TXNRD1) und TXNRD2 sowie die GPX4 zur Gruppe der *housekeeping* Selenoproteine [108, 110].

Die Selenverfügbarkeit beeinflusst nicht nur die vorhandene Menge an Sec-tRNA^{[Ser]Sec}, sondern auch das Verhältnis zwischen zwei Isoformen der Sec-tRNA^{[Ser]Sec}, die sich hinsichtlich einer Methylierung des Uridins an Position 34 unterscheiden [112, 113] (**Abbildung 2**, Stern). Die Methylierung, katalysiert durch das *Alkylated DNA repair protein alkB homolog 8* (ALKBH8) [114], scheint der finale Schritt der Reifung der Sec-tRNA^{[Ser]Sec} zu sein [115]. Somit sind für die Inkorporation von Sec in verschiedene Selenoproteine zwei tRNA-Isoformen verantwortlich [70, 116-119] (**Abbildung 2**). Die Expression von Selenoproteinen wie der GPX1, der GPX3, der Methionin-Sulfoxid-Reduktase 1 (MSRB1, SELENOR, SELENOX), SELENOT und SELENOW ist stark, die von GPX2, GPX4, SELENOH und SELENOF wenig und die von TXNRD1 und TXNRD2 nicht von der Methylierung der tRNA^{[Ser]Sec} abhängig [118, 119]. Weiterhin wurde beobachtet, dass bei einer Selendefizienz der Abbau der mRNA von Stress-responsiven Selenoproteinen wie der GPX1 *nonsense*-vermittelt (*nonsense-mediated decay*; NMD) stattfindet [120, 121] und somit das verfügbare Selen genutzt werden kann, um als Sec in *housekeeping* Selenoproteine eingebaut zu werden. Zusätzlich trägt die unterschiedliche Bindeaffinität von SBP2 zu den einzelnen SECIS-Elementen zur Selenoprotein-Hierarchie und dem NMD bei [122, 123].

Zwei Faktoren, die bei der Regulation der Selenoproteinsynthese eine Rolle spielen, sind Nucleolin [124], ein nukleoläres Protein [125], und der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 4a3 (EIF4a3) [126] (**Abbildung 3**). Ein Nucleolin-*knock-out* (KO) bedingte in Mäusen eine verminderte Expression von GPX4 und TXNRD1, aber nicht von GPX1

und SELENOF [124]. Nucleolin wird als positiver Regulator der Selenoproteinbiosynthese beschrieben, jedoch ist der genaue Wirkmechanismus noch ungeklärt [82]. EIF4a3 bindet bevorzugt an die SECIS-Elemente von GPX1, MSRB1, SELENON und der Deiodinase 1 und kann so durch Blockieren der SBP2-Bindung die Selenoproteinbiosynthese unterdrücken. Unter Selendefizienz steigt die nukleäre EIF4a3-Expression, was auf eine negative Regulation der Selenoproteinbiosynthese, vor allem für Stress-responsive Selenoproteine, hinweist [126, 127] (**Abbildung 3**).

Zusätzlich wurde beschrieben, dass unter Selen-defizienten Bedingungen Selenoproteine mit einem Cystein (Cys) anstelle des Sec synthetisiert werden. Hierbei wird Sulfid anstelle von Selenid metabolisiert und anschließend Cys an die tRNA^{[Ser]Sec} gekoppelt [128] (**Abbildung 2**). Gezeigt werden konnte dies für TXNRD1, TXNRD2 und SELENOP [128-131]. Die entstandenen Enzyme weisen dabei aber nur eine sehr geringe katalytische Aktivität auf.

Neben der Abhängigkeit Selenoproteinexpression von der Selenverfügbarkeit, gibt es weitere Faktoren, die die Selenoproteinexpression beeinflussen können. Der redox-sensitive Transkriptionsfaktor *nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2* (Nrf2) (siehe **Kapitel 1.6.1**) induziert unter anderem die Expression der beiden Selenoproteine GPX2 und TXNRD1 [132, 133]. Bei einer Selendefizienz konnte die Expression von Nrf2-Zielgenen deutlich gesteigert werden [134, 135]. Eine Induktion von oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid (H₂O₂) resultierte in einer gesteigerten Expression von verschiedenen Selenoproteinen, die durch eine zusätzliche Kombination mit einer Selendefizienz noch deutlicher ausgeprägt war [136].

1.2.4 Funktionen der Selenoproteine

Alle Selenoproteine, deren Funktion bis dato geklärt ist, sind für die Redoxregulation von Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren und somit für die Redoxhomöostase von Bedeutung [137]. Weiterhin sind die Deiodinasen neben der Beteiligung an Redoxreaktionen [138] entscheidend für den Schilddrüsenstoffwechsel [139]. Für ca. ein Drittel aller Selenoproteine ist die genaue Funktion noch unklar, aber auch hier wird aufgrund von strukturellen Gegebenheiten eine Funktion als Oxidoreduktase vermutet [81, 137, 140] (**Tabelle 1**). Die am besten charakterisierten Selenoproteine umfassen die Familien der GPXen, der TXNRDen und der Deiodinasen.

1.2.4.1 Die Glutathionperoxidasen

Von den acht bekannten GPXen sind beim Menschen fünf Selenoproteine (GPX1-4, GPX6), während die anderen drei anstelle des Sec ein Cys enthalten. Die GPXen sind für die Regulation der Redoxhomöostase, das H₂O₂-Signaling und den Abbau von Hydroperoxiden verantwortlich (Überblick in [141]; **Abbildung 4**). Hierbei reduzieren sie meist Glutathion (GSH)-abhängig Hydroperoxide [142, 143]. Während GPX1 und GPX3 vermutlich vornehmlich H₂O₂ und weitere einfache, lösliche Hydroperoxide reduzieren [144, 145], ist die GPX4 für die Reduktion komplexer Lipidhydroperoxide verantwortlich [146]. Für die GPX2 und GPX6 wurden bisher keine spezifischen Substrate identifiziert. Hierarchisch betrachtet ist für GPXen ein großes Spektrum bekannt. Während GPX2 und GPX4 weiter oben in der Selenoproteinhierarchie stehen, ist die GPX1 weit unten angesiedelt [147, 148]. Dies spiegelt sich auch in der Überlebensfähigkeit von Mäusen beim Verlust der GPX-Gene wider. Der systemische KO von GPX1 [149, 150], GPX2 [151, 152] und GPX3 [153, 154] ist ohne weiteren externen Stimulus (oxidativer Stress, Selendefizienz) nicht letal. Im Gegensatz dazu führt ein systemischer KO der GPX4 zur embryonalen Letalität [155-157]. Der KO der mitochondrialen GPX4 ist hingegen nicht letal, führt aber zu Einschränkungen der männlichen Fertilität [158].

1.2.4.2 Die Thioredoxinreduktasen

Die TXNRDn sind wie die GPXen für die Redoxhomöostase von Bedeutung, indem sie Nicotinamidadenindinukleotidphosphat- (NADPH)-abhängig für die Reduktion von Thioredoxinen (TRX) und vielen weiteren Substraten verantwortlich sind [159, 160] (**Abbildung 4**). Beim Menschen kommen drei TXNRDn, die alle Selenoproteine sind, vor. Diese stehen sehr hoch in der Selenoprotein-Hierarchie. Einhergehend damit führt ein systemischer KO der TXNRD1 und TXNRD2 bei Mäusen zur embryonalen Letalität [161, 162]. Das TRX- und das GSH-System stellen zwei bedeutende Thiol-abhängige antioxidative Systeme in Säugerzellen dar. Beide Systeme können miteinander interagieren und teilweise gegenseitig die Defizienz oder Überversorgung des anderen Systems kompensieren [163-165].

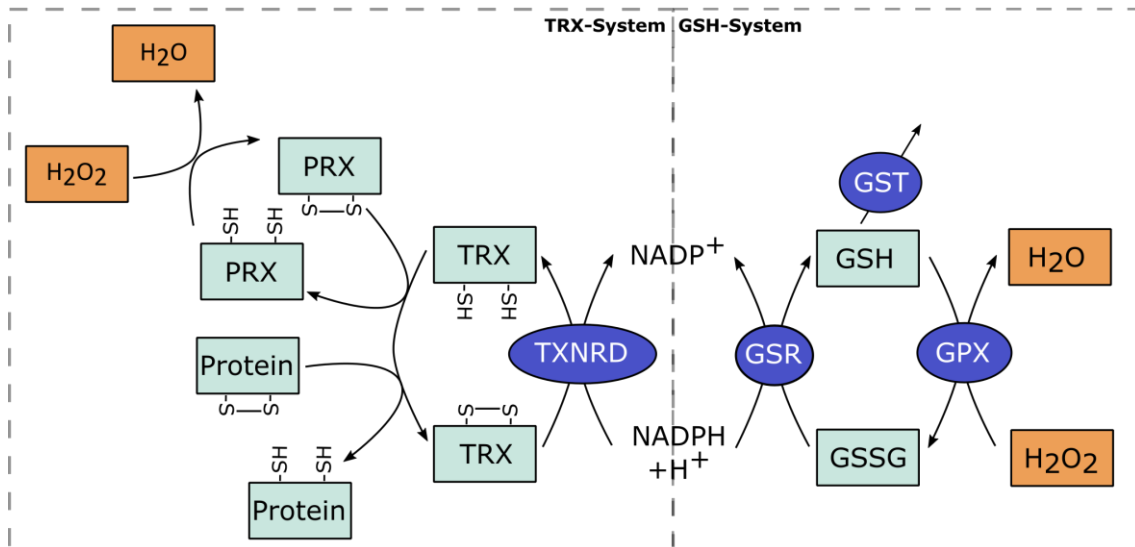


Abbildung 4. Übersicht des zellulären Thioredoxin (TRX)- und Glutathion (GSH)-systems. Das TRX- und GSH-System stellen im Organismus wichtige antioxidative Schutzsysteme dar, die eng miteinander verknüpft sind. Die Thioredoxinreduktasen (TXNRD) reduzieren Nicotinamadenindinukleotidphosphat (NADPH)-abhängig TRX, welche unter anderem Peroxiredoxine (PRX) oder Proteine reduzieren, die beispielsweise durch Hydroperoxide (H₂O₂) oxidiert wurden. Im GSH-System stehen die Glutathionperoxidasen (GPXen) im Hauptfokus. Sie reduzieren mit Hilfe von GSH Hydroperoxide wie H₂O₂. Das oxidierte Glutathion (GSSG) wird anschließend NADPH-abhängig durch die Glutathiondisulfid-Reduktase (GSR) wieder regeneriert. Weiterhin wird GSH zur Ausscheidung von verschiedenen Metaboliten verwendet, indem es unter Katalyse der Glutathion-S-Transferasen (GSTs) an diese konjugiert wird und so deren Transport erleichtert. Abbildung modifiziert nach [166, 167].

1.2.4.3 Selenoprotein P

SELENOP ist das Haupttransportprotein für Selen und das einzige humane Selenoprotein mit zwei SECIS-Elementen und zehn UGA-Kodons, die für Sec kodieren [168]. Im Plasma befindet sich ca. 60 % des Gesamtplasmaselens gebunden im SELENOP [169]. SELENOP wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert [170, 171] und anschließend ins Blut sekretiert, um Selen zu peripheren Zielorganen zu transportieren [172, 173]. In den Zielorganen erfolgt die SELENOP-Aufnahme vermutlich entweder über den Apolipoprotein E Rezeptor 2 (Gehirn, Testes) [174, 175] oder über die Rückresorption aus dem Primärharn mit Hilfe von Megalin (Niere) [176]. Ein KO des murinen SELENOP-Gens ist bei adäquater Selenversorgung nicht letal, aber durch eine deutliche Verminderung des Selengehaltes in Plasma, Gehirn, Testes und den Nieren gekennzeichnet. Damit einhergehend traten Wachstumsverzögerungen auf [177]. Bei einer gleichzeitigen Selendefizienz zeigen sich schwere neurologische Probleme, die innerhalb weniger Wochen zum Tod führten [178].

Tabelle 1. Übersicht zu Funktion und Vorkommen humaner Selenoproteine.

Selenoprotein	Vorkommen	Funktion	Referenz
GPX1	Cytosol	Reduktion von Hydroperoxiden	[46, 47]
GPX2	Cytosol	Reduktion von Hydroperoxiden	[179]
GPX3	extrazellulär	Reduktion von Hydroperoxiden	[180]
GPX4	Cytosol, Mitochondrien, Kern	Reduktion von komplexen Hydroperoxiden, Embryogenese, Spermienreifung	[181]
GPX6	Cytosol	Reduktion von Hydroperoxiden	[50]
TXNRD1	Cytosol, Kern	Reduktion von Thioredoxin 1 (TRX1)	[182]
TXNRD2	Mitochondrien	Reduktion von TXN2, Glutaredoxin 2	[183, 184]
TXNRD3	Cytosol, Kern	Reduktion von TXN, GSH-, Grx- Reduktase, Spermienreifung	[185]
DIO1	Plasmamembran	Aktivierung von T4, Inaktivierung von T3, T4 zu reversem T3 bzw. T2	[186]
DIO2	ER-Membran	Aktivierung von T4	[187]
DIO3	Plasmamembran	Inaktivierung von T3, T4	[188]
SELENOH	Kern	Antioxidative Funktion, Regulation der Transkription	[50, 189, 190]
SELENOM	ER	Ca ²⁺ -Freisetzung aus dem ER, Neuroprotektives Antioxidanz	[84, 191]
SELENOO	Mitochondrien	Redoxregulation	[50, 192]
SELENOT	ER, Golgi	Regulation der Calciumhomöostase, Neuroendokrine Funktion	[193]
SELENOV	Cytosol	männliche Reproduktion	[50]
SELENOW	Cytosol	Redoxhomöostase	[194]
SELENOF	ER	Regulation der Redoxhomöostase, Proteinfaltung	[195]
SELENOI	Plasmamembran	Ethanolamin-Phosphotransferase 1, Phospholipidsynthese	[50, 196]
SELENOK	ER-Membran	Abbau von falsch gefalteten Proteinen, Protein-Palmitoylierung	[50, 197]
SELENOS	ER-Membran	Abbau von falsch gefalteten Proteinen, Immunantwort	[50, 198]
SELENON	ER-Membran	Ca ²⁺ -Homöostase, Kofaktor für Ryanodin- Rezeptor	[199]
SELENOP	extrazellulär	Se-Transport, antioxidative Funktion	[173, 200]
SELENOR/ MSRB1/ SELENOX	Cytosol, Kern	Reduktion von Methionin-R- sulfoxidresten in Proteinen	[193, 201]
SEPHS2	Cytosol, Kern	Selenophosphatsynthese	[75, 202]

1.3 Kupfer

Bei Experimenten mit anämischen Ratten führte eine Eisengabe nur gemeinsam mit einer Kupfergabe zu einem starken Anstieg der Hämoglobinkonzentration und somit wurde erstmals die Essentialität von Kupfer beschrieben [203, 204]. Kupfer ist ein redox-aktives Metall, welches in zwei Redoxstufen (Cu^+ , Cu^{2+}) im Organismus auftritt. Das Vorkommen von zwei Redoxstufen ist zum einen wichtig für die Katalyse enzymatischer Reaktionen, an denen Kupfer als struktureller Bestandteil von Enzymen beteiligt ist (**Tabelle 2**). Insgesamt wurden bisher 54 Kupferbindeproteine identifiziert [205]. Zum anderen können bei ein-Elektronen-Reaktionen auch Zellschädigungen auftreten [206]. Hohe Konzentrationen von freiem Kupfer können die Bildung freier Radikaler über die Fenton-/Haber-Weiss-Reaktion fördern [207, 208]. Daraus resultierend können zelluläre Makromoleküle wie DNA, Proteine und Lipide geschädigt werden [209]. Aus diesem Grund ist es wichtig, die zelluläre Kupferhomöostase strikt zu regeln, um die Konzentration an freiem, intrazellulärem Kupfer gering zu halten [210].

Tabelle 2. Funktionen von Kupfer-abhängigen Proteinen (Übersicht in [211]).

Enzym	Funktion
Ceruloplasmin	Ferroxidase, Eisensfreisetzung aus Körperspeichern
Haephestin	Ferroxidase, intestinaler Eisentransport
Lysyl-Oxidase	Kreuzvernetzung Kollagen
Tyrosinase	Melaninbiosynthese, Pigmentierung
Dopamin-β-Hydroxylase	Aktivierung von Katecholaminen
Cu/Zn-Superoxiddismutase	Reduktion des Superoxidradikals
Cytochrom-C-Oxidase	Elektronentransport, ATP-Synthese
Aminoxidase	Deaminierung von Mono- und Diaminen
Peptidylglycine α-amidierende Monoxygenase	Aktivierung von Peptidhormonen
Zyklopen	Ferroxidase, plazentaler Eisenausstrom

Cu^{2+} wird über die Nahrung aufgenommen und dann vor allem im Magen und proximalen Dünndarm absorbiert [212]. Die Aufnahme von Cu^{2+} , welches zunächst zu Cu^+ z. B. durch duodenales Cytochrom B (DCYTB) reduziert werden muss, findet hauptsächlich über den Kupfertransporter 1 (Ctr1) [213, 214] und zu einem geringeren Maße über Ctr2 statt [215, 216] (**Abbildung 5**). Ein systemischer KO von Ctr1 führte bei Mäusen zu embryonaler [217, 218] und ein intestinaler, konditioneller KO zur neonatalen Letalität [219]. Ein Leber-spezifischer KO von

Ctr1 verminderte den intrazellulären Kupfergehalt und die Aktivität von Kupfer-abhängigen Proteinen um 50 % [220]. Diese Daten unterstützen, dass Ctr1 den wichtigsten Transporter im Kupferstoffwechsel darstellt. Auch eine Beteiligung des divalenten Metalltransporters 1 (DMT1) an der Kupferaufnahme wird diskutiert, jedoch zeigen bisherige Studien gegensätzliche Ergebnisse [221-224].

Intrazellulär wird Kupfer vermutlich direkt nach der Absorption an GSH [225, 226] und anschließend an Metallothioneine (MTs) gebunden [225, 227, 228] (**Abbildung 5**). Studien, die die Absorption von radioaktiv-markiertem Kupfer untersuchen, konnten außerdem zeigen, dass an MT gebundenes Kupfer wieder an GSH übertragen werden kann [229]. Der genaue Mechanismus ist aber ungeklärt. Eine Depletion von GSH hatte eine Verringerung des intrazellulären Kupfergehaltes und des an MT-gebundenen Kupfers, nicht aber des Gesamt-MT-Gehaltes, zur Folge [225, 228]. Die Bindung von Kupfer an GSH reduzierte außerdem die durch Kupfer induzierte freie Radikalbildung [230]. Entsprechend führte eine Depletion von GSH zu einer deutlich gesteigerten Kupfertoxizität in murinen Fibroblasten, was die Bedeutung von GSH für die Kupferhomöostase unterstreicht [231]. Weiterhin konnte durch Induktion von MTs mittels einer Zinkbehandlung in humanen Leukämiezellen (HL-60) eine verminderte Sensitivität gegenüber einer Kupfertoxizität im Vergleich zu nicht-Zink-behandelten Zellen ausgelöst werden [232].

Des Weiteren wird Kupfer intrazellulär an Chaperone gebunden, die das Spurenelement anschließend weiter zu den Zielproteinen transportieren [233, 234] (**Abbildung 5**). Zu diesen Chaperonen gehören beispielsweise das Kupfer-Chaperon für die Superoxiddismutase (CCS) [235], das Cytochrom-C-Oxidase-(CCO)-Kupfer-Chaperon 17 (COX17) [236, 237] und das *Antioxidant 1 copper chaperone* (ATOX1) [238, 239], die Kupfer zur Cu/Zn-Superoxiddismutase (SOD1), der CCO oder *ATPase copper transporting alpha* (ATP7A) und ATP7B transportieren. Die CCS-Proteinexpression ist invers mit dem Kupferstatus korreliert, während die CCS-mRNA-Expression nicht durch Kupfer beeinflusst ist [240-242]. Ein CCS-KO ging bei Mäusen mit einer Reduktion der SOD1-Aktivität einher [243], die aber zu keiner Beeinträchtigung der Viabilität unter homöostatischen Bedingungen führte. Jedoch zeigte sich bei Induktion von oxidativem Stress ein deutlich vermindertes Überleben der CCS-KO-Mäuse [244]. Ein KO des ATOX1-Gens in humanen Nierenzellen (Hek293) führte zu einer deutlich gesteigerten Kupferakkumulation im Cytosol und daraus resultierend zu einer verminderten Viabilität [245]. Ein systemischer KO des ATOX1-Gens bei Mäusen war durch schwere Kupfermangelercheinungen gekennzeichnet, die mit deutlichen Wachstumsverzögerungen und sehr hoher Letalität einhergingen [246].

Für den Kupferexport aus dem Darm ist hauptsächlich ATP7A verantwortlich [247-249] (**Abbildung 5**). Eine Kupfergabe resultierte in einer schnellen Translokation von ATP7A vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran und induzierte so den Kupferexport [250]. Neben der Exportfunktion für Kupfer ist ATP7A auch am Kupfertransport zu verschiedenen Zielproteinen beteiligt [251, 252]. Ein KO des ATP7A-Gens in murinen Brustdrüsenzellen ging mit einer verminderten Aktivität der Lysyloxidase, einem Kupfer-abhängigen Protein, das für die Quervernetzung des Kollagens wichtig ist, einher [251]. Bei Injektion dieser ATP7A-KO-Zellen in C57BL/6-Mäuse wurde ein vermindertes Krebswachstum beobachtet [251]. Weiterhin wird ATP7A auch für die Aktivierung der Kupfer-abhängigen Tyrosinase benötigt [252].

Im Blut wird Kupfer an Albumin, α 2-Makroglobulin und post-hepatisch zu 70-95 % an Ceruloplasmin (CP) gebunden (Überblick in [253]) (**Abbildung 5**). ATP7B ist für die biliäre Exkretion von Kupfer [254-256] und für die Beladung von CP mit Kupfer verantwortlich [257]. Vergleichbar mit der Wirkung auf ATP7A vermittelt Kupfer auch die vesikuläre Translokation von ATP7B vom Trans-Golgi-Netzwerk zur apikalen Membran, um den Kupferexport zu steigern [258-260]. Als möglicher Regulator von ATP7B und somit des Kupferexports wurde *copper metabolism domain containing 1* (COMMD1) identifiziert [261-264]. Eine Mutation von COMMD1 induzierte bei Hunden eine gesteigerte hepatische Kupferakkumulation [265], welche einen Wilson-ähnlichen-Phänotypen auslöste [266].

Der Export von Kupfer ist wie die Aufnahme vermutlich durch GSH beeinflusst. In GSH-depletierten Zellen führte eine zwei-stündige Kupferinkubation nicht zur Translokation von ATP7A und ATP7B aus dem Trans-Golgi-Netzwerk [267]. Für die Kupferbindung an ATP7A und ATP7B ist eine Deglutathionylierung der Kupferbindestellen nötig. Durch ein Zusammenspiel von GSH, Glutaredoxin 1, Kupfer und den Kupfer-ATPasen wird so vermutlich der Kupferexport reguliert [267-269].

Das Hauptspeicherorgan für Kupfer ist die Leber [233]. Die Regulation des Kupferstatus findet vor allem über die Absorption und Ausscheidung statt [270, 271]. Die Absorptionsrate kann bei sehr hohem und sehr niedrigem Kupfergehalt der Nahrung zwischen 12 % und 65 % schwanken [272-274]. Sowohl ein Kupfermangel als auch ein Kupferüberschuss sind unter homöostatischen Bedingungen sehr selten. Entgleisungen des Kupferhaushaltes treten beispielsweise bei verschiedenen genetisch bedingten Erkrankungen wie der Menkes- oder der Wilson-Erkrankung auf (**Abbildung 5**).

Die Menkes-Erkrankung ist durch Mutationen im Gen des Kupferexporters ATP7A (**Abbildung 5**, roter Stern) charakterisiert und wird rezessiv vererbt [20, 247]. Durch Mutationen im ATP7A Gen, welche vor allem die Exportfunktion für Kupfer beeinträchtigen, akkumuliert Kupfer innerhalb der Gewebe, vor allem im Intestinum. In der Folge entsteht ein systemischer Kupfermangel [19, 20]. Eine Behandlung mit einer subkutanen Kupferinjektion ist aufgrund der ubiquitären Expression von ATP7A oftmals nur bei milden Krankheitsverläufen erfolgreich, da eine Kupferdefizienz in vielen Organen auftritt [275].

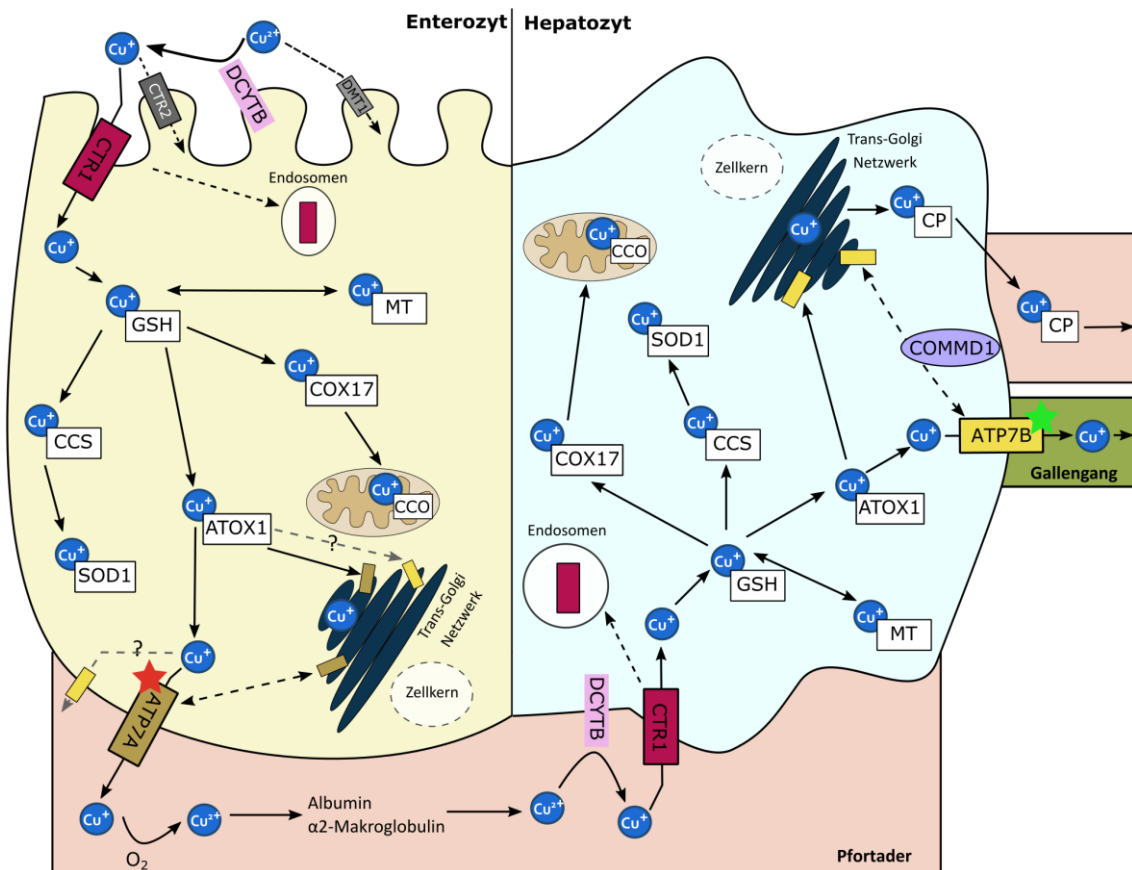


Abbildung 5. Übersicht des Kupfermetabolismus in Entero- und Hepatozyten. Kupfer muss, bevor es in die Zellen aufgenommen werden kann, reduziert werden. Dies geschieht z. B. über duodenales Cytochrom B (DCYTB, rosa). Die Aufnahme erfolgt hauptsächlich über Kupfertransporter 1 (Ctr1, magenta) und auch teilweise über Ctr2 (dunkelgrau) und den divalenten Metalltransporter 1 (DMT1, hellgrau). Nach der Aufnahme wird Kupfer an Glutathion (GSH) und Metallothioneine (MTs), zwischen denen Kupfer ausgetauscht werden kann, gebunden. Anschließend wird Kupfer an Kupfer-Chaperone (Kupfer-Chaperon für die Superoxiddismutase (CCS), Cytochrom-C-Oxidase-(CCO)-Cu-Chaperon 17 (COX17), Antioxidant 1 copper chaperone (ATOX1) übertragen, um von dort aus zu den Zielproteinen transportiert zu werden. Exportiert wird Kupfer aus den Enterozyten hauptsächlich über *ATPase copper transporting alpha* (ATP7A, braun) und aus den Hepatozyten über ATP7B (gelb). Beide Proteine bewegen sich abhängig vom Kupferstatus zwischen Trans-Golgi-Netzwerk (dunkelblau) und der Plasma- bzw. apikalen Membran. ATP7B wird vermutlich über *copper metabolism domain containing 1* (COMMD1, lila) reguliert und ist neben der biliären Exkretion von Kupfer auch für die Beladung von Ceruloplasmin (CP) mit Kupfer verantwortlich. Im Blut wird Kupfer entweder an Albumin oder α 2-Makroglobulin bzw. posthepatisch an CP gebunden. Die Sterne markieren die beiden Kupfertransportproteine, die bei der Menkes- (rot, ATP7A) bzw. der Wilson-Erkrankung (grün, ATP7B) aufgrund von Mutationen defekt sind. Abbildung modifiziert nach [211].

Die Wilson-Erkrankung ist durch Mutationen im ATP7B-Gen gekennzeichnet und wird autosomal rezessiv vererbt [255, 276]. Da ATP7B (**Abbildung 5**, grüner Stern) vornehmlich in der Leber und im Gehirn exprimiert ist, ergeben sich bei der Wilson-Erkrankung in diesen Geweben schwere Kupferakkumulationen. Leberschädigungen und neurologische Defekte sind die Folge eines Morbus Wilson [21, 277]. Als erfolgversprechende Therapien werden verschiedenen Kupferchelatoren, die durch Komplexierung von Kupfer entweder dessen Aufnahme oder Bioverfügbarkeit verringern, oder eine zusätzliche Zinksupplementation angewendet [278-281]. Neben verschiedenen Tierstämmen, die einen KO des ATP7B-Gens aufweisen [277, 282-284], können auch Bedlington Terrier und Mäuse mit einer Mutation im COMMD1-Gen [265, 285], die einen Wilson-ähnliche Phänotyp entwickeln [266, 285], zu mechanistischen Studien herangezogen werden.

Hohe Konzentrationen an intrazellulärem freiem Kupfer können die Zellen z. B. durch Bildung von reaktiven Verbindungen wie H_2O_2 , über die Fenton-/Haber-Weiss-Reaktion schädigen [207, 209]. Eine Verminderung hoher Konzentrationen freier Kupferionen kann durch die Verwendung von Chelatoren erreicht werden [286]. Kupferchelatoren finden seit langem in der Therapie des Morbus Wilson Anwendung [278-281]. Des Weiteren werden Chelatoren eingesetzt, um spezifische Funktionsweisen von verschiedenen Metallionen zu identifizieren. Hierbei kann nach Chelatoren unterschieden werden, die entweder die Bioverfügbarkeit von einzelnen Ionen intrazellulär verringern oder durch Komplexierung des Metalls dessen Aufnahme verhindern. Für Kupfer sind hierbei Tetrathiomolybdat und Bathocuproindisulfonsäure zu nennen, die intra- bzw. extrazellulär wirken [287-289].

1.4 Zink

In den 1930-er Jahren wurde Zink erstmals für Ratten als essentielles Spurenelement eingestuft [290]. Bei ca. jedem zehnten vorkommenden Protein handelt es sich um ein Zink-Protein [291]. In diesen wirkt Zink katalytisch, strukturell oder regulatorisch und ist an einem sehr breiten Spektrum biologischer Prozesse beteiligt [292]. Zink ist wichtig für die Differenzierung, Apoptose, Proliferation, die DNA-Reparatur und die Immunantwort [293]. Weiterhin spielt Zink eine bedeutende Rolle als Signalmolekül, ein Funktionsbereich, der in den letzten Jahrzehnten immer mehr Beachtung gewonnen hat [294]. Im Gegensatz zu Kupfer und Eisen liegt Zink immer als Zn^{2+} vor und ist somit redox-inaktiv [295], sodass es selbst keine Substanzen oxidieren oder reduzieren kann (Überblick in [296]). Jedoch sind viele Zink-abhängige Proteine und Liganden an Redoxreaktionen beteiligt, sodass Zink indirekt trotzdem zur Regulation der Redoxhomöostase beiträgt [296]. Zink liegt intrazellulär zu geringen Anteilen als „freies“ Zink vor [297], welches

vermutlich die biologisch aktive Form von Zink darstellt [298, 299]. Die Konzentration des intrazellulären „freien“ Zinks wird streng reguliert und liegt in ca. 10000-fach geringerer Konzentration als proteingebundenes Zink vor, dessen intrazelluläre Konzentration im mikromolaren Bereich liegt [300]. Da es kein Speicherorgan für Zink gibt, muss dieses kontinuierlich über die tägliche Nahrung aufgenommen werden [301].

Zink wird über 14 Transporter der Familie ZRT/IRT-ähnlicher Proteine (ZIP, SLC39A) aufgenommen und über neun Zinktransporter (ZnT, SLC30A) exportiert (**Abbildung 6**). Dies gilt sowohl für die Aufnahme und den Export in und aus den Zellen als auch für die Zinkverteilung in den verschiedenen intrazellulären Kompartimenten [302, 303]. Der Hauptabsorptionsort für Zink aus der Nahrung ist der Dünndarm [304]. Im Serum ist Zink hauptsächlich an Albumin, α_2 -Makroglobulin und Transferrin (TF) [305] und intrazellulär unter anderem an MTs gebunden [295, 306]. MTs weisen sieben Zinkbindestellen auf und sind mit an der Kontrolle der intrazellulären Zinkhomöostase beteiligt [307]. Die MT-Expression wird durch den *metal regulatory transcription factor 1* (MTF1), einen Zink-Finger-Transkriptionsfaktor, induziert, in dem dieser an das Metall-responsive Element (MRE) im MT-Promotor bindet [308-310] (**Abbildung 6**). MTF1-KO-Zellen weisen nur eine geringe bis keine MT-Expression auf [311]. Die Expression von MTs ist von der umgebenden Zinkkonzentration abhängig [312, 313] und wird bei hohen intrazellulären Zinkkonzentrationen stimuliert [308]. Neben den MTs sind auch die Zinkexporter ZnT1 und ZnT2 Zielgene von MTF1 und werden bei MTF1-Aktivierung vermehrt exprimiert [314, 315], während die Expression des Zinkimporters ZIP10 unterdrückt wird [316, 317]. Dies zeigt die wichtige Funktion von MTF1 bei der Regulation der Zinkhomöostase auf, welche über die Absorption und Exkretion von Zink reguliert wird. Während einer Zinkdefizienz wird folglich die Zinkexkretion über Urin und Fäzes deutlich vermindert, während die intestinale Absorption gesteigert wird [318-320].

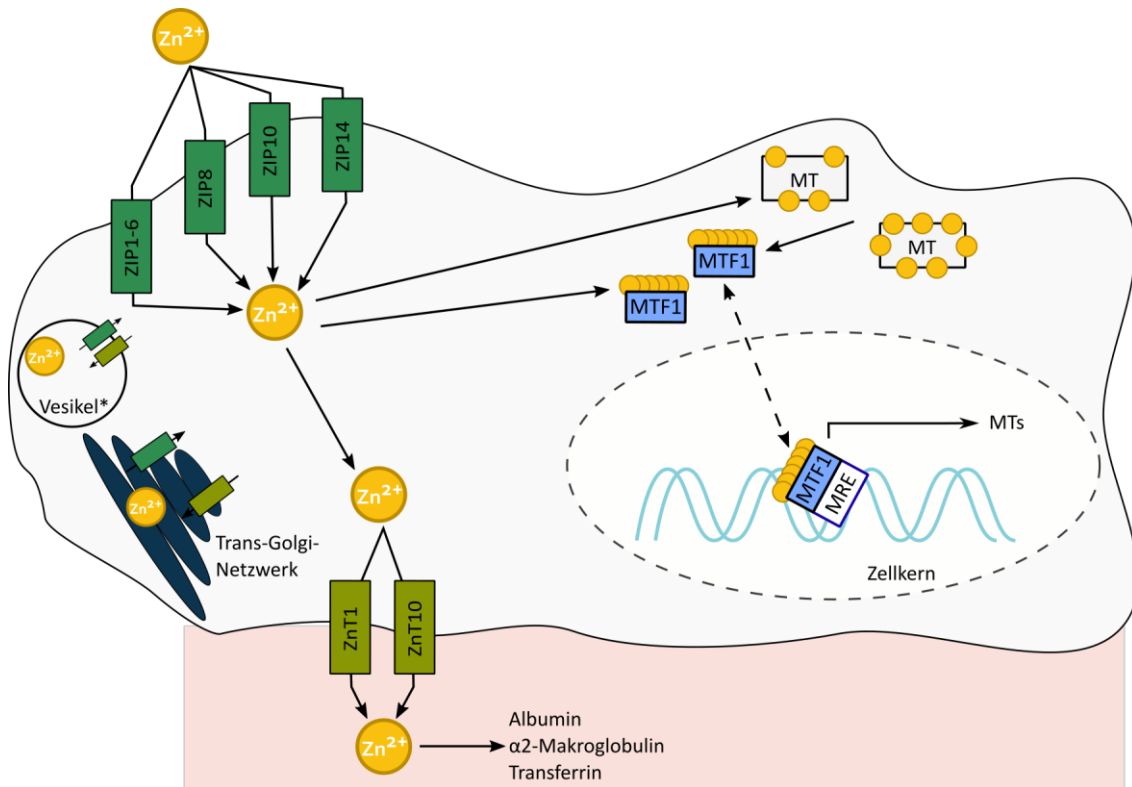


Abbildung 6. Zellulärer Zinkmetabolismus. Zink wird über die ZRT/IRT-ähnlichen Proteine (ZIPs) in die Zellen sowie aus intrazellulären Kompartimenten ins Cytosol transportiert. Für den Transport von Zink aus der Zelle heraus sowie in intrazelluläre Kompartimente sind die Zinktransporter (ZnTs) verantwortlich. Intrazellulär liegt Zink hauptsächlich gebunden an Metallothioneine (MTs) vor. Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor *metal regulatory transcription factor 1* (MTF1) bindet an das Metall-responsive Element (MRE) in der Promotorregion von Zielgenen wie z. B. MTs und induziert u. a. Zink-getriebene deren Expression. *gilt auch für Endo- und Lysosomen. Abbildung modifiziert nach [294, 321].

1.5 Eisen

Die Bedeutung von Eisen für die Behandlung einer Anämie ist bereits seit dem späten 17. Jahrhundert bekannt (Überblick in [322]). Mit ca. 65-75 % befindet sich die größte Menge an Eisen gebunden an Hämoglobin in den Erythrozyten, welches stetig recycelt wird [323]. Eisen ist für den Sauerstofftransport, das Wachstum und die Entwicklung und für den Energiemetabolismus von Bedeutung [324]. Eine strikte Kontrolle der Eisenhomöostase ist ebenso wichtig wie die der Kupferhomöostase, da Eisen aufgrund seiner Redox Eigenschaften in freier Form dazu neigt, über die Fenton-Reaktion freie Radikale zu bilden, die dem Organismus schaden können [207]. Die Regulation des Gesamtkörpergehaltes wird über die Eisenabsorption gesteuert, da es keinen geregelten Exkretionsweg für Eisen gibt [30]. In der Nahrung liegen Hämeisen und Nicht-Hämeisen vor, deren Absorptionsraten sich mit 20-30 % für Ersteres und 1-10 % für letzteres deutlich unterscheiden [325]. Die Absorption erfolgt wie auch bei Selen, Kupfer und Zink hauptsächlich im Dünndarm [326].

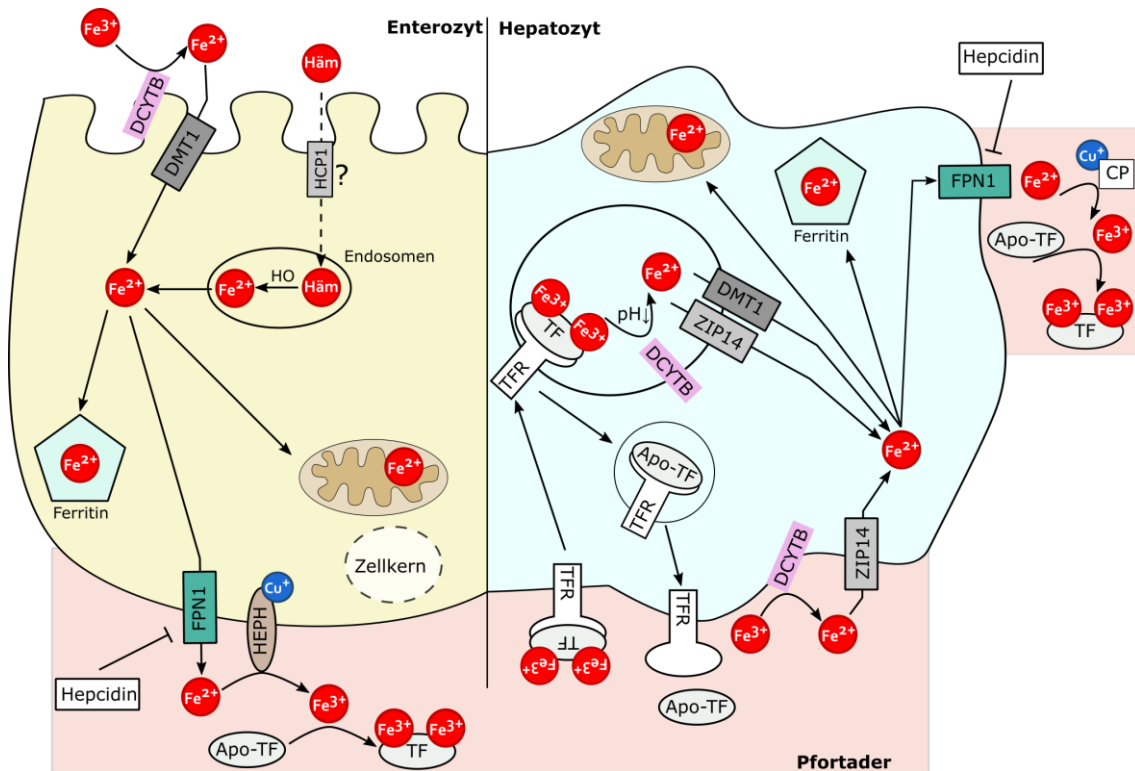


Abbildung 7. Der Eisenstoffwechsel in Entero- und Hepatozyten. Nutritives Eisen kann als Häm- bzw. Nicht-Hämeisen vorliegen. Das Hämeisen wird vermutlich über das Häm-Carrier-Protein 1 (HCP1) in die Enterozyten aufgenommen und dort in Endosomen durch die Hämoxygenase (HO) freigegeben. Nicht-Hämeisen muss vor der Absorption z. B. über duodenales Cytochrom B (DCYTB) reduziert werden, um dann über den divalenten Metalltransporter 1 (DMT1) aufgenommen zu werden. Intrazellulär wird Eisen an Ferritin gebunden, in die Mitochondrien transportiert oder über Ferroportin 1 (FPN1) ins Blut abgegeben. Im Blut ist Eisen an Transferrin (TF) gebunden, wofür es zunächst durch Haephestin (HEPH, Enterozyten) bzw. Ceruloplasmin (P Hepatozyten) oxidiert werden muss. In die Hepatozyten wird an TF-gebundenes Eisen über den Transferrinrezeptor (TFR) in Endosomen internalisiert und dort freigegeben. Der Transport ins Cytoplasma erfolgt über DMT1 oder ZIP14. Die anschließende intrazelluläre Verteilung und der Export in Hepatozyten entspricht dem der Enterozyten. Abbildung modifiziert nach [211].

Hämeisen wird als intaktes Molekül in die Enterozyten aufgenommen und anschließend erfolgt die intrazelluläre Eisenfreisetzung mit Hilfe der Hämoxygenasen (HOs) [327] (**Abbildung 7**). Die Beteiligung des Häm-Carrier-Protein 1 (HCP1) an der Aufnahme von Hämeisen wird kontrovers diskutiert [328-330]. Nicht-Hämeisen wird in die Enterozyten über DMT1 als Fe²⁺ aufgenommen [331, 332], wofür es zunächst z. B. durch DCYTB Ascorbat-abhängig [333] reduziert werden muss [334]. Ein Verlust oder eine Mutation im Gen von DMT1 geht mit schweren Eisenmangelsymptomen einher [331, 332]. Intrazellulär wird Eisen an das Speicherprotein Ferritin gebunden [335-337], in die Mitochondrien transportiert oder direkt über Ferroportin 1 (FPN1), dem einzig bekannten zellulären Eisenexporter, wieder aus den Enterozyten exportiert [338]. Anschließend wird das zweiwertige Eisen durch die Cuproenzyme Haephestin (HEPH) [339] und posthepatisch durch CP [340, 341] oxidiert, um dann an das Eisentransportprotein TF gebunden zu werden [30]. TF wird anschließend von Zielzellen über den Transferrinrezeptor

(TFR) in Endosomen internalisiert [342]. Das freigesetzte Eisen wird über DMT1 und ZIP14 ins Cytosol geschleust [331, 343]. Heparin, welches durch die Blockierung der Expression und Translokation von FPN1 als Hauptregulator der intestinalen Eisenabsorption wirkt, wird in der Leber gebildet [344, 345] (**Abbildung 7**).

1.6 Oxidativer Stress und ein redox-sensitiver Transkriptionsfaktor

Bei vielen Reaktionen wie z. B. während der zellulären Respiration in den Mitochondrien oder bei durch NADPH-Oxidase-katalysierten Reaktionen können aufgrund unvollständiger Oxidation von Sauerstoff reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie das Superoxidanion ($O_2^{\bullet-}$), H_2O_2 und das Hydroxylradikal (HO^{\bullet}) entstehen (Überblick in [346, 347]). Bei der Fenton-/Haber-Weiss-Reaktion von Eisen oder Kupfer entsteht beispielsweise das Hydroxylradikal [207]. Intrazellulär gibt es zahlreiche antioxidative Systeme, die für ein Redoxgleichgewicht sorgen. Dazu gehören beispielsweise die GPXen, die SODen, die TXNRDn, die Katalase, die GSH-Transferasen (GSTen) und die NADPH-Chinon Oxidoreduktase 1 (NQO1). Weiterhin ist beispielsweise auch das Molekül GSH ein eigenständiges und wirksames Antioxidans [347, 348]. Ein verändertes Redoxgleichgewicht zugunsten der ROS wird als oxidativer Stress bezeichnet und kann in der Folge zu Schädigungen von Biomolekülen wie Proteinen, Lipiden oder der DNA führen [209, 348].

1.6.1 Nrf2 - ein redox-sensitiver Transkriptionsfaktor

Viele der oben genannten antioxidativen Enzyme werden über Nrf2 reguliert. Nrf2 ist ein redox-sensitiver Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktor der *cap 'n' collar*-Familie, der sowohl die konstitutive, aber hauptsächlich die induzierbare Expression seiner Zielgene vermittelt [349-351]. Unter physiologischen Bedingungen liegt Nrf2 im Cytosol gebunden an zwei Moleküle seines Inhibitorproteins Kelch-ähnliches-ECH-assoziiertes Protein 1 (KEAP1) vor [352-354] (**Abbildung 8**). Über die Keap1-Cullin-3-(Cul3)-Ubiquitin-E3-Ligase wird das komplexierte Nrf2 ubiquitiert und somit proteasomal degradiert [355, 356]. Unter basalen Bedingungen weist Nrf2 eine sehr geringe Halbwertszeit (< 30 min) und Expression auf [357, 358]. Bei Exposition mit elektrophilen Substanzen oder H_2O_2 werden die Cys-Reste des KEAP1-Moleküls oxidiert und verhindern so die Degradierung des bereits gebundenen Nrf2s [359, 360]. Neu synthetisierte Nrf2-Moleküle können nicht mehr von oxidiertem KEAP1 gebunden werden. Daraus resultiert die Translokation von Nrf2 in den Kern [361]. Im Kern bindet Nrf2 als Heterodimer mit *small musculoaponeurotic fibrosarcoma* (sMaf)-Proteinen [362] an das antioxidativ-responsive Element (ARE) [363] bzw. das Electrophil-responsive Element (EpRE) [364] in der

Promotorregion von Zielgenen und induziert deren Transkription. Einen wichtigen Negativregulator des Nrf2 stellt die Fyn-Kinase dar [365, 366] (**Abbildung 8**).

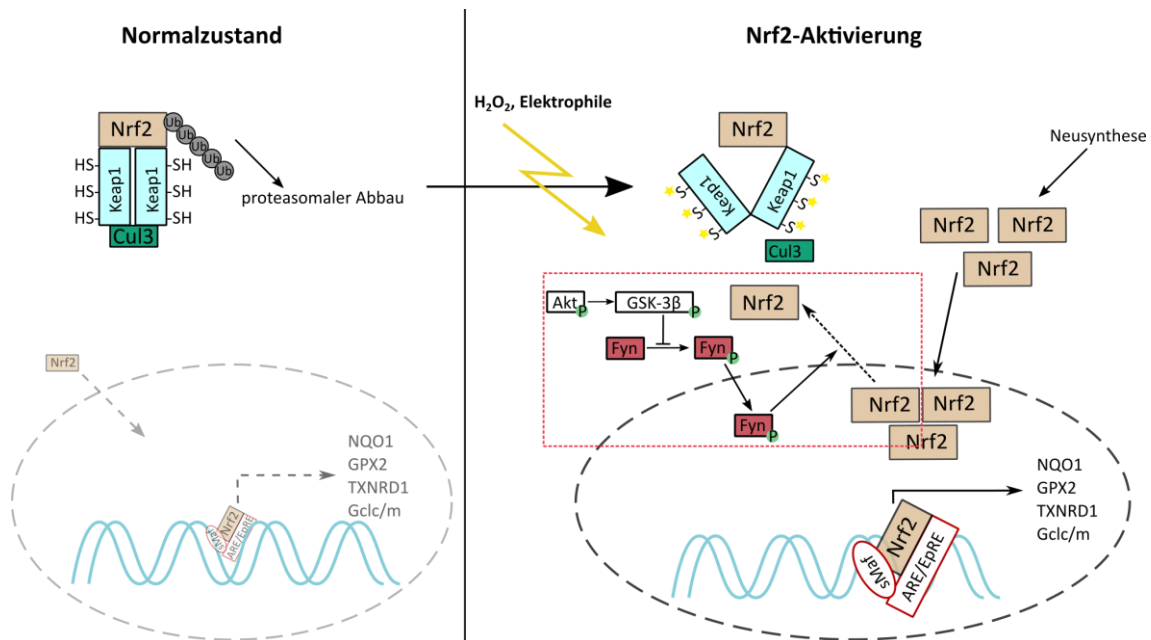


Abbildung 8. Die Regulation von Nrf2 unter basalen und aktivierten Bedingungen. Unter normalen Bedingungen befindet sich *nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2* (Nrf2) gebunden an Kelchähnliches-ECH-assoziiertes Protein 1 (KEAP1) im Cytosol. Die Cullin-3 (Cul3)-Ubiquitin-Ligase sorgt für die stetige Ubiquitierung des Nrf2s, woraufhin es proteasomal abgebaut wird. Durch Stimuli wie H₂O₂ oder Elektrophile werden die Cystein-Reste des KEAP1 modifiziert und können so nicht mehr den proteasomalen Abbau von bereits gebundenem Nrf2 vermitteln. Somit kann neu synthetisiertes Nrf2 in den Zellkern translozieren und dort an das antioxidativ-responsive Element (ARE)/ Electrophil-responsive Element (EpRE) in der Promotorregion von Zielgenen binden und deren Transkription induzieren. Ein Gegenregulator von Nrf2 ist die Fyn-Kinase, die in der phosphorylierten Form in den Kern transloziert und somit den Kernexport von Nrf2 vermittelt. Reguliert wird die Fyn-Kinase über Akt und die Glycogensynthase Kinase 3β (GSK3β).

Ein Nrf2-KO geht mit einer deutlich reduzierten Expression der Nrf2-Zielgene und einer verminderten GSH-Konzentration einher [367-369]. Nrf2-KO-Mäuse sind unter basalen Bedingungen vital und weisen keine Anzeichen auf erhöhten oxidativen Stress auf [370]. Jedoch reagieren sie deutlich sensitiver als Wildtyp-Mäuse (WT) auf Stressoren [367, 371-374]. Ein KO des Inhibitorproteins KEAP1 führt hingegen zur nukleären Akkumulation von Nrf2 und einer verstärkten Expression der Nrf2-Zielgene [375, 376] und ist als homozygoter KO bei Mäusen vor dem Absatz letal [375].

Die ersten Zielgene von Nrf2 konnten nach Inkubation mit tert-Buthyl-Hydroperoxid oder β-Naphtoflavon identifiziert werden [363, 377, 378]. Außerdem zeigte sich, dass eine Inkubation mit dem Isothiocyanat Sulforaphan zur starken Induktion von Nrf2 führte und somit zur Transkription der Zielgene [379]. Die Zielgene von Nrf2 umfassen Enzyme im GSH- und TXN-

System, sind an Phase-I- und -II-Reaktionen, der NADPH-Regeneration und am Eisen-, Fett- und Glucose-/Glykogenstoffwechsel beteiligt (Überblick in [380, 381]). Viele Enzyme, die am Spurenelement-Metabolismus der beschriebenen Spurenelemente beteiligt sind, gehören zu den Nrf2-Zielgenen (Abbildung 9. Spurenelement-assoziierte Nrf2-Zielgene.).

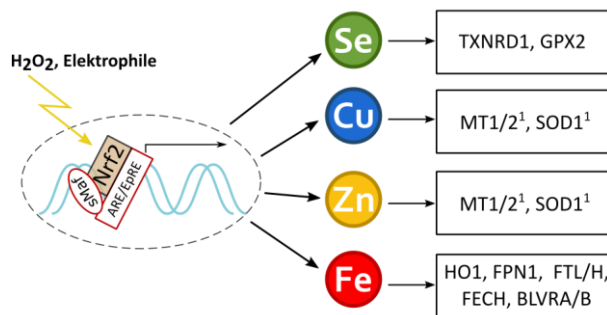


Abbildung 9. Spurenelement-assoziierte Nrf2-Zielgene. Nach Translokation von Nrf2 in den Zellkern und Bindung an das antioxidativ-responsive Element (ARE)/ Electrophil-responsive Element (EpRE) in der Promotorregion von Zielgenen wird die Transkription dieser Zielgenen induziert. Zu diesen Zielgenen gehören einige am Spurenelementmetabolismus beteiligte Gene, die hier beispielhaft aufgeführt sind. ¹Diese Gene wurden bisher nicht als Nrf2-Zielgene

definiert, jedoch gibt es Studien, die eine Nrf2-Regulation beschreiben [382, 383]. BLVRA/B – Biliverdin Reduktase A/B; Cu – Kupfer; Fe – Eisen; FTL/H – Ferritin *light/heavy chain*; FECH – Ferrochelatase; FPN1 – Ferroportin 1; GPX2 – Glutathionperoxidase 2; HO1 – Hämoxxygenase 1; MT – Metallothionein; Se – Selen; SOD1 – Cu/Zn-Superoxiddismutase; TXNRD1 – Thioredoxinreduktase 1.

1.6.2 Der Einfluss von Selen, Kupfer, Zink und Eisen auf den Redoxstatus

Die vier essentiellen Spurenelemente Selen, Kupfer, Zink und Eisen sind an der Regulation der Redoxhomöostase beteiligt. Dabei sind sie sowohl in oxidativen als auch in antioxidativen Vorgängen involviert. Sowohl Spurenelementdefizienzen als auch hohe Konzentrationen der Spurenelemente können oxidativen Stress induzieren. Als Antwort auf erhöhten, intrazellulären, oxidativen Stress wird unter anderem Nrf2 aktiviert und in der Folge eine Gegenregulation über die antioxidativen Nrf2-Zielgene vermittelt. Bei ausgeglichener Spurenelementhomöostase wirken die Spurenelemente überwiegend als Bestandteil von antioxidativen Enzymen.

Für Selen konnte gezeigt werden, dass sowohl eine nutritive Defizienz [134, 135], als auch der Verlust aller Selenoproteine durch Mutationen im TRSP- [384] oder SECISBP2-Gen [385] zu einer Nrf2-Aktivierung und Induktion der Expression seiner Zielgene führte. Weiterhin wurde Nrf2 auch bei hepatischen KOs einzelner Selenoproteine wie TXNRD1 [386] oder GPX4 [387] aktiviert. Die TXNRD1 wird zusätzlich als potentieller Nrf2-Regulator beschrieben (Überblick in [167]). Eine Defizienz von Kupfer, Zink und Eisen führte intrazellulär zu oxidativem Stress [388-390], welcher vornehmlich auf den Verlust der von ihnen abhängigen antioxidativen Enzyme zurückzuführen ist [391-393].

Hohe Konzentrationen an freiem Kupfer oder Eisen können über die Fenton-/Haber-Weiss-Reaktion zur Bildung von Hydroxylradikalen führen, die dann Zellschädigung auslösen können [207-209]. Weiterhin können hohe Selenitkonzentrationen zur Bildung von H_2O_2 beitragen und somit ebenfalls den Spiegel an oxidativem Stress erhöhen [394, 395]. Auch hohe Zinkkonzentrationen können prooxidativ wirken, sobald die Bindekapazität beispielsweise durch Metallothioneine oder Serumproteine nicht mehr ausreicht (Überblick in [296]).

1.7 Interaktionen von Spurenelementen

Die Funktionen, der Metabolismus und die Homöostase der einzelnen Spurenelemente sind sehr gut untersucht. Jedoch sind mögliche Interaktionen der Spurenelemente bisher zumeist nur unzureichend betrachtet. Überschneidungspunkte des Metabolismus von Selen, Kupfer, Zink und Eisen treten bei der Absorption der vier Spurenelemente im Dünndarm und bei der Regulation der zellulären Spurenelementhomöostase auf. Weiterhin sind alle vier Elemente an der Regulation der Redoxhomöostase beteiligt. Für einige Spurenelementkombinationen wurden in diesen Bereichen bereits Interaktionen beschrieben.

Hohe Konzentrationen an freien Kupfer- und Eisenionen können die Bildung von Hydroxylradikalen über die Fenton-/Haber-Weiss-Reaktion induzieren und müssen deswegen beide sehr streng homöostatisch kontrolliert werden [207]. Grundsätzlich scheinen die Kupfer- und Eisenhomöostase negativ miteinander zu korrelieren. Bei Nagern konnte gezeigt werden, dass hohe Eisenkonzentrationen die Kupferspiegel vermindern [396-398] und eine Eisendepletion zu einer gesteigerten intrazellulären Kupferkonzentration führte [399, 400]. Vermutet wird, dass Kupfer bei einer Eisendefizienz vermehrt über DMT1, dessen Expression während einer Eisendefizienz steigt, aufgenommen wird [222]. Weiterhin wurde beschrieben, dass DMT1 Kupfer als einwertiges Ion aufnehmen kann [221]. Zweiwertiges Kupfer muss dafür zunächst durch DCYTB, welches ebenfalls bei einer Eisendefizienz hochreguliert wurde, reduziert werden [401]. Umgekehrt verminderten hohe intrazelluläre Kupferkonzentrationen *in vitro* die zellulären Eisenspiegel [402, 403]. Eine gesteigerte hepatische Eisenakkumulation aufgrund einer verminderten Kupferzufuhr [404-406] wurde auf die verminderte Expression des Kupfer-abhängigen Proteins CP zurückgeführt [407, 408]. Hierbei wird die gleiche Symptomatik wie bei einem KO des CP-Gens beobachtet, bei dem Eisen nicht oxidiert und an TF gebunden werden kann [409, 410].

Zink wird neben Kupferchelatoren zur Behandlung eines Morbus Wilson, der sich durch schwere Kupferakkumulationen in Leber und Gehirn auszeichnet, verwendet. Zink steigert die intestinale Ausscheidung von Kupfer und schützt vor einer Reabsorption von Kupfer [411]. Diese Wirkung von Zink beruhte vermutlich auf der Induktion von MTs über den Transkriptionsfaktor MTF-1 [412, 413]. MTs weisen eine höhere Affinität zu Kupfer im Vergleich zu Zink auf und können gebundenes Zink durch Kupfer ersetzen [414, 415]. Nach Abschilferung der mit Kupfer-MT beladenen Enterozyten werden diese über die Fäzes ausgeschieden [212] und folglich die Kupferaufnahme reduziert. Im Gegensatz dazu wurde beschrieben, dass auch bei MT-Null-Mäusen der Kupfergehalt durch hohe Zinkzufuhr vermindert war und somit die Wirkung von Zink nicht ausschließlich auf einem MT-vermittelten Mechanismus beruhen kann [416].

Während der Nutzen einer Zinksupplementation bei Morbus Wilson als belegt gilt, kann eine langandauernde, hochkonzentrierte Zinksupplementation (ohne Morbus Wilson) eine schwere Kupferdefizienz mit Wachstumsstörungen, Reduktion der SOD-Aktivität, des CPs und des Hämoglobinlevels hervorrufen [417-419]. In einer Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass bei gleichbleibendem Verhältnis zwischen Zink- und Kupferzufuhr keine Veränderung der gegenseitigen Spurenelementhomöostase auftraten, unabhängig davon, ob Ratten mit defizienten, adäquaten oder supplementierten Kupfer- und Zinkgehalten gefüttert wurden [420].

2 Zielstellung und Strukturierung der Dissertation

Essentielle Spurenelemente wie Selen, Kupfer, Zink und Eisen sind als Bestandteil von Enzymen lebensnotwendig und führen bei einer Defizienz zu schweren Mangelsymptomen, die sich unter anderem von fehlenden enzymatischen Funktionen ableiten lassen. Häufig treten Veränderungen der Spurenelementhomöostase nicht isoliert, sondern in Kombinationen auf. Generell überschneidet sich der Metabolismus der vier Spurenelemente an verschiedenen Punkten. Sie werden alle im Dünndarm absorbiert und teilen partiell gemeinsame Transportmechanismen. Weiterhin sind alle vier Spurenelemente an der Regulation der Redoxhomöostase des Organismus beteiligt. Dies geschieht zum einen, da sie Bestandteil von antioxidativen Enzymsystemen sind und zum anderen, da sie bei sehr hohen intrazellulären Konzentrationen selbst zur Induktion von oxidativem Stress und folglich zur Zellschädigung beitragen können. Als Antwort auf erhöhten oxidativen Stress wird u. a. der redox-sensitive Transkriptionsfaktor Nrf2 aktiviert. Folglich wird die Expression von Zielgenen, zu denen viele antioxidativ wirksame Enzyme gehören, induziert. Das Ziel der vorliegenden Dissertation sollte es deshalb sein, die Interaktionen der essentiellen Spurenelemente Selen, Kupfer, Zink und Eisen untereinander und mit dem redox-sensitiven Transkriptionsfaktor Nrf2 genauer zu charakterisieren.

Zunächst sollte der Einfluss von Nrf2 auf die Homöostase von Selen, Kupfer, Zink und Eisen an Mäusen mit systemischem Nrf2-KO untersucht werden. Der KO von Nrf2 beeinflusst viele Spurenelement-assoziierte Enzyme, jedoch sind die Auswirkungen auf den systemischen Status der vier Spurenelementen noch nicht beschrieben (**Kapitel 4.1**). Umgekehrt können auch die vier Spurenelemente die Aktivität von Nrf2 über die Regulation der Redoxhomöostase modulieren. Deshalb sollte im Anschluss der Einfluss der Spurenelemente Selen, Kupfer und Zink auf die Nrf2-Aktivierung betrachtet werden. Hierbei sollten vor allem Kombinationen der Spurenelemente, insbesondere von Selen und Kupfer sowie Kupfer und Zink, untersucht werden. Hierzu sollten verschiedene humane Krebszelllinien, aber auch Mäuse als Modellorganismus verwendet werden. Dazu sollten die Konzentrationen der Spurenelemente zwischen defizient und leicht supplementiert moduliert werden, um möglichst für den Menschen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen relevante Konzentrationsbereiche abzudecken. (**Kapitel 4.1-4.3**).

Neben den mechanistischen Untersuchungen zur Wechselwirkung von Spurenelementen und Nrf2 sollten aber auch nutritive Veränderungen einzelner Spurenelemente auf den Versorgungsstatus anderer Spurenelemente untersucht werden. Die Spurenelementversorgung mit Selen steht in Deutschland besonders im Fokus, da die Selenzufuhr aufgrund von niedrigen Selengehalten im Boden als defizient eingestuft wird. Um den Einfluss des Selenstatus auf die Homöostase des Kupfer-, Zink- und Eisenhaushaltes zu untersuchen und mögliche Interaktionen zu charakterisieren, sollte der Selenstatus bei Mäusen moduliert werden (**Kapitel 4.1**). Hierfür wurden Mäuse defizient (0,03 ppm), adäquat (0,15 ppm) oder supplementiert (0,6 ppm) mit Selen gefüttert.

Da Selen und Kupfer in verschiedenen Lebensphasen oder bei Erkrankungen gegenläufig reguliert sind, sollte in einer weiteren Fütterungsstudie nicht nur die Selen-, sondern auch die Kupferzufuhr moduliert werden. Zur genaueren Untersuchung möglicher Interaktionen sollten zudem *in vitro*-Versuche in der Zellkultur durchgeführt werden.

3 Übersicht zu den Manuskripten

3.1 Manuskript 1 (veröffentlicht)

Crosstalk of Nrf2 with the Trace Elements Selenium, Iron, Zinc, and Copper

Schwarz M*, Lossow K*, Kopp JF, Schwerdtle T, Kipp AP

Nutrients 2019 Sep 5;11(9):2112.

doi: 10.3390/nu11092112

Publiziert am 05.09.2019

*geteilte Erstautorenschaft

Zusammenfassung:

Diese Studie untersuchte den Einfluss eines Nrf2-KOs auf die Homöostase der essentiellen Spurenelemente Selen, Kupfer, Zink und Eisen und konnte zeigen, dass die Homöostase von Selen, Kupfer und Zink nur geringfügig durch Nrf2 moduliert wurde, während die Eisenhomöostase am stärksten reguliert war. Da eine marginale Selendefizienz in Deutschland von Relevanz ist und unter diesen Bedingungen eine Nrf2-Aktivierung auftreten kann, sollte außerdem die Auswirkung eines veränderten Selenstatus auf die Homöostase von Kupfer, Zink und Eisen untersucht werden. Sowohl Nrf2 als auch eine Selendefizienz konnte die Homöostase von Kupfer, Zink und Eisen nur wenig beeinflussen.

3.2 Manuskript 2 (veröffentlicht)

Copper interferes with Selenoprotein synthesis and activity

Schwarz M, Lossow K, Schirl K, Hackler J, Renko K, Kopp JF, Schwerdtle T, Schomburg L, Kipp AP

Redox Biology 37 (2020) 101746

doi: 10.1016/j.redox.2020.101746

Publiziert am 07.10.2020

Zusammenfassung:

In dieser Studie wurden die Interaktionen zwischen Selen und Kupfer anhand einer Mausfütterungsstudie und von *in vitro*-Versuchen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Kupfer die Selenhomöostase insbesondere auf Ebene der Enzymaktivität von Selenoproteinen hauptsächlich *in vitro* unter leicht supplementierten Bedingungen beeinträchtigt, während der Einfluss *in vivo* aufgrund von nur marginalen Veränderungen im Kupfergehalt von Leber und Darm geringer ausfiel. Diese Ergebnisse werden vor dem Hintergrund wichtig, dass beispielsweise während des Alterns oder bei verschiedenen Erkrankungen die Selenkonzentration vermindert und die Kupferkonzentration gesteigert ist, und somit eine weitere Einschränkung der Selenhomöostase weitreichende Folgen haben kann.

3.3 Manuskript 3 (veröffentlicht)

N-Acetylcysteine as Modulator of the Essential Trace Elements Copper and Zinc

Wolfram T*, **Schwarz M***, Reuß M, Lossow K, Ost M, Klaus S, Schwerdtle T, Kipp AP

Antioxidants 2020, 9(11), 1117

doi: 10.3390/antiox9111117

Publiziert am 12.11.2020

*geteilte Erstautorenschaft

Zusammenfassung:

In dieser Originalarbeit wurden einerseits die Interaktionen von Kupfer und Zink und deren Einfluss auf Nrf2 nach einer Kurzzeitbehandlung mit beiden Spurenelementen *in vitro* untersucht und andererseits der Einfluss einer Kurz- und Langzeitbehandlung mit N-Acetylcystein auf die Spurenelementhomöostase und den Redoxstatus *in vitro* und *in vivo* betrachtet. Während die gegenseitige Beeinflussung der intrazellulären Kupfer- und Zinkgehalte und deren Einfluss auf den Redoxstatus *in vitro* nach einer Kurzzeitbehandlung zelltypspezifisch war, konnte N-Acetylcystein durch Chelatierung der beiden Spurenelemente deren intrazellulären Konzentration verringern und die Zink-induzierten Effekte auf Nrf2 und MTF1 rückgängig machen. Für Kupfer und Zink sind diese Interaktionen vor allem vor dem Hintergrund der Therapie eines Morbus Wilson untersucht, während die Interaktionen in Bezug auf die Redoxhomöostase weitgehend unklar sind.

4 Manuskripte

4.1 Crosstalk of Nrf2 with the Trace Elements Selenium, Iron, Zinc, and Copper

Manuskript Nr. 1

Autoren: Maria Schwarz, Kristina, Lossow, Johannes F. Kopp, Tanja Schwerdtle, Anna P. Kipp

Bibliographische Informationen:

Schwarz, M., K. Lossow, J. F. Kopp, T. Schwerdtle and A. P. Kipp (2019). "Crosstalk of Nrf2 with the Trace Elements Selenium, Iron, Zinc, and Copper." Nutrients **11**(9).

Der Kandidat / Die Kandidatin ist (bitte ankreuzen)

Erstautor/-in, Ko-Erstautor/-in, Korresp. Autor/-in, Koautor/-in.

Status: publiziert

Anteile (in %) der Autoren / der Autorinnen an der Publikation (anzugeben ab 20%)

Autor/-in	Konzeptionell	Datenanalyse	Experimentell	Verfassen des Manuskriptes	Bereitstellung von Material
Schwarz, M		50	40	25	
Loßow, K		30	35	25	
Kopp, JF			20		
Schwerdtle, T					
Kipp, AP	90	20		40	



Article

Crosstalk of Nrf2 with the Trace Elements Selenium, Iron, Zinc, and Copper

Maria Schwarz ^{1,2,†} , Kristina Lossow ^{1,2,3,4,†} , Johannes F. Kopp ^{2,4} , Tanja Schwerdtle ^{2,4} and Anna P. Kipp ^{1,2,*}

¹ Department of Molecular Nutritional Physiology, Institute of Nutritional Sciences, Friedrich Schiller University Jena, Dornburger Str. 24, 07743 Jena, Germany

² TraceAge-DFG Research Unit on Interactions of Essential Trace Elements in Healthy and Diseased Elderly, D-13353 Potsdam-Berlin-Jena, Germany

³ German Institute of Human Nutrition, Arthur-Scheunert-Allee 114-116, 14558 Nuthetal, Germany

⁴ Department of Food Chemistry, Institute of Nutritional Science, University of Potsdam, Arthur-Scheunert-Allee 114-116, 14558 Nuthetal, Germany

* Correspondence: anna.kipp@uni-jena.de; Tel.: +49-3641-949609

† These authors equally contributed to the manuscript.

Received: 10 July 2019; Accepted: 23 August 2019; Published: 5 September 2019



Abstract: Trace elements, like Cu, Zn, Fe, or Se, are important for the proper functioning of antioxidant enzymes. However, in excessive amounts, they can also act as pro-oxidants. Accordingly, trace elements influence redox-modulated signaling pathways, such as the Nrf2 pathway. Vice versa, Nrf2 target genes belong to the group of transport and metal binding proteins. In order to investigate whether Nrf2 directly regulates the systemic trace element status, we used mice to study the effect of a constitutive, whole-body Nrf2 knockout on the systemic status of Cu, Zn, Fe, and Se. As the loss of selenoproteins under Se-deprived conditions has been described to further enhance Nrf2 activity, we additionally analyzed the combination of Nrf2 knockout with feeding diets that provide either suboptimal, adequate, or supplemented amounts of Se. Experiments revealed that the Nrf2 knockout partially affected the trace element concentrations of Cu, Zn, Fe, or Se in the intestine, liver, and/or plasma. However, aside from Fe, the other three trace elements were only marginally modulated in an Nrf2-dependent manner. Selenium deficiency mainly resulted in increased plasma Zn levels. One putative mediator could be the metal regulatory transcription factor 1, which was up-regulated with an increasing Se supply and downregulated in Se-supplemented Nrf2 knockout mice.

Keywords: Nrf2; selenium; iron; copper; zinc; homeostasis

1. Introduction

Essential trace elements (TEs) are micronutrients with indispensable roles in enzymatic reactions, which consequently modify signaling pathways. The effects of TEs are mostly attributed to their redox-modulatory properties. TEs, such as Cu, Zn, and Fe but also Se, can act as pro-oxidants if present in excess or if available as free unbound ions. Otherwise, antioxidant and protective enzymes, such as the selenoproteins, glutathione peroxidases (GPX) and thioredoxin reductases (TXNRD) and also Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1), catalase, and metallothioneins (MT), depend on the supply with specific TEs. Via both ways, TEs have the potential to influence redox-modulated signaling pathways. Until now, many transcription factors have been shown to be sensitive towards the cellular redox status. Among them, nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2 (Nrf2) is a better characterized one [1].

Under basal conditions the transcription factor Nrf2 is kept in the cytosol by its binding partner, Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), which is anchored to the actin cytoskeleton and acts

as a scaffold for the cullin3-dependent E3 ubiquitin ligase complex. After poly-ubiquitination, Nrf2 is degraded via the proteasome. There are several ways to induce the nuclear translocation and DNA binding of Nrf2. Of those, the best understood mechanism is the redox-dependent modification of thiol groups in the Keap1 protein, which results in a conformational change locking Nrf2 at Keap1. Newly synthesized Nrf2 can no longer be degraded and translocates to the nucleus. Besides Keap1, caveolin 1, the ubiquitin ligase Skp, cullin, F-box containing complex (SCF), and the retinoid X receptor α (RXR α) also interact with and repress Nrf2. Nrf2 target genes contain so-called antioxidant-responsive elements (ARE) within their promoter regions (reviewed in [2]). The list of Nrf2-regulated genes is further increasing continuously and comprises genes involved in antioxidant defense, NADPH regeneration, glutathione synthesis, and drug detoxification, as well as in metabolic control, including carbohydrate and lipid metabolism [3]. Nrf2 has previously been shown to be modulated by changes in the cellular status of single TEs, e.g., Zn. Zn binding triggers a conformational switch in the cullin3 substrate adaptor function of Keap1, thus Nrf2 becomes stabilized and can activate the transcription of target genes [4]. Furthermore, Zn modulates the activity of several kinases and phosphatases, which accordingly enhances Nrf2 activity (Table 1).

Vice versa, Nrf2 target genes belong to the group of selenoproteins or are involved in regulating the systemic TE status (Table 1). This has already been studied for Fe [3]. In mice, Nrf2 is activated in response to increased hepatic Fe levels [5]. Accordingly, Nrf2 protects the murine liver against the toxicity of dietary Fe overload by preventing cell death of hepatocytes and enhancing Fe release [6]. During inflammation, Nrf2 induces ferroportin (Fpn1), the sole Fe exporter, to enhance Fe efflux from macrophages or enterocytes [7]. Several Fe transport and binding proteins, like Fpn1, hepcidin (Hamp), and ferritin, are Nrf2 target genes [8]. In addition, key enzymes of heme biosynthesis are induced via Nrf2 (Table 1). Altogether, this battery of proteins reduces the pool of free intracellular Fe. A comparable approach is the upregulation of MTs, a family of cysteine-rich proteins that bind Zn and Cu via their thiol groups [9]. Another important mediator of Cu homeostasis is the Cu-transporting ATPase 2 (Atp7b), the Wilson's ATPase. Being primarily expressed in hepatocytes, Atp7b supports the incorporation of Cu into ceruloplasmin (Cp) and enhances the excretion of Cu from the liver into the bile [10,11].

Table 1. Effects of single trace elements on Nrf2 signaling (overview in [12]).

TE	Nrf2 Pathway Activity	TE-Related Nrf2 Target Genes
Cu	CuCl ₂ activates Nrf2; Nrf2 is crucial for MRE/ARE-mediated transcription in response to Cu [13]	MT1/2, SOD1
Fe	cytotoxic concentrations of Fe activate Nrf2 in murine primary astrocytes [14] and hepatocytes [6]	Fpn1, heme oxygenase (Hmox1) [15], Hamp, ferritin (FTH-1, FTL) [16], heme transporter (Slc48a1/HRG1), ferrochelatase (Fech), biliverdin reductases (BlvrA/B)
Se	a suboptimal Se status activates Nrf2 in mice [17]; high selenite concentrations enhance Nrf2 target gene expression [18]	GPX2 [19], TXNRD1 [20]
Zn	Zn upregulates Nrf2 function, e.g., via phosphorylation signals [21]	MT1/2, SOD1

There is substantial cross-talk between Nrf2 and other transcription factors, including the aryl hydrocarbon receptor (AhR), nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), tumor suppressor protein p53, and Notch making Nrf2, an important factor in regulating immune defense, differentiation, and tissue regeneration, as well as cell death [22]. Another interesting interaction could take place with the metal regulatory transcription factor 1 (MTF1), which senses Cu and Zn and binds to metal-responsive elements (MREs) in the promoter of target genes. These include

the zinc transporter solute carrier family 30 member 1 Slc30A1, encoding for ZnT1, as well as MT1 and 2, but also selenoproteins, like Selenoh, Selenow, and TXNRD2, modulators of the Fe status, like Fpn1 and Hamp [23], and Atp7b [24]. In particular, MT genes often contain AREs next to MREs and are activated via Nrf family members. For MT1, this activation has been shown by Nrf1 as well as by Nrf2, especially in response to the cellular Zn status, albeit to a smaller extent [25]. Thus, MTF1 could be a potential link between Nrf2 signaling and regulation of TE homeostasis.

In most previous studies, the authors focused on high concentrations and pro-oxidant effects of overloading single TEs, e.g., Se. However, we have previously shown that Nrf2 becomes activated under conditions of a suboptimal Se status in the duodenum [17] and liver [26] of mice. NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1) activity was analyzed as one of the most strongly regulated target genes of Nrf2. Most probably, the Nrf2 activation is an attempt to compensate for the reduced expression of antioxidant selenoproteins. This condition has a much higher physiological relevance than Se supplementation because of the suboptimal nutritional Se supply prevailing in Europe [27]. The U-shaped effect on Nrf2 activity observed for Se could also be true for other TEs; however, this has not been studied systematically so far.

Based on the results obtained for single TEs, we aimed to study the effect of a whole-body Nrf2 knockout (KO) in mice on the systemic TE status of Fe, Se, Cu, and Zn. A suboptimal Se status results in limited expression of Se-sensitive selenoproteins. As reduced expression of selenoproteins, such as TXNRD1, under Se-deprived conditions further enhances Nrf2 activity [28], we also studied the combination of Nrf2 KO mice with feeding diets that provide either a suboptimal, adequate, or supplemented amount of Se. Focusing only on wild type (WT) mice with different Se statuses allowed the question of whether changes in a single TE (in this case Se) affect the homeostasis of three other TEs to be addressed. In addition to markers for the TE status, TE-related Nrf2 target genes were analyzed in the liver of those mice.

2. Materials and Methods

2.1. Animal Experiment

Animal experiments were approved by the ethics committee of the Ministry of Agriculture and Environment (State Brandenburg, Germany) and all methods were carried out in accordance to permission number V3-2437-29-2012. Nrf2 KO mice on a C57BL/6J background were kindly provided by Masayuki Yamamoto (Tohoku University Graduate School of Medicine) and genotyped as previously described [29]. Adult male and female mice were used for the animal experiments that were group-housed and random-caged with ad libitum access to a standard chow diet (Ssniff, Soest, Germany, Table 2), with an Se content of 0.3 mg/kg diet, deionized water, 23 °C, and a 12:12 h dark:light cycle. Those mice were sacrificed at an age of 6 months.

Table 2. Estimated trace element requirements of mice [30] and trace elements in the diets used.

TE	Requirement (mg/kg)	Chow (Ssniff) (mg/kg)	Altromin C1045 (mg/kg)
Cu	6	8.8	2.7
Fe	35	215	151
Se	0.15	0.3	0.03
Zn	10	97	57

In the second experiment, male WT and Nrf2 KO mice were weaned onto a diet based on torula yeast (Altromin C1045; Lage, Germany, Table 2) with a low basal selenium content of 0.03 mg/kg. For the selenium adequate (+Se) and the supplemented (++)Se diets, the basal chow was enriched with L (+)-selenomethionine (Fisher Scientific, Schwerte, Germany) to a final selenium content of 0.15 or 0.6 mg/kg, respectively. The Se, Fe, Cu, and Zn concentration of the diets was measured by

ICP-MS/MS. Diets were fed for 6 weeks until an age of 10 weeks before mice were anesthetized by isoflurane (Abbot, Wiesbaden, Germany), and blood was withdrawn by heart puncture. Plasma was obtained after centrifugation of the blood for 15 min ($1200\times g$ and $4\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2.2. ICP-MS/MS Analysis of TE

Frozen tissue (liver or duodenum) was pulverized using a TissueLyser (Qiagen, Hilden, Germany) for 2×30 s at maximum speed. Feed samples were pulverized by mortar and pestle. About 50 mg of each sample were weighed precisely into polytetrafluoroethylene (PTFE) microwave vessels. For mouse tissue, the variance was found to be far below 5% between replicates of the same mouse (data not shown); therefore, only one replicate was analyzed to preserve tissue for other experiments. However, in the case of obvious outliers, the sample was digested and analyzed again. Due to high in-batch variance in the chow diets from some manufacturers, at least three independent replicates were prepared in the case of feed samples. For tissue samples, 1000 μL of concentrated HNO_3 (65%, suprapure, Merck, Darmstadt, Germany), 50 μL of a solution containing 100 μg Rh/L (made from 10 mg/L single-element stock solution, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) as the internal standard, and 950 μL ultrapure water were added. For feed samples, 900 μL of concentrated HNO_3 , 250 μL of H_2O_2 (30%, Merck/Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), and 810 μL of ultrapure water were added. In addition, 20 μL of a solution containing 1000 μg Rh/L and 20 μL of 10,000 μg ^{77}Se /L (made from a 10,000 mg/L stock solution, prepared from isotopically enriched ^{77}Se ($97.20 \pm 0.20\%$ ^{77}Se ; 0.10% ^{74}Se ; $0.40 \pm 0.10\%$ ^{76}Se ; $2.40 \pm 0.10\%$ ^{78}Se ; 0.10% ^{80}Se ; 0.10% ^{82}Se as certified by Trace Sciences International, ON, Canada), purchased from Eurisotop SAS (Saarbrücken, Germany), were added as internal standard or isotope dilution standard, respectively. The samples were then digested in a Mars 6 microwave digestion system (CEM, Kamp-Lintfort, Germany) by heating to $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ over a period of 10 min and holding this temperature for 20 min. In each digestion, two blank samples and 50 mg of certified reference material ERM-BB 422 (fish muscle) or ERM BB 186 (pig kidney, Merck/Sigma-Aldrich) were carried along to ensure accuracy of results. Samples were repeated if the recovery for any analyzed element deviated by more than 10% from the reference value and/or was outside the error range of the material. After digestion, samples were quantitatively transferred to 15-mL polypropylene tubes combined with two times 475 μL (tissue) or 1 mL (feed) of ultrapure water from vessel rinsing. The samples were kept at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ until one day prior to measurement, when they were further diluted 1 + 4 in 15-mL polypropylene tubes to give a final concentration of 2.93% HNO_3 , as well as either 2.5 μg Rh/L (tissue) or 1 μg Rh/L and 10 μg ^{77}Se /L (feed). Mixed-element calibration standards were made to match the concentration of HNO_3 and the internal standard in the diluted digests from 1000 mg/L single-element stock solutions (Carl Roth). Calibration ranges were Fe: 5–1000 $\mu\text{g}/\text{L}$, Cu: 0.5–100 $\mu\text{g}/\text{L}$, Zn: 2.5–500 $\mu\text{g}/\text{L}$, Se: 0.05–10 $\mu\text{g}/\text{L}$. For Se isotope dilution analysis (IDA), a solution containing 10 μg ^{77}Se /L, as well as a 1 + 1 mixture of 10 μg ^{77}Se /L and 10 μg naturally distributed Se/L was prepared. Solutions were then analyzed via ICP-MS/MS (8800 ICP-QQQ-MS, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany at 1550 W plasma Rf power, equipped with Ni-cones, MicroMist nebulizer at 1.2 L Ar/min and Scott-type spraychamber) monitoring the following mass to charge ratios (Q1→Q2): He-mode: Fe (56→56), Cu (63→63), Zn (66→66), Rh (103→103); O2-mode: Se (77→93), Se (80→96), Rh (103→103). Elements in He-mode were determined via external calibration after internal standard correction using Rh and Se was also determined either via external calibration (tissue) or via isotope dilution analysis (IDA) (feed) as described previously [31]. The instrument was optimized on a daily basis for maximum sensitivity across the relevant mass range (He: Co (59→59), Y (89→89), Tl (205→205); O2: Co (59→59), Y (89→95), Tl (205→205)), an oxide ratio of $<1.5\%$ ($^{156}\text{CeO}^+ / ^{140}\text{Ce}^+$), and a doubly charged ratio of $<2\%$ ($^{140}\text{Ce}^{2+} / ^{140}\text{Ce}^+$), as well as a background of <0.1 CPS prior to measurement.

The applied method for the analysis of TEs in murine plasma has been described previously [32]. In brief, 50 μL of murine plasma were diluted 1 + 9 with a dilution mix (5 vol.-% butanol (99%, Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany), 0.05 m.-% Na-EDTA (Titriplex® III, pro analysis, Merck), 0.05 vol.-% Triton™ X-100 (Merck Sigma-Aldrich), and 0.25 vol.-% ammonium hydroxide (puriss. p.a. plus, 25% in

water, Fluka, Buchs, Germany)), as well as internal standards (final concentrations: 1 µg Rh/L and 30 µg ⁷⁷Se/L). The diluted sample was then subjected to analysis for Fe, Cu, Zn, and Se (IDA) via ICP MS/MS.

2.3. RNA Isolation, Reverse Transcription, and Quantitative Real-Time PCR

The mRNA was isolated from frozen and pulverized (TissueLyser; Qiagen) tissues with the Dynabeads mRNA DIRECT Kit (Life Technologies, Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription (RT) was performed with 150 ng mRNA, 0.15 pmol oligo(dT)15 primers, 1× RT buffer, 700 µM dNTPs, 0.1 mg/mL BSA, 30 U RNasin® (Promega, Mannheim, Germany), and 180 U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT, Promega) in a total volume of 45 µL. Real-time PCR was performed in a total volume of 25 µL with 1 µL of 1 + 9 diluted cDNA measured in triplicates using a Mx3005P QPCR System (Agilent). SYBR Green I (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) served as the fluorescent reporter. The annealing temperature was 60 °C for all PCR reactions and specificity was confirmed by a melting curve analysis. All PCR products were quantified with a standard curve to correct for differences in PCR efficiencies. Primer sequences (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) are listed in Table 3. A normalization factor was calculated from the two reference genes, *Epcam* and *Rpl13a*, and used for normalization.

Table 3. Primer sequences (5'→3').

Gene	RefSeq-ID	Sequence
Atp7b, ATPase copper transporting beta	NM_007511.2	CAGATGTCAAAGGCTCCCATTTCAG CCAATGACGATCCACACCACC
Cp, ceruloplasmin	NM_001276248.1	GTAATACTCTGGCGTTGACCC TTGTCTACATCTTTCTGTCTCCA
DMT1, divalent metal transporter 1	NM_001146161.1	CTCAGCCATCGCCATCAATCTC TTCCGCAAGCCATATTTGTCCA
Epcam, epithelial cell adhesion molecule	NM_008532.2	TCATCGCTGTCATTGTGGTGGT TCACCCATCTCCTTTATCTCAGCC
Fpn1, ferroportin	NM_016917.2	CTGGTGGTTCAGAATGTGTCCGT AGCAGACAGTAAGGACCCATCCA
Fth1, ferritin heavy polypeptide 1	NM_010239.2	CGCCAGAACTACCACCAGGA TTCTTCAGAGCCACATCATCTCGG
Hamp, hepcidin	NM_032541.1	AAGCAGGGCAGACATTGCGA TGCAACAGATACCACACTGGGA
MT2, metallothionein 2	NM_008630.2	CTGTGCCTCCGATGGATCCT CTTGTCGGAAGCCTCTTTGCAG
NQO1, NAD(P)H quinone dehydrogenase 1	NM_008706.4	ATGTACGACAACGGTCCTTTCCAG GATGCCACTCTGAATCGGCCA
Rpl13a, ribosomal protein L13a	NM_009438.5	GTTCGGCTGAAGCCTACCAG TTCCGTAACCTCAAGATCTGCT
Selenow, selenoprotein W	NM_009156.2	ATGCCTGGACATTTGTGGCGA GCAGCTTTGATGGCGGTAC
Tfrc, transferrin receptor	NM_011638.4	GGCTGAAACGGAGGAGACAGA CTGGCTCAGCTGTGATGGT
Zip14, solute carrier family 39 member 14	NM_001135151.1	GCCTCACCATCCTGGTATCCGT AGCAGACGAGGCATGAGTCTGG

2.4. ELISA

Ferritin and transferrin were measured in plasma samples using Mouse Ferritin and Transferrin ELISA (ALPCO, Salem, MA, USA) following the manufacturer's instruction. Therefore, plasma samples were either diluted 1:20 or 1:200,000, respectively.

2.5. Western Blot

To obtain protein lysates, frozen liver samples were homogenized in Tris buffer (100 mM Tris, 300 mM KCl, pH 7.6 with 0.1% Triton X-100 (Serva, Heidelberg, Germany)) using a TissueLyser (Qiagen) for 2×30 s at maximum speed. Cellular debris was removed by centrifugation ($14,000 \times g$, 15 min, 4°C) and protein concentrations were determined by Bradford analysis (Biorad, München, Germany). After SDS polyacrylamide gel electrophoresis, gels were immunoblotted to nitrocellulose and blots were blocked in 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 at room temperature for 1 h. The following antibodies were used: Rabbit anti-Ferritin-H (151023, Abcam, Cambridge, UK; 1:500), rabbit anti-MT (192385, Abcam; 1:1000), rabbit anti-Ctr1 (129067, Abcam; 1:2000), rabbit anti-MTF-1 antibody (86380, Novus Biologicals, Centennials, US; 1:250), and rabbit anti- β -Actin (8227, Abcam; 1:10,000). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Chemicon, Hofheim, Germany; 1:50,000) served as secondary antibody. Intensities of identified bands were quantified densitometrically with the Luminescent Image Analyzer LAS-3000 system (Fujifilm, Tokyo, Japan). Protein expression was normalized to β -actin expression or Ponceau staining.

2.6. Enzyme Activities

Protein lysates were prepared as described in the section 'Western Blot'. Measurements of NQO1 [17], TXNRD [33], GPX [34], and glutathione S transferase (GST) [35] activities have been described previously. Briefly, NQO1 activity was examined by a menadione-mediated reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). TXNRD activity was measured by the NADPH-dependent reduction of 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB). GPX activity was determined in an NADPH-consuming glutathione reductase coupled assay. GST activity was conducted using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate in the presence of reduced glutathione. All measurements were performed in triplicates using 96-well plates and a microplate reader (Synergy2, BioTek, Bad Friedrichshall, Germany).

2.7. Statistics

Data are shown as mean + SD. Statistical significance was calculated by GraphPad Prism version 5 (San Diego, CA, USA) using two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's post-test as indicated in the figure legends. A *p*-value below 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

To address the question of whether Nrf2 not only modulates the status of single TEs, such as Fe, but also of several TEs in parallel, we analyzed Se, Fe, Cu, and Zn in male and female Nrf2 KO mice fed a standard chow diet. TE concentrations were assessed in the intestine, liver, and plasma. Fe was retained more in the liver and small intestine of Nrf2 KO than in WT mice (Figure 1A,B). Consequently, plasma Fe levels were reduced but only in female mice (Figure 1C).

No changes were observed concerning the Fe markers, ferritin and transferrin (Figure S1A,B). In parallel, intestinal Se (Figure 1D) and Zn (Figure 1G) concentrations were reduced in Nrf2 KO compared to WT mice. This was also partially reflected in the Se and Zn plasma and liver values but less consistently. Nrf2-mediated changes of the Cu status appear to be sex specific as only female mice showed lower plasma Cu levels upon loss of Nrf2 (Figure 1L). Overall, Nrf2 reduced the systemic Fe status but increased Se and Zn. Female WT mice had higher plasma levels of Fe, Zn, and Cu. In the liver, amounts of Fe and Se were increased in female mice. In general, chow diets contain high amounts of all TEs, usually at least twice the recommended amounts. Thus, Nrf2-modulated effects might be more pronounced under conditions of limited TE access.

To analyze the role of the Se status on other TEs in combination with loss of Nrf2, both WT and Nrf2 KO mice were weaned onto one of three diets containing suboptimal (0.03 ppm), adequate (0.15 ppm), or supplemented (0.6 ppm) amounts of Se. The experimental set-up was chosen according to previous

feeding experiments to efficiently reduce the Se status in the -Se group. For better comparability with previous experiments, only male mice were studied [17]. In addition, the remaining three TEs were reduced in the torula yeast-based diet as compared to the chow diet (Table 2).

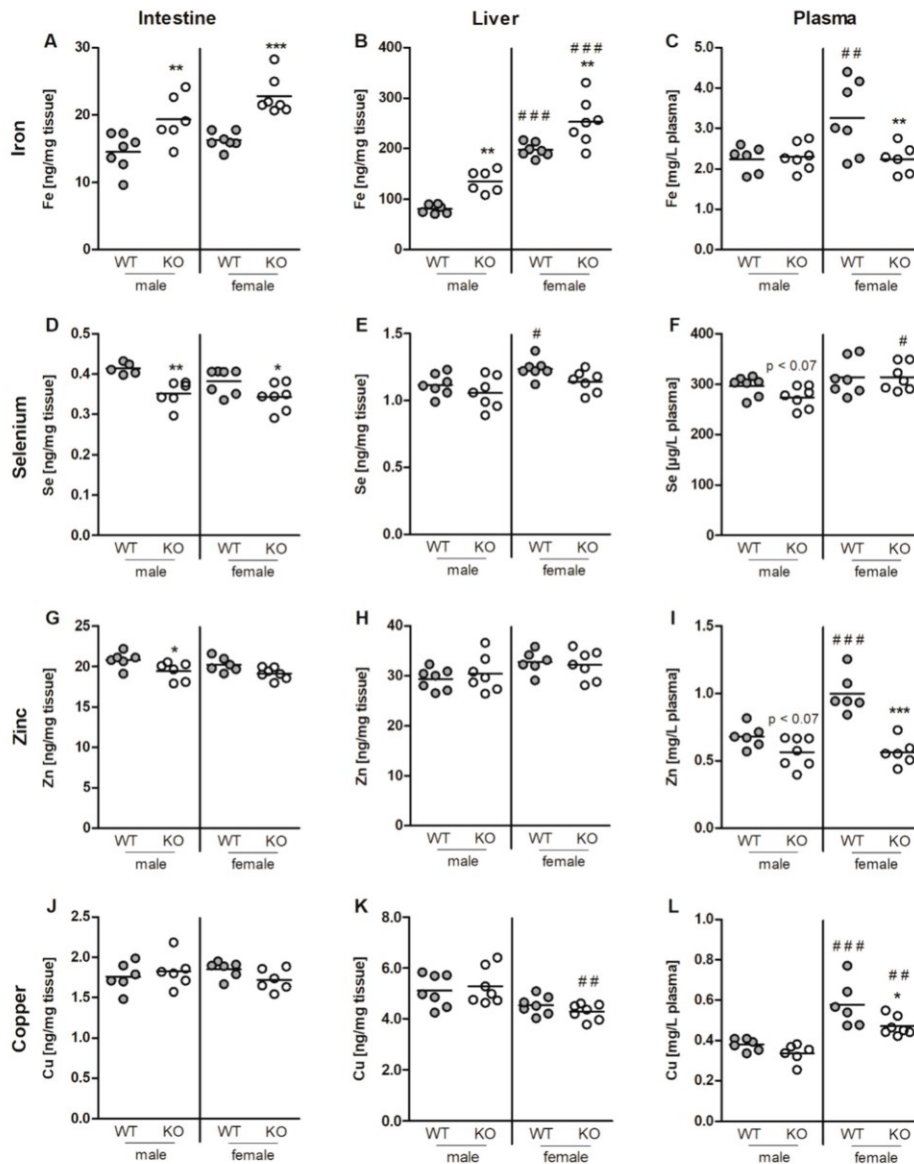


Figure 1. Fe (A–C), Se (D–F), Zn (G–I), and Cu (J–L) concentrations in the jejunum (A,D,G,J), liver (B,E,H,K), and plasma (C,F,I,L) of six-month-old male and female Nrf2 KO and WT mice fed a standard chow diet with 0.3 ppm Se. The TE profile was analyzed using ICP-MS/MS. Scatter dot plots with mean ($n = 6-7$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. WT and # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ vs. male (two-way ANOVA with Bonferroni's post-test).

As expected, the dietary approach successfully modulated the Se status of the different feeding groups (Figure 2A,B). The Se content of the chow diet fed in experiment one was 0.3 ppm and thus between the amount of the +Se (0.15 ppm) and the ++Se (0.6 ppm) diets. Comparing the plasma Se content in both experiments (Figures 1F and 2A) revealed that the +Se diet with 0.15 ppm was

already able to set the plasma Se concentration to almost 300 $\mu\text{g/L}$, which was nearly the same amount as measured in the 0.3 (Figure 1F) or 0.6 ppm Se groups (+Se, Figure 2A).

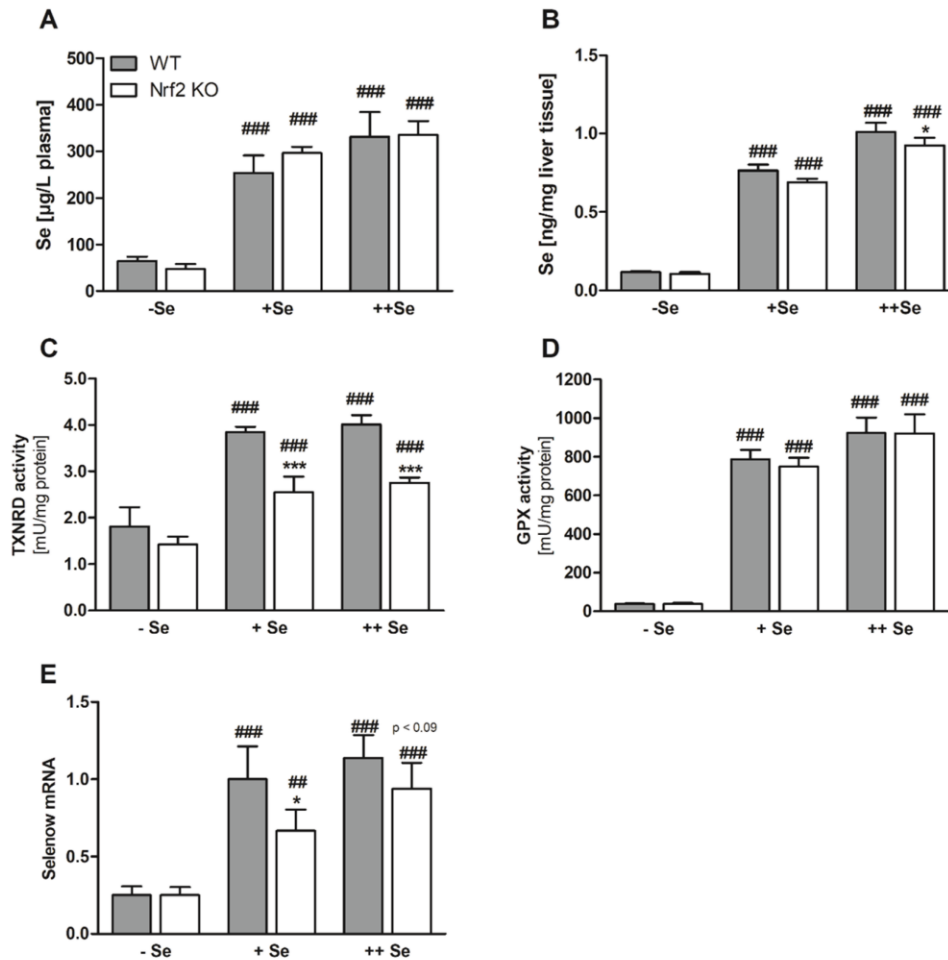


Figure 2. Biomarkers of the Se status. Se concentrations in the plasma (A) and liver (B) of Nrf2 KO and WT male mice fed diets with defined Se contents (–Se: 0.03 ppm; +Se: 0.15 ppm; ++Se: 0.6 ppm). The TE profile was analyzed using ICP-MS/MS. Enzyme activity of TXNRD (C) and GPX (D) was analyzed together with mRNA expression of Selenow (E) from liver samples of male Nrf2 KO and WT mice. Bars represent means + SD ($n = 4-5$). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ vs. WT and ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ vs. –Se (two-way ANOVA with Bonferroni’s post-test).

In order to confirm that loss of Nrf2 resulted in diminished expression of classical Nrf2 target genes, NQO1 activity (Figure 3A) was analyzed. Enzyme activity was substantially decreased in Nrf2 KO mice. Basal NQO1 mRNA levels were much higher in female than in male mice (Figure S1C). To our surprise, NQO1 activity was not increased under –Se conditions but was significantly decreased in comparison to the +Se or ++Se groups. In Nrf2 KO mice, no Se-dependent effect was detectable. Comparable results were obtained for total GST activity (Figure 3B).

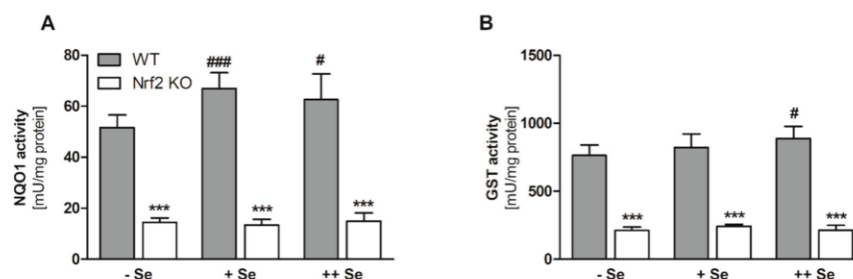


Figure 3. Hepatic enzyme activities as markers for Nrf2 activity. The Nrf2 target gene *NQO1* was measured by an activity assay (A). Total enzyme activity of all GST isoforms was measured by an activity assay (B). Samples were the liver of Nrf2 KO and WT male mice fed diets with defined Se contents (-Se: 0.03 ppm; +Se: 0.15 ppm; ++Se: 0.6 ppm). Bars represent means + SD ($n = 4-5$). *** $p < 0.001$ vs. WT and # $p < 0.05$; ### $p < 0.001$ vs. -Se (two-way ANOVA with Bonferroni's post-test).

Besides Nrf2 target genes, selenoprotein expression was also studied. Classical biomarkers of the murine Se status, such as TXNRD and GPX activity, already reached a plateau in the +Se groups and could not be further increased by the ++Se supply (Figure 2C,D). Total TXNRD activity was reduced in Nrf2 KO mice, because TXNRD1 expression is regulated via Nrf2 (Figure 2C). Total hepatic GPX activity, mainly reflecting GPX1 activity, was not affected by the loss of Nrf2 (Figure 2D). Under certain conditions, selenoprotein mRNAs could also serve as biomarkers of the Se status, which is the case for Selenow, showing a four-fold increase in the Se-treated groups in comparison to the -Se group (Figure 2E). Under +Se conditions, Selenow expression was significantly lower in Nrf2 KO than in WT mice and in the ++Se groups there was a trend ($p < 0.09$; Figure 2E). Together with a small reduction of the hepatic Se content, this might indicate that the Se status is lower in Nrf2 KO than in WT mice.

As shown before (Figure 1C and Figure S1A,B), Fe, ferritin, and transferrin plasma levels were unaffected by Nrf2 in male mice (Figure 4A-C). In addition, all three parameters were independent of the Se status. The increased Fe tissue retention described under chow diet conditions (Figure 1) was only significant under -Se conditions in the liver in this case (Figure 4D). To study putative mechanisms for the observed Fe accumulation in the liver, the expression of different Fe-related genes/proteins were tested.

First, we tested Hamp expression in the liver, because Hamp is the major regulator of Fe homeostasis, which is upregulated in response to an increase in Fe levels. Recently, it has been shown that this upregulation is partially impaired in Nrf2 KO livers [36]. Herein, we could not observe an upregulation in -Se Nrf2 KO livers (Figure 4E). Hamp is known to limit the expression of the Fe exporter Fpn1 in the intestine to reduce systemic Fe levels. Indeed, Fpn1 expression was reduced in the duodenum of both -Se and ++Se Nrf2 KO mice (Figure 4F). Under physiological conditions, Fe is transported in the plasma bound to transferrin, which is taken up by the hepatocytes by binding to the transferrin receptor (TfR). The mRNA expression of TfR was only upregulated in the -Se Nrf2 KO mice (Figure 4G) together with expression levels of the Fe transporter DMT1 (Figure 4H), which is consistent with higher Fe levels in the liver. In the plasma, ferrous Fe is immediately oxidized to ferric Fe by Cu-dependent Cp, and then bound to transferrin. Also, Cp was upregulated in the -Se Nrf2 KO group (Figure 4I). Cp is an acute phase protein, which is known to be sensitive towards inflammation. However, no increase in hepatic inflammatory cells has been detected in Nrf2 KO mice previously [37]. Intracellularly, Fe is efficiently bound to ferritin. The subunit ferritin H (FTH) is regulated by Nrf2 [16]. Herein, mRNA of FTH was only reduced under +Se and ++Se conditions (Figure 4J). However, ferritin H protein levels were almost undetectable also in -Se Nrf2 KO mice (Figure 4K,L). In addition, ferritin H protein was upregulated under -Se conditions in WT mice in comparison to +Se WT mice.

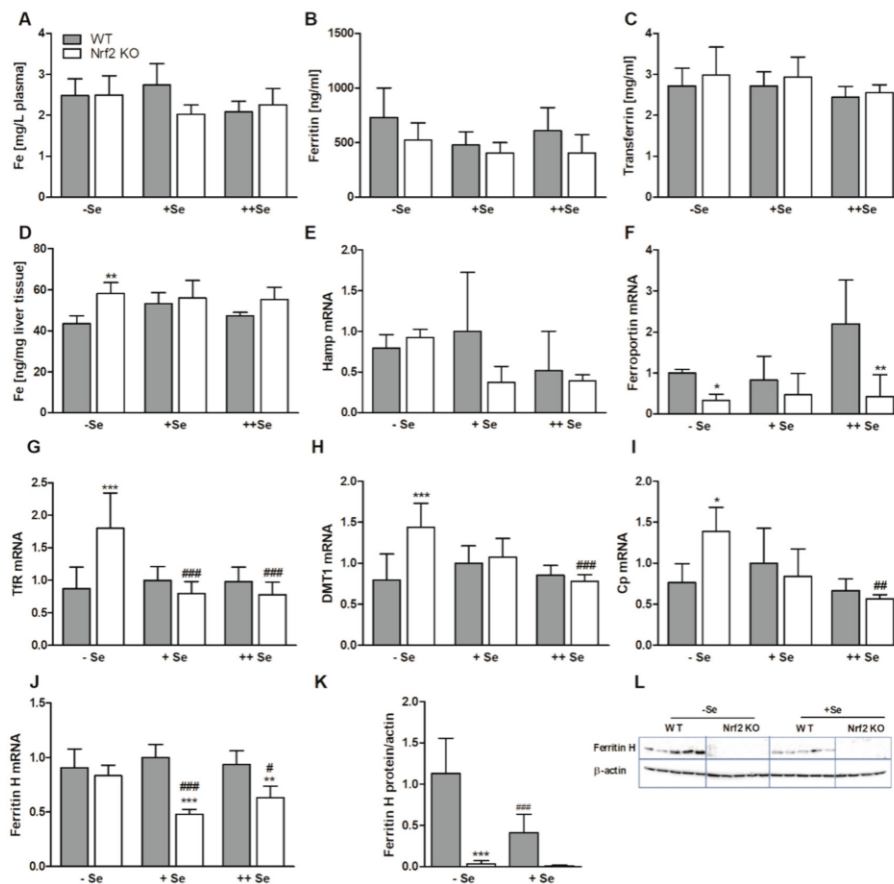


Figure 4. Biomarkers of the Fe status. Fe (A), ferritin (B), and transferrin (C) concentrations in the plasma of male Nrf2 KO and WT mice fed diets with defined Se contents (–Se: 0.03 ppm; +Se: 0.15 ppm; ++Se: 0.6 ppm). Additionally, Fe concentration in the liver (D) as well as mRNA and protein expression of Fe-related genes/proteins in the liver were determined by qPCR or western blot, respectively (E,G–L). Ferroportin mRNA was measured in the duodenum (F). The TE profile was analyzed using ICP-MS/MS (A,D). Further Fe plasma parameters were detected by ELISA (B,C). Bars represent means + SD ($n = 4–5$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. WT and # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ vs. –Se (two-way ANOVA with Bonferroni’s post-test).

As in the previous experiment (Figure 1), there was no effect of Nrf2 on hepatic or plasma Cu levels under ++Se conditions, but under –Se and +Se conditions hepatic Cu levels were reduced (Figure 5B) while plasma values were increased in the –Se Nrf2 KO group (Figure 5A). The latter obviously resulted from lower Cu levels of –Se WT mice in comparison to +Se WT mice. Higher expression levels of *Atp7b* (Figure 5G) might be the reason for lower Cu levels in –Se Nrf2 KO mice, while at the same time, higher Cu plasma levels could be explained by more efficient binding of Cu to Cp (Figure 4I) being excreted from hepatocytes. The Cu transporter 1 (*Ctr1*) is important for Cu as well as Zn absorption in the intestine; however, hepatocytes also express *Ctr1* in relevant amounts to take up Cu from the circulation. *Ctr1* protein expression was completely unaffected by the Nrf2 genotype or Se supply (Figure 5C).

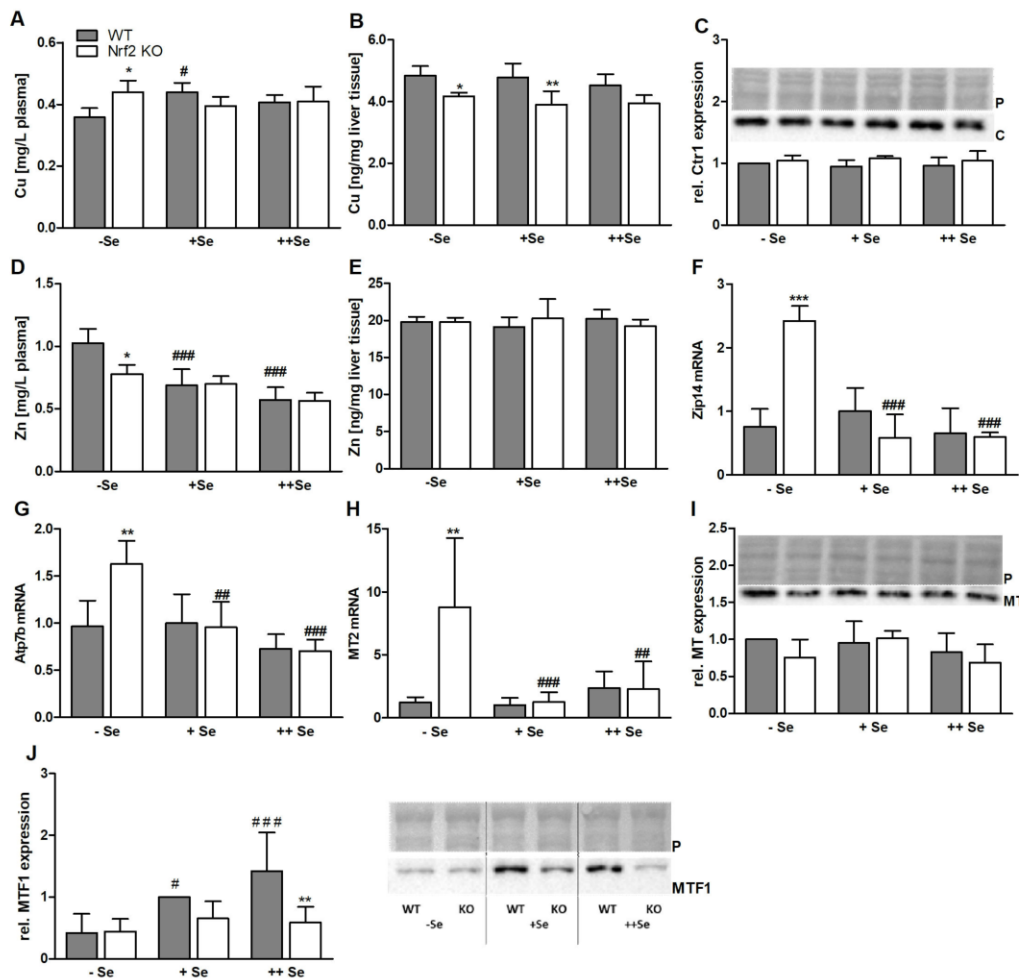


Figure 5. Biomarkers of the Cu and Zn status. Cu and Zn concentrations in the plasma (A,C) and liver (B,D) of male Nrf2 KO and WT mice fed diets with defined Se contents (–Se: 0.03 ppm; +Se: 0.15 ppm; ++Se: 0.6 ppm), analyzed by ICP-MS/MS. Additionally, mRNA (F–H) and protein expression (C, I–J) of Cu- and Zn-related genes/proteins in the liver of these animals were determined. Western blots were normalized to the Ponceau staining (P). Bars represent means + SD ($n = 4–5$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. WT and # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ vs. –Se (two-way ANOVA with Bonferroni’s post-test). C = Ctr1.

As seen before, hepatic Zn levels were neither affected by Nrf2 nor by Se status (Figure 5E). However, plasma concentrations were substantially reduced in Nrf2 KO mice under –Se conditions (Figure 5D). There was a concentration-dependent decrease of plasma Zn values with an increasing Se supply. In contrast to other members of the Zip family, Zip14 transports not only Zn but also Fe. Herein, intracellular Fe concentrations were increased in –Se Nrf2 KO mice, and at the same time, Zip14 mRNA levels were upregulated under these conditions (Figure 5F). Also, MT2 shows a very similar mRNA expression pattern (Figure 5H) to Zip14. It was highly upregulated in –Se Nrf2 KO livers. However, western blots with an antibody against all MT isoforms could not confirm the effect observed for MT2 mRNA expression (Figure 5I). As a potential mechanistic link between regulated genes and the Nrf2 and Se status, MTF1 expression was analyzed in the liver. MTF1 was significantly downregulated in ++Se Nrf2 KO mice (Figure 5J), but MTF1 levels declined with reduction of the Se status and thus the Nrf2 KO effect was lost under +Se and –Se conditions.

4. Discussion

It is well established that the transcription factor Nrf2 is an important mediator of Fe homeostasis [8]. In this study, we addressed the question of whether other trace elements, such as Se, Zn, and Cu, are modulated by Nrf2 as well. A reduction of Nrf2 levels and responsiveness is a relevant health condition that physiologically takes place during aging [38]. Thus, the question arises whether age-specific changes in TE profiles [39] might be related to Nrf2. Recently, it has been examined that Nrf2 activity levels strongly differ in the liver of male and female mice [40]. Also, herein, we were able to show that basal NQO1 mRNA expression in WT livers is much higher in female than in male mice (Figure S1C). Thus, sex differences of TEs could be attributed to higher Nrf2 activity as well. All three TEs, Fe, Cu, and Zn, were indeed higher in the plasma of female than in male mice (Table 4), but the underlying mechanisms are unclear so far. Also, MT2 mRNA levels were substantially higher in female livers but at the same time independent of the Nrf2 status (Figure S1E).

Table 4. Effects of Nrf2 genotype, sex, and a suboptimal Se status on homeostasis of Fe, Zn, and Cu.

TE	Nrf2 Genotype (KO vs. WT)	Sex in WT Mice (Female vs. Male)	Se Effect in WT Mice (−Se vs. +/+Se)
Cu	intracellular Cu → plasma Cu ↓	plasma Cu ↑	plasma Cu →
Fe	intracellular Fe ↑ plasma Fe biomarkers →	liver and plasma Fe ↑	only hepatic ferritin H ↑
Se	intracellular Se ↓ plasma Se →	liver Se ↑	↓ as expected
Zn	intestinal and plasma Zn ↓ liver Zn →	plasma Zn ↑	plasma Zn ↓

We observed an increase in Fe tissue levels upon loss of Nrf2 (Figure 1A,B and Figure 4D). Vice versa, Nrf2 protects the murine liver against dietary Fe overload by enhancing Fe release [6]. Combining a genetic mouse model for hereditary hemochromatosis with an Nrf2 KO results in hepatic fibrosis, which could otherwise be prohibited by upregulation of Nrf2 target genes [41]. Furthermore, under conditions of nutritional steatohepatitis, Nrf2 inhibits hepatic Fe accumulation and thereby counteracts oxidative stress [42]. Recently, it has been shown that Fe-induced Nrf2 activation enhances bone morphogenetic protein 6 (Bmp6) signaling, which upregulates hepcidin expression to fine-tune Fe homeostasis [36]. One of the first observations indicating a change in Fe homeostasis in Nrf2 KO mice was the finding that Nrf2 KO mice have abnormally white teeth in comparison to WT mice due to defective Fe utilization during tooth development [43]. Higher Fe tissue levels can be attributed to the Fe exporter Fpn1, which was downregulated in male Nrf2 KO mice (Figure 4F and Figure S1D), and to the hepatic Fe importers, TfR and DMT1 [44], which were upregulated in −Se Nrf2 KO mice (Figure 4G,H). Also, Zip14 was strongly induced in −Se Nrf2 KO mice (Figure 5F). Zip14 was originally described as a Zn importer with the highest expression in the jejunum and liver, but it is now established that it transports further TEs, such as Fe [45]. Under conditions of Fe depletion, Zip14 membrane localization is impaired based on post-translational modifications [46]. Under physiological conditions, Fe is mainly transported bound to transferrin. Thus, TfR appears to be of major relevance for Fe uptake into the liver. To get an idea of the putative crosstalk between several TEs, we included DMT1 and Zip14, as those not only transport Fe but also additional TEs. Usually, the intracellular free labile Fe pool is tightly regulated. One of the most important regulating proteins is ferritin, which is able to bind up to 4,500 Fe atoms in its core [47]. The amount of intracellular ferritin H was strongly reduced in Nrf2 KO mice (Figure 4J–L), especially on the protein level, indicating that the labile free Fe pool is substantially increased under those conditions. Ferritin can be secreted from both hepatocytes and Kupffer cells to contribute to plasma ferritin levels in addition to the relevant amounts secreted by macrophages [48]. Surprisingly, plasma ferritin levels stayed unaffected by the Nrf2 genotype

(Figure 4B and Figure S1A). This might be explained by the fact that plasma ferritin mostly consists of the ferritin L subunit and not H [49], even though ferritin L has been identified as an Nrf2 target gene as well [50]. Based on the observed substantial downregulation of ferritin H, effects of Fe on the liver are supposed to be stronger than detected. Eventually, Fe availability to the systemic circulation is also reduced in Nrf2 KO mice, counteracting the loss of Nrf2-mediated limitation of the intracellular free Fe pool. Indeed, intestinal Fpn1 expression was reduced in Nrf2 KO mice (Figure 4F), indicating that absorbed Fe might be retained there and released back into the intestinal lumen when enterocytes go into apoptosis. In line with this, Fe plasma levels were reduced in Nrf2 KO mice but only in females (Figure 1F).

In parallel to Fe, intracellular levels of Se and Zn were affected by loss of Nrf2 as well. In this case, both were reduced. Also, plasma Cu levels were slightly reduced in Nrf2 KO mice (overview in Table 4). Overall, these effects were rather small. For Se, the small reduction in liver Se levels could not be confirmed by analyzing selenoproteins, which respond very sensitively towards changes in the Se status. This was the case for total GPX activity. Only Selenow mRNA expression, which might be a useful additional biomarker for the Se status [51], was slightly reduced in Nrf2 KO mice under +Se conditions (Figure 2E). Thus, Nrf2 does not appear to be a major regulator of the Se status.

Comparable to Zip14, mRNA levels of *Atp7b*, the essential ATPase for Cu export into the bile [10], were upregulated under –Se Nrf2 KO conditions (Figure 5F,G). Additionally, DMT1 (Figure 4F) and MT2 revealed a similar expression pattern (Figure 5H), which could not be confirmed on the protein level when using an antibody capable of detecting all MT isoforms (Figure 5I). MT isoforms are cysteine-rich proteins that efficiently bind Cu and Zn to reduce the amount of both TEs in their free form [9]. Feeding of rats with the Nrf2 activator sulforaphane resulted in a robust induction of genes encoding for MT-1/2 and MT1a [52]. The MT1 promoter contains an ARE that is activated by Nrf1 and Nrf2, but in the latter case, not to the same extent. In Nrf1 KO mice, basal levels of both MT1 and MT2 genes were reduced [25]. Herein, we did not detect any downregulation of MT2 mRNA upon loss of Nrf2. As several genes (*MT2*, *Atp7b*, *Zip14*, *Cp*, *TfR*, and *Dmt1*) showed a comparable expression pattern, being induced specifically under –Se Nrf2 KO conditions, the question arose if there is a common regulator. One possibility would be MTF1, which regulates MT expression in response to Zn or Cu [53]. Recently, it has been shown that the disruption of an MTF1 binding site by a homozygous variant in the promoter of *Atp7b* likely causes Wilson disease [24]. In addition, the induction of Fpn1 transcription by MTF1 has been shown [54]. However, there was no detectable MTF1 activation in –Se Nrf2 KO livers. In contrast, MTF1 was upregulated in a concentration-dependent manner as a response to Se. Only under ++Se conditions, an Nrf2 genotype effect was detectable, showing lower MTF1 levels upon loss of Nrf2. Thus, MTF1 expression does not provide an obvious explanation for the observed mRNA expression pattern of some MTF1 target genes.

Besides DMT1, *Ctr1* is the main universal Cu importer in mammalian cells. A KO of *Ctr1* in the intestine resulted in peripheral Cu hypoaccumulation. In parallel, hepatic Fe levels were upregulated [55]. Expression of *Ctr1* was unaffected by the Nrf2 genotype and hepatic Se levels (Figure 5C). Furthermore, an Se-dependent reduction of plasma Zn concentration was observed (Figure 5D). An intestine-specific *Ctr1* KO did not modulate the systemic Zn status [55], while liver-specific *Ctr1* KO mice showed a transient increase in hepatic Zn levels but not in serum [56]. Taken together, homeostasis of Zn and Cu also appears to be regulated rather independently of Nrf2. However, it is possible that there are short-term effects of Nrf2 on TE homeostasis, which might be undetectable in constitutive KO mice because of putative adaptation processes in response to a loss of Nrf2 over time.

We and others have shown previously that a suboptimal selenium supply results in Nrf2 activation predominantly in the liver and intestine of mice [17,57]. This can be attributed mainly to low levels of the selenoproteins TXNRD1 and GPX4, as single KOs of one of these two selenoproteins also activate Nrf2 [28,58–60]. Patients with Kaschin–Beck disease, a disease diagnosed under conditions of Se deficiency, have been characterized by higher expression of Nrf2 and its target gene *Hmox1* in whole

blood samples as compared to healthy controls, indicating potential Nrf2 activation in humans under Se deficient conditions [61]. However, in this case, we could not confirm previous results and observed no Nrf2 activation indicated by NQO1 and GST activity in the liver (Figure 3) or intestine (Figure S2) of mice fed an –Se diet, even though the levels of TXNRD and GPX activity were in a comparable range to previous experiments [17,26]. Only the Nrf2 target gene *ferritin H* was clearly upregulated in –Se WT livers and was almost lost in Nrf2 KO mice (Figure 4K,L). This phenomenon has also been described in another recent study analyzing the response to lifelong dietary Se interventions in mice. Additionally, in this study, no effect of an Se-deficient diet could be observed on hepatic Nrf2 response genes considering whole transcriptome analyses [62]. Another study found that Se deficiency affected the expression of neither Hmox1 nor NQO1 [63]. In those two studies, and similar to our study, Se deficiency decreased the expression of important selenoproteins but did not activate Nrf2. Thus, it has been suggested that a low Se status interacts with another dietary or environmental component to regulate the Nrf2 response but is not sufficient by itself [62].

Therefore, the initial aim of studying the crosstalk between Nrf2 and selenium status in modulating three other TEs is difficult to address under the present conditions. Herein, it is relatively clear that Se effects observed on Zn appear to be regulated independently of Nrf2. However, when only considering WT mice, we could still draw conclusions towards the role of the Se status on TE status of Zn, Fe, and Cu. Most strikingly, Zn plasma levels were higher in mice with low Se status and vice versa (Figure 5D). In comparison to that, Cu and Fe were rather unaffected by Se. At the same time, hepatic Zn levels were unaffected by the Se status, indicating that Zn appears to be taken up by other tissues besides the liver when Se levels are rising. As MTF1 shows the complete opposite effect than plasma Zn levels and also as most of the MTF1 target genes, it might be an attempt to compensate for the low Se status. Any underlying mechanisms, however, are unclear so far.

5. Conclusions

Overall, only Fe was substantially regulated in response to Nrf2 while the impact of Nrf2 on homeostasis of Se, Cu, and Zn appeared to be rather marginal. Nevertheless, crosstalk between Se and MTF1 is a promising idea that needs to be followed up in the future and might provide an explanation for the observed counter regulation of plasma Se and Zn levels.

The mammalian ionome has been evaluated in 26 species and across several tissues [64]. In this study, Zn levels in the liver and kidney were positively correlated with maximum lifespan while hepatic Se was negatively correlated with longevity, albeit in a relatively weak manner. The Nrf2 responsiveness is reduced during aging, which provides a putative explanation for changes in TE profiles in the elderly and for TE effects on longevity. We have recently shown in a reinvented sub-cohort of the EPIC Potsdam study that Cu and Fe serum levels increased over time, while Zn and Se levels showed an age-dependent decline [39]. This is supposed to be associated with a reduction in Nrf2 activity for which, herein, Nrf2 KO mice were used as a model. Also, in Nrf2 KO mice, Se and Zn levels were reduced; however, there was no upregulation but rather a slight downregulation of the systemic Cu status (Table 4). Systemic Fe levels increased in Nrf2 KO mice but that was shown herein for intracellular amounts and not for plasma biomarkers as done in the EPIC study. Thus, it needs to be further clarified how age-dependent changes in the TE status are modulated on the molecular level.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6643/11/9/2112/s1>, Figure S1: Ferritin and transferrin concentrations in the plasma and mRNA expression in the livers of male and female Nrf2 KO and WT mice fed a standard chow diet. Figure S2: NQO1 mRNA (A) and activity (B) in the duodenum of male Nrf2 KO and WT mice fed diets with defined Se content (–Se: 0.03 ppm; +Se: 0.15 ppm; ++Se: 0.6 ppm).

Author Contributions: A.P.K. and T.S. were responsible for the conceptualization of the study, supervision, and funding acquisition; M.S., K.L. and J.F.K. established the methodology, performed the analyses and prepared the original draft.

Funding: This research was funded by German Research Foundation (DFG), FOR 2558.

Acknowledgments: The authors highly acknowledge the support of Franziska Hiller in organizing the animal experiment and excellent technical support by Stefanie Deubel, Gabriele Pohl, and Sören Meyer. In addition, we thank Masayuki Yamamoto for providing the Nrf2 KO mice.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Brigelius-Flohé, R.; Flohé, L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid. Redox. Signal.* **2011**, *15*, 2335–2381. [[CrossRef](#)]
2. Tebay, L.E.; Robertson, H.; Durant, S.T.; Vitale, S.R.; Penning, T.M.; Dinkova-Kostova, A.T.; Hayes, J.D. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. *Free. Radic. Biol. Med.* **2015**, *88*, 108–146. [[CrossRef](#)]
3. Hayes, J.D.; Dinkova-Kostova, A.T. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends. Biochem. Sci.* **2014**, *39*, 199–218. [[CrossRef](#)]
4. McMahon, M.; Swift, S.R.; Hayes, J.D. Zinc-binding triggers a conformational-switch in the cullin-3 substrate adaptor protein KEAP1 that controls transcription factor NRF2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2018**, *360*, 45–57. [[CrossRef](#)]
5. Moon, M.S.; McDevitt, E.I.; Zhu, J.; Stanley, B.; Krzeminski, J.; Amin, S.; Aliaga, C.; Miller, T.G.; Isom, H.C. Elevated hepatic iron activates NF-E2-related factor 2-regulated pathway in a dietary iron overload mouse model. *Toxicol. Sci.* **2012**, *129*, 74–85. [[CrossRef](#)]
6. Silva-Gomes, S.; Santos, A.G.; Caldas, C.; Silva, C.M.; Neves, J.V.; Lopes, J.; Carneiro, F.; Rodrigues, P.N.; Duarte, T.L. Transcription factor NRF2 protects mice against dietary iron-induced liver injury by preventing hepatocytic cell death. *J. Hepatol.* **2014**, *60*, 354–361. [[CrossRef](#)]
7. Harada, N.; Kanayama, M.; Maruyama, A.; Yoshida, A.; Tazumi, K.; Hosoya, T.; Mimura, J.; Toki, T.; Maher, J.M.; Yamamoto, M.; et al. Nrf2 regulates ferroportin 1-mediated iron efflux and counteracts lipopolysaccharide-induced ferroportin 1 mRNA suppression in macrophages. *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *508*, 101–109. [[CrossRef](#)]
8. Kerins, M.J.; Ooi, A. The Roles of NRF2 in Modulating Cellular Iron Homeostasis. *Antioxid. Redox Signal.* **2018**, *29*, 1756–1773. [[CrossRef](#)]
9. Davis, S.R.; Cousins, R.J. Metallothionein expression in animals: A physiological perspective on function. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 1085–1088. [[CrossRef](#)]
10. Polishchuk, E.V.; Concilli, M.; Iacobacci, S.; Chesi, G.; Pastore, N.; Piccolo, P.; Paladino, S.; Baldantoni, D.; van, I.S.C.; Chan, J.; et al. Wilson disease protein ATP7B utilizes lysosomal exocytosis to maintain copper homeostasis. *Dev. Cell* **2014**, *29*, 686–700. [[CrossRef](#)]
11. Lutsenko, S. Human copper homeostasis: A network of interconnected pathways. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 211–217. [[CrossRef](#)]
12. Mocchegiani, E.; Costarelli, L.; Giacconi, R.; Malavolta, M.; Basso, A.; Piacenza, F.; Ostan, R.; Cevenini, E.; Gonos, E.S.; Monti, D. Micronutrient-gene interactions related to inflammatory/immune response and antioxidant activity in ageing and inflammation. A systematic review. *Mech. Ageing Dev.* **2014**, *136–137*, 29–49. [[CrossRef](#)]
13. Song, M.O.; Mattie, M.D.; Lee, C.H.; Freedman, J.H. The role of Nrf1 and Nrf2 in the regulation of copper-responsive transcription. *Exp. Cell. Res.* **2014**, *322*, 39–50. [[CrossRef](#)]
14. Cui, Z.; Zhong, Z.; Yang, Y.; Wang, B.; Sun, Y.; Sun, Q.; Yang, G.Y.; Bian, L. Ferrous Iron Induces Nrf2 Expression in Mouse Brain Astrocytes to Prevent Neurotoxicity. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2016**, *30*, 396–403. [[CrossRef](#)]
15. Alam, J.; Cook, J.L. Transcriptional regulation of the heme oxygenase-1 gene via the stress response element pathway. *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 2499–2511. [[CrossRef](#)]
16. Pietsch, E.C.; Chan, J.Y.; Torti, F.M.; Torti, S.V. Nrf2 mediates the induction of ferritin H in response to xenobiotics and cancer chemopreventive dithiolethiones. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 2361–2369. [[CrossRef](#)]
17. Müller, M.; Banning, A.; Brigelius-Flohé, R.; Kipp, A. Nrf2 target genes are induced under marginal selenium-deficiency. *Genes. Nutr.* **2010**, *5*, 297–307. [[CrossRef](#)]

18. Zhang, J.; Wang, H.; Peng, D.; Taylor, E.W. Further insight into the impact of sodium selenite on selenoenzymes: High-dose selenite enhances hepatic thioredoxin reductase 1 activity as a consequence of liver injury. *Toxicol. Lett.* **2008**, *176*, 223–229. [[CrossRef](#)]
19. Banning, A.; Deubel, S.; Kluth, D.; Zhou, Z.; Brigelius-Flohé, R. The GI-GPx gene is a target for Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 4914–4923. [[CrossRef](#)]
20. Sakurai, A.; Nishimoto, M.; Himeno, S.; Imura, N.; Tsujimoto, M.; Kunimoto, M.; Hara, S. Transcriptional regulation of thioredoxin reductase 1 expression by cadmium in vascular endothelial cells: Role of NF-E2-related factor-2. *J. Cell. Physiol.* **2005**, *203*, 529–537. [[CrossRef](#)]
21. Li, B.; Cui, W.; Tan, Y.; Luo, P.; Chen, Q.; Zhang, C.; Qu, W.; Miao, L.; Cai, L. Zinc is essential for the transcription function of Nrf2 in human renal tubule cells in vitro and mouse kidney in vivo under the diabetic condition. *J. Cell. Mol. Med.* **2014**, *18*, 895–906. [[CrossRef](#)]
22. Wakabayashi, N.; Slocum, S.L.; Skoko, J.J.; Shin, S.; Kensler, T.W. When NRF2 talks, who's listening? *Antioxid. Redox. Signal.* **2010**, *13*, 1649–1663. [[CrossRef](#)]
23. Gunther, V.; Lindert, U.; Schaffner, W. The taste of heavy metals: Gene regulation by MTF-1. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1823*, 1416–1425. [[CrossRef](#)]
24. Chen, H.I.; Jagadeesh, K.A.; Birgmeier, J.; Wenger, A.M.; Guturu, H.; Schelley, S.; Bernstein, J.A.; Bejerano, G. An MTF1 binding site disrupted by a homozygous variant in the promoter of ATP7B likely causes Wilson Disease. *Eur. J. Hum. Genet.* **2018**, *26*, 1810–1818. [[CrossRef](#)]
25. Ohtsui, M.; Katsuoka, F.; Kobayashi, A.; Aburatani, H.; Hayes, J.D.; Yamamoto, M. Nrf1 and Nrf2 play distinct roles in activation of antioxidant response element-dependent genes. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 33554–33562. [[CrossRef](#)]
26. Lennicke, C.; Rahn, J.; Kipp, A.P.; Dojcinovic, B.P.; Müller, A.S.; Wessjohann, L.A.; Lichtenfels, R.; Seliger, B. Individual effects of different selenocompounds on the hepatic proteome and energy metabolism of mice. *Biochim. Biophys. Acta* **2017**, *1861*, 3323–3334. [[CrossRef](#)]
27. Rayman, M.P. Selenium and human health. *Lancet* **2012**, *379*, 1256–1268. [[CrossRef](#)]
28. Cebula, M.; Schmidt, E.E.; Arnér, E.S. TrxR1 as a potent regulator of the Nrf2-Keap1 response system. *Antioxid. Redox. Signal.* **2015**, *23*, 823–853. [[CrossRef](#)]
29. Itoh, K.; Chiba, T.; Takahashi, S.; Ishii, T.; Igarashi, K.; Katoh, Y.; Oyake, T.; Hayashi, N.; Satoh, K.; Hatayama, I.; et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *236*, 313–322. [[CrossRef](#)]
30. Ritskes-Hoitinga, M. Nutrition of the laboratory mouse. In *The Laboratory Mouse*; Academic Press, Elsevier: London, UK, 2012; pp. 567–596.
31. Marschall, T.A.; Kroepfl, N.; Jensen, K.B.; Bornhorst, J.; Meermann, B.; Kuehnelt, D.; Schwerdtle, T. Tracing cytotoxic effects of small organic Se species in human liver cells back to total cellular Se and Se metabolites. *Metallomics* **2017**, *9*, 268–277. [[CrossRef](#)]
32. Kopp, J.F.; Müller, S.M.; Pohl, G.; Lossow, K.; Kipp, A.P.; Schwerdtle, T. A quick and simple method for the determination of six trace elements in mammalian serum samples using ICP-MS/MS. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2019**, *54*, 221–225. [[CrossRef](#)]
33. Krehl, S.; Loewinger, M.; Florian, S.; Kipp, A.P.; Banning, A.; Wessjohann, L.A.; Brauer, M.N.; Iori, R.; Esworthy, R.S.; Chu, F.F.; et al. Glutathione peroxidase-2 and selenium decreased inflammation and tumors in a mouse model of inflammation-associated carcinogenesis whereas sulforaphane effects differed with selenium supply. *Carcinogenesis* **2012**, *33*, 620–628. [[CrossRef](#)]
34. Florian, S.; Krehl, S.; Loewinger, M.; Kipp, A.; Banning, A.; Esworthy, S.; Chu, F.F.; Brigelius-Flohé, R. Loss of GPx2 increases apoptosis, mitosis and GPx1 expression in the intestine of mice. *Free. Radic. Biol. Med.* **2010**, *49*, 1694–1702. [[CrossRef](#)]
35. Habig, W.H.; Pabst, M.J.; Jakoby, W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 7130–7139.
36. Lim, P.J.; Duarte, T.L.; Arezes, J.; Garcia-Santos, D.; Hamdi, A.; Pasricha, S.R.; Armitage, A.E.; Mehta, H.; Wideman, S.; Santos, A.G.; et al. Nrf2 controls iron homeostasis in haemochromatosis and thalassaemia via Bmp6 and hepcidin. *Nat. Metab.* **2019**, *1*, 519–531. [[CrossRef](#)]
37. Köhler, U.A.; Böhm, F.; Rolfs, F.; Egger, M.; Hornemann, T.; Pasparakis, M.; Weber, A.; Werner, S. NF- κ B/RelA and Nrf2 cooperate to maintain hepatocyte integrity and to prevent development of hepatocellular adenoma. *J. Hepatol.* **2016**, *64*, 94–102. [[CrossRef](#)]

38. Huang, D.D.; Fan, S.D.; Chen, X.Y.; Yan, X.L.; Zhang, X.Z.; Ma, B.W.; Yu, D.Y.; Xiao, W.Y.; Zhuang, C.L.; Yu, Z. Nrf2 deficiency exacerbates frailty and sarcopenia by impairing skeletal muscle mitochondrial biogenesis and dynamics in an age-dependent manner. *Exp. Gerontol.* **2019**, *119*, 61–73. [[CrossRef](#)]
39. Baudry, J.; Kopp, J.F.; Boeing, H.; Kipp, A.P.; Schwerdtle, T.; Schulze, M.B. Changes of trace element status during aging: Results of the EPIC-Potsdam cohort study. *Eur. J. Nutr.* **2019**. submitted.
40. Rooney, J.; Oshida, K.; Vasani, N.; Vallanat, B.; Ryan, N.; Chorley, B.N.; Wang, X.; Bell, D.A.; Wu, K.C.; Aleksunes, L.M.; et al. Activation of Nrf2 in the liver is associated with stress resistance mediated by suppression of the growth hormone-regulated STAT5b transcription factor. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0200004. [[CrossRef](#)]
41. Duarte, T.L.; Caldas, C.; Santos, A.G.; Silva-Gomes, S.; Santos-Goncalves, A.; Martins, M.J.; Porto, G.; Lopes, J.M. Genetic disruption of NRF2 promotes the development of necroinflammation and liver fibrosis in a mouse model of HFE-hereditary hemochromatosis. *Redox Biol.* **2017**, *11*, 157–169. [[CrossRef](#)]
42. Okada, K.; Warabi, E.; Sugimoto, H.; Horie, M.; Tokushige, K.; Ueda, T.; Harada, N.; Taguchi, K.; Hashimoto, E.; Itoh, K.; et al. Nrf2 inhibits hepatic iron accumulation and counteracts oxidative stress-induced liver injury in nutritional steatohepatitis. *J. Gastroenterol.* **2012**, *47*, 924–935. [[CrossRef](#)]
43. Yanagawa, T.; Itoh, K.; Uwayama, J.; Shibata, Y.; Yamaguchi, A.; Sano, T.; Ishii, T.; Yoshida, H.; Yamamoto, M. Nrf2 deficiency causes tooth decolorization due to iron transport disorder in enamel organ. *Genes Cells* **2004**, *9*, 641–651. [[CrossRef](#)]
44. Shindo, M.; Torimoto, Y.; Saito, H.; Motomura, W.; Ikuta, K.; Sato, K.; Fujimoto, Y.; Kohgo, Y. Functional role of DMT1 in transferrin-independent iron uptake by human hepatocyte and hepatocellular carcinoma cell, HLF. *Hepatol. Res.* **2006**, *35*, 152–162. [[CrossRef](#)]
45. Liuzzi, J.P.; Aydemir, F.; Nam, H.; Knutson, M.D.; Cousins, R.J. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13612–13617. [[CrossRef](#)]
46. Aydemir, T.B.; Cousins, R.J. The Multiple Faces of the Metal Transporter ZIP14 (SLC39A14). *J. Nutr.* **2018**, *148*, 174–184. [[CrossRef](#)]
47. Macara, I.G.; Hoy, T.G.; Harrison, P.M. The formation of ferritin from apoferritin. Kinetics and mechanism of iron uptake. *Biochem. J.* **1972**, *126*, 151–162. [[CrossRef](#)]
48. Wang, W.; Knovich, M.A.; Coffman, L.G.; Torti, F.M.; Torti, S.V. Serum ferritin: Past, present and future. *Biochim. Biophys. Acta.* **2010**, *1800*, 760–769. [[CrossRef](#)]
49. Santambrogio, P.; Cozzi, A.; Levi, S.; Arosio, P. Human serum ferritin G-peptide is recognized by anti-L ferritin subunit antibodies and concanavalin-A. *Br. J. Haematol.* **1987**, *65*, 235–237. [[CrossRef](#)]
50. Kuosmanen, S.M.; Viitala, S.; Laitinen, T.; Perakyla, M.; Polonen, P.; Kansanen, E.; Leinonen, H.; Raju, S.; Wienecke-Baldacchino, A.; Narvanen, A.; et al. The Effects of Sequence Variation on Genome-wide NRF2 Binding—New Target Genes and Regulatory SNPs. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 1760–1775. [[CrossRef](#)]
51. Kipp, A.P.; Frombach, J.; Deubel, S.; Brigelius-Flohé, R. Selenoprotein W as biomarker for the efficacy of selenium compounds to act as source for selenoprotein biosynthesis. *Methods Enzymol.* **2013**, *527*, 87–112.
52. Hu, R.; Hebbbar, V.; Kim, B.R.; Chen, C.; Winnik, B.; Buckley, B.; Soteropoulos, P.; Toliás, P.; Hart, R.P.; Kong, A.N. In vivo pharmacokinetics and regulation of gene expression profiles by isothiocyanate sulforaphane in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *310*, 263–271. [[CrossRef](#)]
53. Hardyman, J.E.; Tyson, J.; Jackson, K.A.; Aldridge, C.; Cockell, S.J.; Wakeling, L.A.; Valentine, R.A.; Ford, D. Zinc sensing by metal-responsive transcription factor 1 (MTF1) controls metallothionein and ZnT1 expression to buffer the sensitivity of the transcriptome response to zinc. *Metallomics* **2016**, *8*, 337–343. [[CrossRef](#)]
54. Troadec, M.B.; Ward, D.M.; Lo, E.; Kaplan, J.; De Domenico, I. Induction of FPN1 transcription by MTF-1 reveals a role for ferroportin in transition metal efflux. *Blood* **2010**, *116*, 4657–4664. [[CrossRef](#)]
55. Nose, Y.; Kim, B.E.; Thiele, D.J. Ctr1 drives intestinal copper absorption and is essential for growth, iron metabolism, and neonatal cardiac function. *Cell Metab.* **2006**, *4*, 235–244. [[CrossRef](#)]
56. Kim, H.; Son, H.Y.; Bailey, S.M.; Lee, J. Deletion of hepatic Ctr1 reveals its function in copper acquisition and compensatory mechanisms for copper homeostasis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2009**, *296*, G356–G364. [[CrossRef](#)]
57. Burk, R.F.; Hill, K.E.; Nakayama, A.; Mostert, V.; Levander, X.A.; Motley, A.K.; Johnson, D.A.; Johnson, J.A.; Freeman, M.L.; Austin, L.M. Selenium deficiency activates mouse liver Nrf2-ARE but vitamin E deficiency does not. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *44*, 1617–1623. [[CrossRef](#)]

58. Carlson, B.A.; Tobe, R.; Yefremova, E.; Tsuji, P.A.; Hoffmann, V.J.; Schweizer, U.; Gladyshev, V.N.; Hatfield, D.L.; Conrad, M. Glutathione peroxidase 4 and vitamin E cooperatively prevent hepatocellular degeneration. *Redox Biol.* **2016**, *9*, 22–31. [[CrossRef](#)]
59. Patterson, A.D.; Carlson, B.A.; Li, F.; Bonzo, J.A.; Yoo, M.H.; Krausz, K.W.; Conrad, M.; Chen, C.; Gonzalez, F.J.; Hatfield, D.L. Disruption of thioredoxin reductase 1 protects mice from acute acetaminophen-induced hepatotoxicity through enhanced NRF2 activity. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26*, 1088–1096. [[CrossRef](#)]
60. Suvorova, E.S.; Lucas, O.; Weisend, C.M.; Rollins, M.F.; Merrill, G.F.; Capecchi, M.R.; Schmidt, E.E. Cytoprotective Nrf2 pathway is induced in chronically txnrd 1-deficient hepatocytes. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6158. [[CrossRef](#)]
61. Li, Y.; Mo, X.; Xiong, Y. The Study on Polymorphism of TrxR and Nrf2/HO-1 Signaling Pathway in Kaschin-Beck Disease. *Biol. Trace Elem. Res.* **2018**, *190*, 303–308. [[CrossRef](#)]
62. Yim, S.H.; Clish, C.B.; Gladyshev, V.N. Selenium Deficiency Is Associated with Pro-longevity Mechanisms. *Cell Rep.* **2019**, *27*, 2785–2797 e3. [[CrossRef](#)]
63. Dong, R.; Wang, D.; Wang, X.; Zhang, K.; Chen, P.; Yang, C.S.; Zhang, J. Epigallocatechin-3-gallate enhances key enzymatic activities of hepatic thioredoxin and glutathione systems in selenium-optimal mice but activates hepatic Nrf2 responses in selenium-deficient mice. *Redox Biol.* **2016**, *10*, 221–232. [[CrossRef](#)]
64. Ma, S.; Lee, S.G.; Kim, E.B.; Park, T.J.; Seluanov, A.; Gorbunova, V.; Buffenstein, R.; Seravalli, J.; Gladyshev, V.N. Organization of the Mammalian Ionome According to Organ Origin, Lineage Specialization and Longevity. *Cell. Rep.* **2015**, *13*, 1319–1326. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary

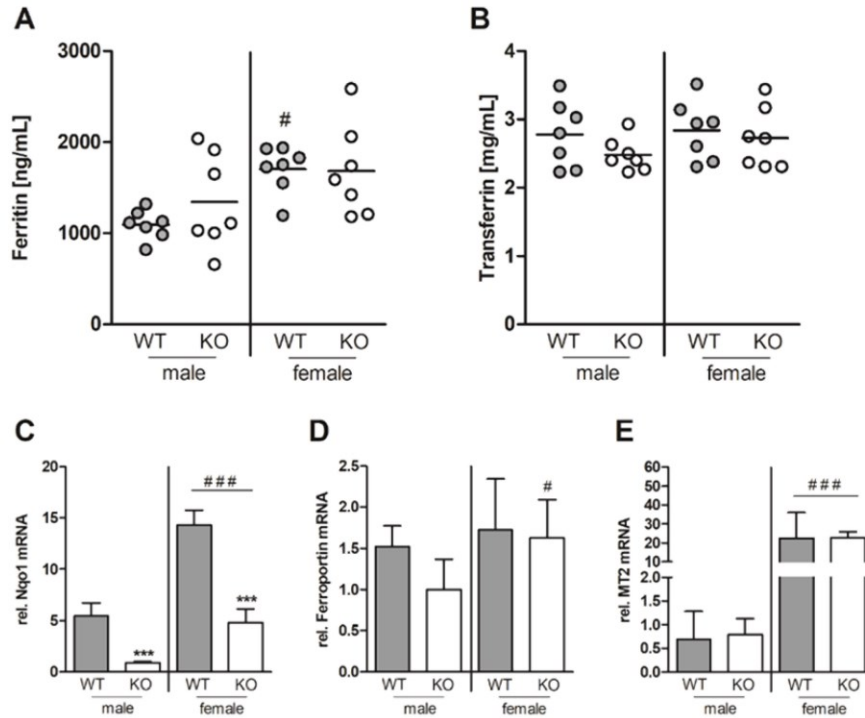


Figure S1. Ferritin and transferrin concentrations in the plasma and mRNA expression in the livers of male and female Nrf2 KO and WT mice fed a standard chow diet. Fe parameters were detected by ELISA (A,B). mRNA expression of Nqo1, Fpn1, and MT2 was analyzed by qPCR (C–E). Scatter dot plot with mean ($n = 7$). Bars represent means + SD ($n = 6–7$). *** $p < 0.001$ vs. WT and # $p < 0.05$; ### $p < 0.001$ vs. male (two-way ANOVA with Bonferroni’s post-test).

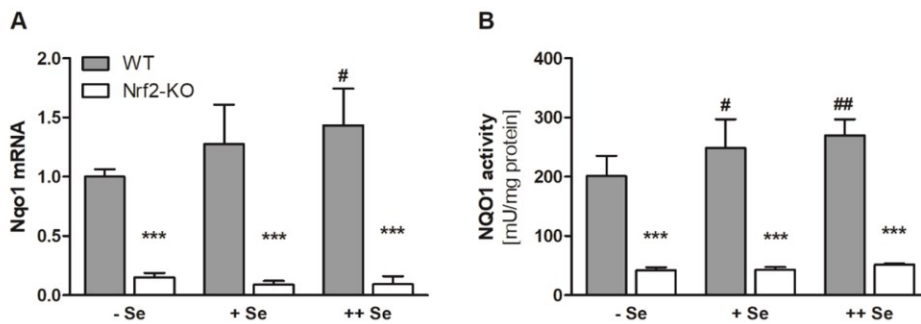


Figure S2. NQO1 mRNA (A) and activity (B) in the duodenum of male Nrf2 KO and WT mice fed diets with defined Se content (–Se: 0.03 ppm; +Se: 0.15 ppm; ++Se: 0.6 ppm). mRNA expression was analyzed by qPCR and normalized to Rpl13a and Epcam. Bars represent means + SD ($n = 3–4$). *** $p < 0.001$ vs. WT and # $p < 0.05$; ## $p < 0.001$ vs. –Se (two-way ANOVA with Bonferroni’s post-test).

4.2 Copper interferes with Selenoprotein synthesis and activity

Manuskript Nr. 2

Autoren: Maria Schwarz, Kristina, Lossow, Katja Schirl, Julian Hackler, Kostja Renko, Johannes Florian Kopp, Tanja Schwerdtle, Lutz Schomburg, Anna Patricia Kipp

Bibliographische Informationen:

Schwarz, M., K. Lossow, K. Schirl, J. Hackler, K. Renko, J. F. Kopp, T. Schwerdtle, L. Schomburg and A. P. Kipp (2020). "Copper interferes with selenoprotein synthesis and activity." *Redox Biol* 37: 101746.

Der Kandidat / Die Kandidatin ist

Erstautor/-in, Ko-Erstautor/-in, Korresp. Autor/-in, Koautor/-in.

Status: publiziert

Anteile (in %) der Autoren / der Autorinnen an der Publikation (anzugeben ab 20%)

Autor/-in	Konzeptionell	Datenanalyse	Experimentell	Verfassen des Manuskriptes	Bereitstellung von Material
Schwarz, M	50	90	70	65	
Lossow, K			20		
Schirl, K					
Hackler, J.					
Renko, K					
Kopp, JF					
Schwerdtle, T					
Schomburg, L.					
Kipp, AP	50			25	



Copper interferes with selenoprotein synthesis and activity

Maria Schwarz^{a,b}, Kristina Lossow^{a,b,c}, Katja Schirl^a, Julian Hackler^{b,d}, Kostja Renko^{d,e}, Johannes Florian Kopp^{b,f}, Tanja Schwerdtle^{b,e,f}, Lutz Schomburg^{b,d}, Anna Patricia Kipp^{a,b,*}

^a Department of Molecular Nutritional Physiology, Institute of Nutritional Sciences, Friedrich Schiller University Jena, Jena, 07743, Germany

^b TraceAge-DFG Research Unit on Interactions of Essential Trace Elements in Healthy and Diseased Elderly, Potsdam-Berlin-Jena, Germany

^c German Institute of Human Nutrition, Nuthetal, 14558, Germany

^d Institute for Experimental Endocrinology, Charité - University Medical School Berlin, Berlin, 13353, Germany

^e German Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Berlin, Germany

^f Department of Food Chemistry, Institute of Nutritional Science, University of Potsdam, Nuthetal, 14558, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Selenium
Copper
Selenoprotein synthesis
Glutathione peroxidase
Thioredoxin reductase

ABSTRACT

Selenium and copper are essential trace elements for humans, needed for the biosynthesis of enzymes contributing to redox homeostasis and redox-dependent signaling pathways. Selenium is incorporated as selenocysteine into the active site of redox-relevant selenoproteins including glutathione peroxidases (GPX) and thioredoxin reductases (TXNRD). Copper-dependent enzymes mediate electron transfer and other redox reactions. As selenoprotein expression can be modulated e.g. by H₂O₂, we tested the hypothesis that copper status affects selenoprotein expression. To this end, hepatocarcinoma HepG2 cells and mice were exposed to a variable copper and selenium supply in a physiologically relevant concentration range, and transcript and protein expression as well as GPX and TXNRD activities were compared. Copper suppressed selenoprotein mRNA levels of GPX1 and SELENOW, downregulated GPX and TXNRD activities and decreased UGA recoding efficiency in reporter cells. The interfering effects were successfully suppressed by applying the copper chelators bathocuproinedisulfonic acid or tetrathiomolybdate. In mice, a decreased copper supply moderately decreased the copper status and negatively affected hepatic TXNRD activity. We conclude that there is a hitherto unknown interrelationship between copper and selenium status, and that copper negatively affects selenoprotein expression and activity most probably via limiting UGA recoding. This interference may be of physiological relevance during aging, where a particular shift in the selenium to copper ratio has been reported. An increased concentration of copper in face of a downregulated selenoprotein expression may synergize and negatively affect the cellular redox homeostasis contributing to disease processes.

1. Introduction

The biological functions of the essential trace element (TE) selenium (Se) have been attributed primarily to selenoproteins. In the human genome, 25 genes encode for selenoproteins [1]. The best characterized selenoprotein families are the glutathione peroxidases (GPXs), the thioredoxin reductases (TXNRDs), and the deiodinases (DIOS). GPXs and TXNRDs are important modulators of the cellular redox homeostasis by either catalyzing the glutathione (GSH)-dependent reduction of hydroperoxides or NADPH-dependent reduction of thioredoxins and several further substrates, respectively. Selenoprotein P (SelenoP) comprises almost 50% of total plasma Se and transports Se from liver to peripheral

tissues [2]. Besides these, the function of several further selenoproteins are still not entirely understood, however, almost all of them appear to be involved in maintaining the cellular redox homeostasis. This holds especially true for selenoproteins such as selenoprotein H (SelenoH) and SelenoW which contain selenocysteine (Sec) as part of a CXXU motif, indicating that they are putative oxidoreductases. In addition, SelenoW has been shown to act in an antioxidant manner after its glutathionylation [3]. During selenoprotein synthesis, Se is cotranslationally incorporated as Sec which is encoded by the base triplet UGA. The specific Sec tRNA^{[Ser]Sec} becomes first aminoacylated with serine which is phosphorylated, accordingly. Both steps are catalyzed by seryl-tRNA synthetase (SERS) and O-phosphoserine-tRNA kinase (PSTK), respectively. The selenophosphate synthetase 2 (SEPHS2), which also belongs

* Corresponding author. Department of Molecular Nutritional Physiology, Institute of Nutritional Sciences, Friedrich Schiller University Jena, Dornburger Str. 24, 07743 Jena, Germany.

E-mail address: anna.kipp@uni-jena.de (A.P. Kipp).

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101746>

Received 4 September 2020; Received in revised form 1 October 2020; Accepted 4 October 2020

Available online 7 October 2020

2213-2317/© 2020 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abbreviations			
Atox1	antioxidant protein 1	MTT	thiazolyl blue tetrazolium bromide
BCS	bathocuproinedisulfonic acid	NQO1	NAD(P)H quinone dehydrogenase 1
BSO	buthionine-sulfoximine	Nrf2	nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2
CCS	Cu chaperone for superoxide dismutase 1	PSTK	O-phosphoseryl-tRNA kinase
Ctr1	Cu transporter 1	RT	room temperature
Cu	copper	Se	selenium
DIO	deiodinase	Sec	selenocysteine
DMT1	divalent metal-ion transporter 1	SECIS	Sec insertion sequence
DTNB	5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)	SeMet	selenomethionine
eEFSec	Sec-specific translation elongation factor	Sephys2	selenophosphate synthetase 2
GCL	glutamate-cysteine ligase	SepSecs	Sep (O-phosphoserine) tRNA:Sec tRNA synthase
GSH	glutathione	SerS	seryl-tRNA synthetase
GR	glutathione reductase	SOD1	superoxide dismutase 1
MT	metallothionein	TE	trace element
MTF-1	metal regulatory transcription factor 1	TNB	2-nitro-5-thiobenzoic acid
		TTM	tetrathiomolybdate
		TXRF	total reflection X-ray fluorescence

to the group of selenoproteins generates monoselenophosphate, which is then used by Sep (O-phosphoserine) tRNA:Sec tRNA synthase (SEPSECS) to form selenocysteyl-tRNA^{[Ser]Sec}. To initiate Sec incorporation rather than termination of protein synthesis, selenoprotein mRNAs contain a special Sec insertion sequence (SECIS) element in their 3' untranslated region. For efficient translation of UGA to Sec, additional factors such as the Sec-specific translation elongation factor (EEFSEC) are needed (overview in Ref. [2]).

The selenoprotein synthesis can be modulated at different levels. The best characterized principle is based on the efficiency of Sec incorporation affecting selenoprotein synthesis mainly at the translational level. In case of Se deficiency, expression levels of favored selenoproteins, namely housekeeping selenoproteins such as TXNRD1, TXNRD2, and GPX4 are maintained while expression levels of so-called stress-responsive selenoproteins e.g. GPX1, SELENOH, and SELENOW are rapidly decreased. This is also called hierarchy of selenoproteins [2]. In addition, drugs such as the aminoglycoside geneticin (G418) can induce misinterpretation of the UGA codon, primarily under Se deficiency, leading to increased rates of dysfunctional variants of selenoproteins [4–6]. Besides the translational regulation, selenoprotein expression can be additionally modulated at the transcriptional level. A prominent example relates to the activation of nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2 (Nrf2) by sulforaphane, positively affecting GPX2 and TXNRD1 expression [7,8]. Besides sulforaphane, e.g. hydroperoxides contribute to selenoprotein expression and modulate read-through efficiency [9]. These examples indicate that redox-responsive transcription factors and the cellular redox homeostasis synergistically affect selenoprotein expression at different molecular levels.

Besides factors that directly impact the cellular redox homeostasis, other mechanisms may contribute in a more indirect manner. This includes the essential TE copper (Cu), which is a cofactor of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase 1 (SOD1) [10], but at higher concentrations could also contribute as free ion to the generation of reactive oxygen species [11]. Furthermore, Cu is able to oxidize free thiol groups and to modulate the cellular redox homeostasis [12]. Thus, Cu metabolism and flux have to be strictly controlled for which a multitude of mechanisms exist. Cu is mainly taken up via the high-affinity Cu transporter 1 (Ctr1) [13], and to a lesser extent by Ctr2 [14]. The relevance of the divalent metal-ion transporter 1 (DMT1) for Cu transport is controversially discussed [15,16]. Intracellular Cu is bound to chaperones, which transport Cu to the target proteins [17]. One of these is the Cu chaperone for superoxide dismutase 1 (CCS) [18], which is upregulated when Cu levels are low [19]. Antioxidant protein 1 (Atox1) transfers Cu to ATP7A and ATP7B, essential for Cu export [17]. Further molecules that bind intracellular Cu and thus avoid free ions

and/or discharge excessive Cu, are GSH and metallothioneins (MTs) [20–22]. In rodents, Cu deficiency led to a decreased activity of GPXs [23–25]. In addition, Cu is able to reverse selenite-induced cytotoxicity in chicks [26] and in HT29 cells [27]. Based on these studies it is tempting to speculate that Cu interferes with the Se homeostasis. Here we address whether low, adequate or supplemented concentrations of Se and Cu modulate their metabolism *in vitro* and *in vivo*. To this end, we analyzed TE concentrations, gene and protein expression of Se- and Cu-dependent enzymes, and enzyme activities of the selenoproteins GPX and TXNRD in relation to changes in Cu status.

2. Material and methods

2.1. Mouse experiment

Male C57BL/6Jrj mice were housed in polycarbonate cages on a 12:12 h light:dark schedule with constant room temperature (RT, 22 °C) and humidity (55%). After weaning, at the age of 3 weeks, mice received a torula yeast-based Se-deficient diet (modified C1045, Altromin, Lage, Germany) additionally low in Cu and Mn as well as Na (Table 1). For all animals, the deionized drinking water was enriched with Mn and Na, subsequently resulting in 100 ppm and 500 ppm, respectively. Cu and Se were either supplied at suboptimal (no fortification) or adequate (fortification of drinking water, finally 6 ppm and 0.15 ppm, respectively) concentrations. The supply with TEs was weekly adapted to group-specific water and food consumption of the animals to reach the final TE concentration of interest. For supplementation, CuSO₄ (Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Germany), MnCl₂ (Sigma-Aldrich/Merck), NaCl (Sigma-Aldrich/Merck), and Na₂SeO₃ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) were employed. The intervention lasted for eight weeks, in which food and water were offered *ad libitum*. Finally, mice were anesthetized with isoflurane (Isothesia, Henry Schein, Hamburg, Germany) and blood was collected by cardiac puncture. Serum was

Table 1
Nutrient requirement of mice [28] and TE content of the diet and drinking water [ppm].

TE	Requirement	Diet	Fortification of drinking water	Final TE supply			
				-Se/-Cu	-Se/+Cu	+Se/-Cu	+Se/+Cu
Cu	6.00	1.60	4.40	1.60	6.00	1.60	6.00
Mn	10.0	8.84	91.2	100	100	100	100
Se	0.15	0.02	0.13	0.02	0.02	0.15	0.15
Na	500	194	306	500	500	500	500

obtained after full coagulation at RT and centrifugation for 10 min (3000×g, 4 °C). Organs were surgically dissected and immediately frozen. All animal procedures were approved and conducted following national guidelines of the Ministry of Environment, Health and Consumer Protection of the federal state of Brandenburg, Germany (permission number 2347-44-2017) and institutional guidelines of the German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbruecke.

2.2. Cell culture

The human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 (ACC 180 German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ)) and the human colorectal adenocarcinoma cell line HT-29 (ACC 299 DSMZ) were cultured in Roswell Park Memorial Institute 1640 media (RPMI; ThermoFisher Scientific) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS, Sigma-Aldrich/Merck), 1% (v/v) penicillin-streptomycin (P/S; ThermoFisher Scientific), and 1% (v/v) GlutaMAX™ (ThermoFisher Scientific) under standard culture conditions (37 °C, 5% CO₂). Se and Cu are exclusively supplied by the FCS to culture media, resulting in low basal concentrations of 5 nM and 200 nM, respectively. Unless otherwise specified, cells were incubated with 50 nM sodium selenite (99%, Honeywell Fluka™, Fisher Scientific) or 200 nM selenomethionine (SeMet; Sigma-Aldrich/Merck) and increasing concentrations (25, 50, and 100 μM) of CuSO₄ (Sigma-Aldrich/Merck) from the time point of seeding to harvesting 72 h later. When treated with chelators, 400 μM bathocuproindisulfonic acid (BCS, Sigma-Aldrich) or 75 μM tetrathiomolybdate (TTM, Sigma-Aldrich) were added to the culture medium 24 h before harvesting the cells. For the wash-out experiment, Cu-loaded cells (72 h of incubation) were either left without Cu (-Cu), received Cu super-depletion (-Cu, +BCS), or further Cu treatment (+Cu) for up to 120 h. Cell pellets were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until further procedure.

2.3. Cell viability assay

For the MTT assay, cells were seeded in 96-well plates. After 72 h of incubation with Se and Cu, 20 μl of 5 mg/ml thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich) was added to the media. After 3 h, media were discarded followed by a 10 min shaking step with 5% (v/v) formic acid (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) in 100% isopropanol (Carl Roth) to dissolve the obtained formazan crystals. Absorption was measured at 550 nm with 690 nm as reference wavelength, using a microplate reader (Synergy H1, Biotek, Bad Friedrichshall, Germany). As an additional assay for cell viability, the cell number was determined using a hemocytometer (Neubauer chamber) and trypan blue (Sigma-Aldrich).

2.4. HEK293 reporter gene assay

Three stably transfected human embryonic kidney HEK293 cell lines with either GPX4-specific SECIS element, SECIS-free (negative control) or 100% read-through (positive control) reporter constructs [5] were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium with high glucose (DMEM; Pan-biotech, Aidenbach, Germany) with 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) P/S, and 1% (v/v) Glutamax at 37 °C and 5% CO₂. For reporter gene assay, 20,000 cells per well were seeded in 96-well plates, pre-coated with poly-L-lysine (Biochrom/Sigma-Aldrich). Cells were incubated with 0, 5, or 10 nM selenite combined with either 0, 1, or 10 μM CuSO₄ in DMEM, containing 2.5% (v/v) FCS. As positive control, 50 μg/mL G418 was added in combination with 5 nM selenite. After 72 h of incubation, media were aspirated and 40 μL of 1x lysis buffer (Promocell, Heidenberg, Germany) were added to the wells. After a 10 min shaking step, the plates were put into a freezer to support cell lysis. Renilla luciferase activity was measured after adding 100 μL Coelenterazine (2.5 μg/mL; Promocell) to 35 μL of the cell lysates using luminescence measurement in a microplate reader (Synergy H1). Relative light units (RLU) were normalized to samples incubated with 5 nM

Se only for each replicate to obtain relative read-through efficiency.

2.5. RNA isolation, reverse transcription, and quantitative real-time PCR

RNA of snap-frozen liver samples was isolated as previously described [29]. Briefly, total tissue RNA was isolated using Trizol Reagent (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). Genomic DNA was eliminated with PerfeCTa DNase I (Quanta BioSciences, Beverly, MA, USA) and reverse transcription was performed using the qScript cDNA synthesis kit (Quanta BioSciences). The mRNA of HepG2 cells was isolated with the Dynabeads mRNA DIRECT kit (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's description. The mRNA was reversely transcribed using the sensifast™ cDNA synthesis kit (Bioline Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio, USA). Real-time PCRs were performed with 1x PerfeCTa SYBR Green Supermix (Quanta, BioSciences) using cDNA-specific primers (Table 2, Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany) at a concentration of 250 nM in a total volume of 10 μL. The Mx3005P QPCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used with the following heating steps: 3 min at 95 °C, 40 cycles of 15 s at 95 °C, 20 s at 60 °C, and 30 s at 72 °C with all samples and standards measured in triplicates. Standard curves from diluted PCR products were used for quantification. Sample values were normalized to a composite factor based on the reference genes Hprt and Rpl13a. The quantification procedure was performed in accordance with the MIQE guidelines.

2.6. Western blot

To prepare protein lysates, frozen cell pellets or murine tissues were homogenized in Tris buffer (100 mM Tris (Carl Roth), 300 mM KCl (Applchem, Darmstadt, Germany), pH 7.6 with 0.1% (v/v) Triton X-100 (Serva, Heidelberg, Germany), and 0.1% (v/v) protease inhibitor (Merck/Millipore, Burlington, MA, USA) using a TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany) by a 2 × 30 s homogenizing step at maximum speed. Cellular debris was removed by centrifugation (14,000 g, 10 min, 4 °C). Protein concentration was determined by Bradford analysis (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany). SDS polyacrylamide gel electrophoresis was followed by immunoblotting of proteins to nitrocellulose membrane. After immunoblotting membranes were gently shaken for 2 min in Ponceau-S solution (0.2% (w/v) Ponceau S (Carl Roth) with 3% (v/v) trichloroacetic acid (Carl Roth) and bands were recorded by ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad). Subsequently, membranes were blocked in 5% (w/v) non-fat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.1% (v/v) Tween 20 (T-TBS) for 1 h at RT. The membranes were incubated with the following primary antibodies overnight at 4 °C: rabbit anti-GPX1 (3120-1, epitomics, Burlingame, CA, USA, 1:5000), rabbit anti-GPX2 ([30], 1:5000), rabbit anti-GPX4 (125,066, abcam, Cambridge, UK, 1:5000), rabbit anti-TXNRD1 (124,954, abcam, 1:5000), rabbit anti-TXNRD2 (180,493, abcam, 1:1000), rabbit anti-SELENOH (151,023, abcam, 1:500 (mouse tissue), 1:1000 (cell culture)), rabbit anti-MT (192,385, abcam, 1:1000), rabbit anti-CCS (137, 131, abcam, 1:5000), rabbit anti-NQO1 (34,173, abcam, 1:4000), and rabbit anti-SELENOW (600-401-A29, Rockland, Gilbertsville, PA, USA, 1:1000). As secondary antibody horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:50,000, 7074S, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) was incubated for 1 h in 5% (w/v) non-fat dry milk in T-TBS at RT. Proteins were detected using SuperSignal™ West Dura (ThermoFisher Scientific) and band intensities were quantified densitometrically by the ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad). Protein expression was normalized to ponceau staining.

2.7. Enzyme activities

The protein lysates (see section 'Western blot') were used to measure total activity of GPX [31], TXNRD [32], and NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1) [33] as described previously. Briefly, GPX activity

Table 2
Primer sequences (5' → 3').

	Gene	RefSeq-ID	Sequence
mouse	Ccs, Cu chaperone for superoxide dismutase	NM_016892.3	GATGTATTGGCCGAGCCT CACAGGCCAACCTCTCCCA
	Hprt, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	NM_013556.2	GCAGTCCCAGCGTCTG GGCCTCCATCTCCTTCAT
	Rpl13a, ribosomal protein L13a	NM_009438.5	GTTCCGGTGAAGCCTACCAG TTCCGTAACCTCAAGATCTGCT
	Mt1, metallothionein 1	NM_013602.3	CTCCTGCAAGAAGAGCTGCTGC CGCTGTTCGTACATCAGGC
	Mt2, metallothionein 2	NM_008630.2	CTGTGCCCTCCGATGATCCT CTTGTGGAAAGCCTCTTTGCAG
human	EEFSEC, selenocysteine-specific elongation factor	NM_021937.3	CCCTAGAGAACACCAAGTCCGAG TCAATGAGCTCTGGAATGCCCT
	GCLM, glutamate-cysteine ligase modifier subunit	NM_002061.3	GTTGACATGGCCTGTCAGTCTC CCCAGTAAGGCTGTAATGCTCCA
	GPX1, glutathione peroxidase 1	NM_000581.2	TACTTATCGAAGATGGGGCTCCC TTGGCGTTCTCTGATGCC
	GPX2, glutathione peroxidase 2	NM_002083.4	GTGCTGATTGAGAATGTGGC AGGATGCTGTTCTGCCCA
	GPX4, glutathione peroxidase 4	NM_002085.3	AGGCAAGCCGAAGTAAACTACAC TCTCTTCGTTACTCCTGGCT
	HPRT, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	NM_000194.2	TGGCGTCGTGATTAGTGATG GGCCTCCATCTCCTTCAT
	MT2a, metallothionein 2a	NM_005953.3	AGGGTGTCATCTGCAAAGGG TAGCAAACGGTCACGGTCAGGG
	NQO1, NAD(P)H quinone dehydrogenase 1	NM_001025434.1	CATCACAGGTAACCTGAAGACCC CTCTGGAATATCACAAGGTCTGGC
	PSTK, phosphoserine-tRNA kinase	NM_153,336	TTTGAGGCCAGTCTTGCTACC GCCAAGCAATATTCGAGCC
	RPL13A, ribosomal protein L13a	NM_012423.2	AGCCTACAAGAAAGTTGCCTATCTG TAGTGGATCTTGGCTTCTTTCTCCT
	SELENOH, selenoprotein H	NM_170746.2	GCTTCCAGTAAAGGTGAACCCGA TCAGGGAATTTGAGTTTGGCTGG
	SELENO P, selenoprotein P	NM_005410	GAAACTCCATGCCTCATTACCAT CTGCCTATGCTGACCCCTGTG
	SELENO W, selenoprotein W	NM_003009.2	GCGGAAGTTGACGTACAAGTC CGGTACCATCACTTCAAAGAACC
	SEPHS2, selenophosphate synthetase 2	NM_012,248	GACGGTTTGGGCTTCTTCAAGG TCCACAATGCCAAGCATCCAC
	SEPSECS, Sep (O-phosphoserine) tRNA-Sec tRNA synthase	NM_016955.3	CTAGTGCTCCCGCTTATTCGCC CTGGACACTGGCCCTTCTCCAG
	TXNRD1, thioredoxin reductase 1	NM_015762.1	GTGTTGTGGGCTTTCACGTA TGTTGTAATACCTCTGCACAGAC

was measured using a NADPH-consuming glutathione reductase (GR)-coupled assay, and TXNRD activity was determined by NADPH-dependent reduction of 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) to 2-nitro-5-thiobenzoic acid (TNB). NQO1 activity was conducted using the menadione-mediated reduction of MTT. For measurement of direct effects on the GPX and TXNRD assay both containing EDTA in the reaction mix, Cu, BCS, and TTM were added in increasing concentrations 15 min prior to measuring of enzyme activities to the cell lysates obtained from cells cultured with 50 nM selenite for 72 h. All enzymatic activity measurements were conducted in triplicates using a 96-well plate and a microplate reader (Synergy H1) and were normalized to protein content (Bradford analysis, see section 'Western blot').

2.8. Determination of free thiols and total GSH

Measurement of free thiols and GSH was conducted as described earlier [34]. Briefly, supernatants of cultured cells were used to determine free thiols by thiol-mediated reduction of DTNB to TNB. TNB was measured photometrically at 412 nm and normalized to the protein content of the obtained cell lysates. For total GSH determination, cell pellets were lysed in 10 mM HCl (Carl Roth) using ultrasonification (10x, 80% amplitude, 0.5 s) followed by centrifugation (8000×g, 30 s, RT) to remove cellular debris. Supernatants were incubated for 10 min with 5% (w/v) 5-sulfosalicylic acid (Sigma-Aldrich) at RT to precipitate proteins. After an additional centrifugation step (8000×g, 15 min, 4 °C), samples were used to measure total GSH. The GR-mediated

NADPH-consuming reduction of GSSG was coupled to the formation of TNB, which was measured photometrically at 412 nm. The total GSH content was calculated using a standard curve and was normalized to the protein content of samples. For GSH depletion, cells were treated for 24 h with 0.25 mM buthionine-sulfoximine (BSO, Sigma-Aldrich).

2.9. Measurement of Se and Cu content

Cu content of cell lysates and media samples was measured using a bench-top total reflection X-ray fluorescence (TXRF) spectrometer (S2 Picofox™, Bruker Nano GmbH, Berlin, Germany). As internal standard 1 mg/mL Yttrium (Merck/Millipore) was used. 10 µL of each sample were placed on siliconized quartz glass carriers and dried at 40 °C. Samples were measured in duplicates for up to 500 s. Cu and Se content in liver and colon tissue and Se content of HepG2 cells were determined using ICP-MS/MS. Preparation of samples was described previously [29]. Briefly, samples were weighted into PTFE microwave vessels. HNO₃ (65% (v/v), Suprapure®, Merck/Millipore), H₂O₂ (30% (v/v), Sigma-Aldrich/Merck), rhodium (Rh) as internal standard, and ⁷⁷Se as isotope dilution standard were added before digestion using a Mars 6 microwave digestion system (CEM, Kamp-Lintfort, Germany). After digestion, samples were diluted to achieve final concentrations of 2.93% (v/v) HNO₃, 10 µg/L ⁷⁷Se, and 1 µg/L Rh. The samples were measured using ICP-MS/MS (8800 ICP-QQ-MS, Agilent Technologies) and analyzed as described earlier [29]. Certified reference materials, namely fish muscle (ERM BB-422) and pig kidney (ERM BB-186) were used as

quality control of digestion and to cross validate TE analysis using TXRF and ICP-MS/MS.

2.10. Statistics

Data are given as mean + SD. Statistical significance was calculated using GraphPad Prism version 8 (San Diego, CA, USA) with one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's post-test as indicated in the figure legends. Correlation analysis was performed using calculation of Pearson correlations coefficients. A p-value below 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Cu inhibits the mRNA expression of GPX1 and selenoprotein W but does not modulate the cellular redox homeostasis

We used data provided via GEO profiles from a microarray study performed in HepG2 cells treated with 100 μM CuSO_4 [35]. Searching for selenoprotein transcripts within the whole transcriptome, data revealed that out of the 25 human genes encoding for selenoproteins, seven were detected by this microarray approach. While GPX3 and GPX4 were not significantly modulated by Cu treatment, five transcripts were significantly altered. Out of those, GPX2 and TXNRD1 mRNA levels were upregulated and GPX1, SELENOP, and SELENOW mRNA levels were downregulated. As expected, high fold changes were observed for the two Cu-responsive genes metallothionein MT1A and MT2A (Fig. 1A).

As selenoprotein mRNA levels are also affected by Se, we extended the microarray experiment by adding lower concentrations of CuSO_4 (25, 50, and 100 μM) combined with a low or adequate Se supply (0 and 50 nM selenite). Cell number and metabolic activity (MTT reduction activity) as measures for cell viability were unaffected by the two lower doses of CuSO_4 while treatment with 100 μM CuSO_4 resulted in a reduction of about 20% for both parameters independent of the Se status of the cells (Figs. S1A and B). Using qPCR, we observed a concentration-

dependent upregulation of MT2a mRNA by CuSO_4 up to a fold change of 20 which was decreased by co-treatment with selenite (Fig. 1B). mRNA levels of GPX1 (Fig. 1C) and SELENOW (Fig. 1D) were significantly downregulated by Cu, but this reduction was only detectable either under -Se conditions for GPX1 or under +Se conditions for SELENOW. In addition, mRNA expression levels of SELENOP (Fig. S1C) and SELENOH (Fig. S1D) showed a trend for a Cu-induced downregulation under -Se conditions. GPX2 mRNA levels were upregulated by Cu (Fig. S1E) while TXNRD1 (Fig. S1F) and GPX4 (Fig. S1G) mRNA levels were unaffected by Cu.

As GPX2 and TXNRD1 are regulated by Nrf2, we next aimed to characterize effects of the experimental set-up on the cellular redox homeostasis. Based on the microarray data, additional Nrf2 target genes were upregulated by Cu including both subunits of the glutamate-cysteine ligase (GCL; Fig. S1H), which could be confirmed by qPCR for GCLM (Fig. S1I). In addition, the Nrf2 target gene NQO1 was significantly induced in the microarray and qPCR (Fig. S1J). However, this effect could not be observed for NQO1 protein expression (Fig. S1K). The intracellular GSH concentration was not affected by Cu but slightly decreased in selenite-treated cells (Fig. S1L), while the concentration of extracellular free thiols was downregulated by Cu independent of the Se supply (Fig. 1M). This indicates that moderately increasing the Cu supply above normal levels does not result in oxidative stress but induces a very mild Nrf2 response.

3.2. Cu modulates protein expression of glutathione peroxidases

Next, we aimed to analyze if the combined Se and Cu treatments not only affect mRNA expression but also protein levels. As expected, protein expression of GPX1, GPX2, GPX4, and SELENOH (Fig. 2A–D) increased in a Se-dependent manner while TXNRD1 and TXNRD2 (Fig. 2E and F) were unaffected by the Se status. The most pronounced inhibitory Cu effects were observed for GPX4 which was decreased by Cu treatment under -Se conditions but rather unaffected under +Se conditions (Fig. 2C). A comparable effect was observed for GPX1 which however only showed a trend for a decreased expression in the 100 μM

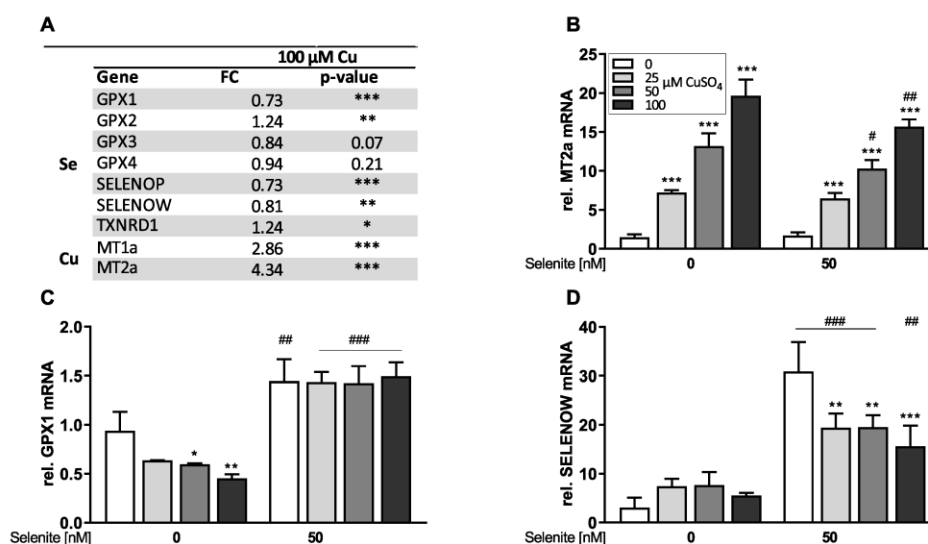


Fig. 1. Expression of Se- and Cu-dependent genes in HepG2 cells. Microarray data provided by GEO Profiles (GEO Series Accession No. GSE9539) [35] obtained from HepG2 cells treated for 24 h with 100 μM CuSO_4 (A). Data are given as fold change (FC) relative to the untreated control ($n = 3$). qPCR results of various Se- and Cu-responsive genes analyzed in HepG2 cells cultured with increasing Cu concentrations (0, 25, 50 or 100 μM) combined with or without 50 nM selenite for 48 h (B–D). Gene expression was normalized to the reference genes RPL13A and HPRT. Untreated cells of the first replicate were set as 1. Data are depicted as mean + SD ($n = 3$). Statistical analyses were based on two-way ANOVA with Bonferroni's post-test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. 0 μM CuSO_4 and # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ vs. 0 nM Se.

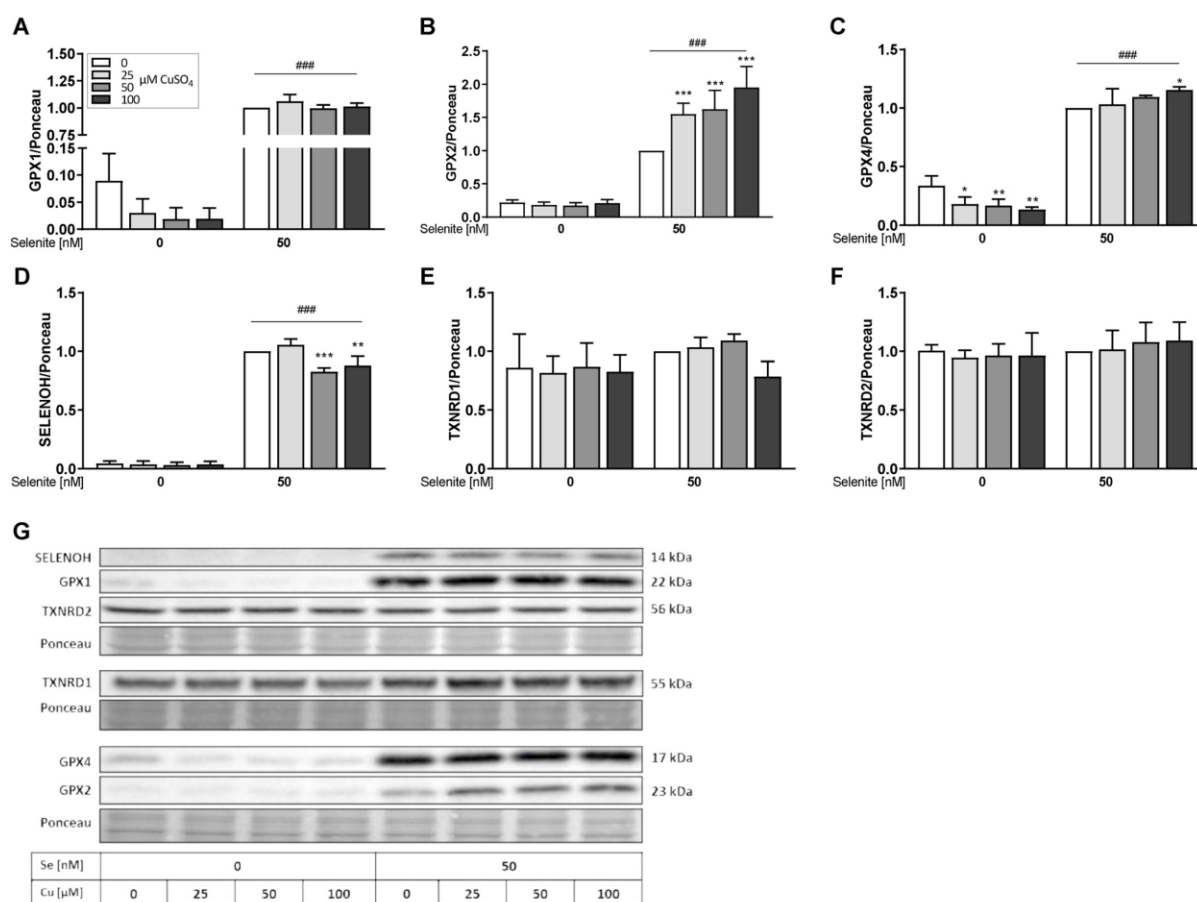


Fig. 2. Cu modulates the expression of several selenoproteins. HepG2 cells were treated with increasing Cu concentrations (0, 25, 50 or 100 μM) in combination with or without 50 nM selenite for 72 h. Protein expression was determined using Western blot, normalized to Ponceau staining. Samples with Se treatment and without Cu were set as 1 (A–F). Representative blots are shown (G). Data are depicted as mean \pm SD ($n = 3$ –4). Statistical analyses were based on two-way ANOVA with Bonferroni's post-test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. 0 μM CuSO_4 and ### $p < 0.001$ vs. 0 nM Se.

Cu treatment group without Se ($p = 0.08$) (Fig. 2A). In contrast, GPX2 protein expression was unaffected by Cu under -Se conditions but increased with Cu treatment under +Se conditions (Fig. 2B). SELENOH, TXNRD1, and TXNRD2 (Fig. 2D–F) protein expression levels were rather unaffected by Cu treatment. The expression of the Cu marker proteins MT and CCS was not modulated by any of the treatment conditions (Figs. S2A–C).

3.3. GPX and TXNRD activities are downregulated by Cu treatment

Next, we aimed to identify potential Cu effects on total enzyme activities of GPX and TXNRD. Both GPX and TXNRD activities were upregulated by an increasing Se supply (Fig. 3A, C). Cu treatment resulted in a significant decrease of total GPX activity down to about 80% which was, however, only detectable in selenite-treated cells (Fig. 3A). In contrast, TXNRD activity was inhibited by Cu to about 50% which was independent of the cellular Se status (Fig. 3C). These Cu-induced effects on GPX and TXNRD activities were confirmed using another cell line, namely HT-29 (Figs. S3A and B). In addition, we used SeMet as an alternative selenocompound for studying interactions between Cu and Se. Also in SeMet-treated cells, Cu co-treatment efficiently inhibited GPX and TXNRD activities (Figs. S3C and D). To exclude that Cu directly interfered with the assays, e.g. by binding to NADPH,

increasing Cu concentrations were added to the reaction mixture of the GPX (Fig. 3B) or TXNRD (Fig. 3D) assay 15 min prior to measurement. None of the tested Cu concentrations affected the GPX assay (Fig. 3B). TXNRD activity was stable up to 1 μM of added Cu but inhibited by a very high CuSO_4 concentration of 100 μM (Fig. 3D). But even this high Cu concentration was not resulting in a comparable inhibition of TXNRD activity as observed in cultured cells (Fig. 3C).

3.4. Cu treatment decreases read-through and thus UGA recoding efficiency

To clarify whether Cu affects the selenoprotein synthesis machinery, mRNA expression levels of genes encoding for factors essential for selenoprotein synthesis were analyzed. Out of the four tested genes, only SEPHS2 was sensitive towards the Se status and was downregulated under conditions of Se supply (Fig. 4A). SEPECS expression was diminished upon treatment with 100 μM CuSO_4 which was only observed under +Se conditions (Fig. 4B). PSTK and EEFSEC expression was neither affected by Se nor by Cu treatment (Figs. S4A and B). To verify intracellular Se availability for cells upon Cu treatment, the cellular Se content was determined. The Se content was increased with increasing Cu concentrations and was almost doubled with highest Cu concentration under +Se conditions. Under -Se conditions, there was no

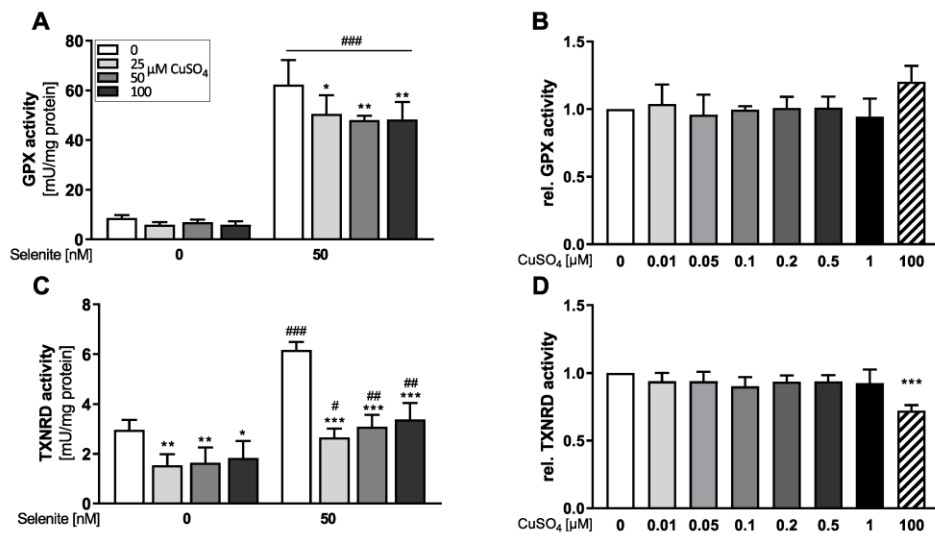


Fig. 3. Cu decreases selenoprotein activity, but does not directly affect enzyme activity within the assay. HepG2 cells were cultured with increasing Cu concentrations (0, 25, 50 or 100 μ M) in combination with or without 50 nM selenite for 72 h (A, C). Lysates of selenite supplemented (50 nM for 72 h) cells were used to measure the direct impact of Cu on enzyme activities (B, D). Increasing concentrations of Cu were added 15 min prior to measurement of enzyme activities and were normalized to lysates without additional Cu. Activities of GPX (A, B) and TXNRD (C, D) were measured photometrically and normalized to protein content. Data are depicted as mean + SD (n = 3-4). Statistical analyses were based on two-way ANOVA with Bonferroni's post-test (A, C) or one-way ANOVA (B, D) with Bonferroni's post-test. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 vs. 0 nM CuSO₄ and #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001 vs. 0 nM Se.

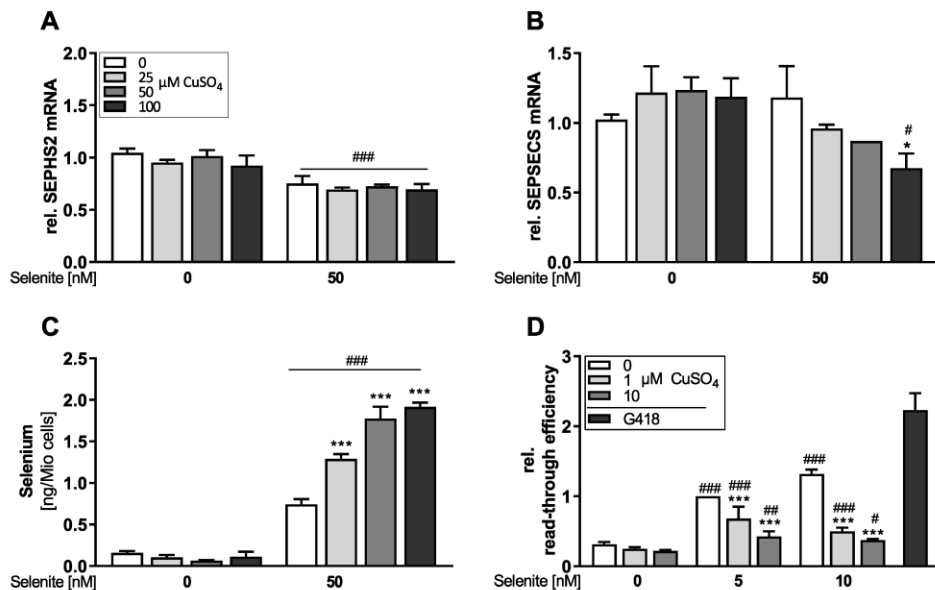


Fig. 4. Cu affects gene expression of the selenoprotein synthesis machinery, the cellular Se content and read-through efficiency. HepG2 cells were cultured with increasing Cu concentrations (0, 25, 50 or 100 μ M) in combination with or without 50 nM selenite for 48 h. Gene expression was analyzed by qPCR and normalized to the reference genes RPL13A and HPRT (A, B) and untreated cells of first replicate were set as 1. The Se content of cell lysates was measured using ICP-MS/MS (C). Read-through efficiency was measured using HEK293 cells stably transfected with a reporter gene vector containing the SECIS element of GPX4. Cells were cultured with 1 or 10 μ M CuSO₄ in combination without or with 5 and 10 nM selenite for 72 h. Read-through efficiency was determined by luminescence measurement and was shown relative to cells treated with 5 nM selenite (D). G418 (+5 nM Se) was used as positive control. Data are depicted as mean + SD (n = 3). Statistical analyses were based on two-way ANOVA with Bonferroni's post-test. *p < 0.05; ***p < 0.001 vs. 0 μ M CuSO₄ and #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001 vs. 0 nM Se.

Cu effect on intracellular Se levels (Fig. 4C). Another way of modulating selenoprotein expression is via affecting the SECIS read-through efficiency. We used the SECIS element of GPX4 to test for a potential Cu

effect. Cu downregulated the read-through efficiency in a concentration-dependent manner under +Se conditions. G418 was used as a positive control and doubled read-through efficiency (Fig. 4F). Both, control cells

transfected with the positive control vector with 100% read-through and the SECIS-free negative control vector were unaffected by Cu treatment (Figs. S4C and D).

3.5. Reversal of Cu effects on selenoprotein expression and activity by Cu chelators

To study the Cu specificity of the effects observed, we established treatment conditions with two different Cu specific chelators, namely BCS and TTM. The Cu content of the cells increased by Cu treatment but remained unaffected by Se co-treatment (Fig. 5A). After 24 h of BCS treatment, the intracellular Cu content decreased to 55%, whereas intracellular Cu increased in response to TTM treatment (Fig. 5A). These findings are supported by previously published data showing that BCS is an extracellular chelator [36]. BCS efficiently decreased the intracellular Cu content not only after 24 h of treatment (Fig. 5A), but also over a period of five days, when supplied to Cu-supplemented cells (Fig. S5A). BCS was able to sequester Cu from cells which resulted in Cu accumulation in the media (Fig. S5B). In contrast, TTM is known to be taken up into cells and is supposed to bind and accumulate Cu there [36] which results in higher cellular Cu levels (Fig. 5A). However, this TTM-bound Cu is not available as free Cu and is thus less bioactive.

Accordingly, co-treatments with each of the two chelators were used to test whether Cu-induced effects on selenoproteins and Cu-related biomarkers can be reversed. The Cu-induced increase of MT2a mRNA expression was efficiently diminished by the two chelators, but most strongly by BCS reaching almost basal MT2a expression levels (Fig. 5B).

Again, MT2a expression was also repressed by an increasing Se supply. CCS protein expression was increased when TTM but not BCS was added to the -Cu groups (Fig. 5C). The Cu-induced downregulation of SEPSSECS was reversed by BCS, but not by TTM (Fig. 5D). Co-treatment with each of the two chelators blocked the Cu-induced inhibition of GPX activity (Fig. 5E). The protein expression of different GPXs again was only marginally affected (Figs. S5C and D). We also measured a putative direct influence of BCS and TTM on the GPX activity assay, which was not observed (Figs. S5G and H). The Cu-induced inhibition of TXNRD activity was not only reversed by BCS treatment, but TXNRD activity even further increased above basal levels. In contrast, TTM did not reverse the Cu-mediated inhibition of TXNRD activity. Interestingly, TXNRD activity was generally increased in TTM-treated cells (Fig. 5F). Although effects on TXNRD activity were detectable, the protein expression of neither TXNRD1 nor TXNRD2 was affected by Cu or the chelators (Figs. S5E and F). As shown for GPX activity, the two chelators had no direct effect on the TXNRD activity assay (Figs. S5I and J).

3.6. In vivo interactions of Se and Cu

To further elucidate if Cu interferes with selenoprotein synthesis and activity also *in vivo*, we performed a mouse study with suboptimal or adequate amounts of Se and Cu supplied by the drinking water. The Se and Cu status of all mice was characterized by measuring the concentrations of both TEs in liver samples as the central metabolic organ for TEs and in colon samples to study local effects between the luminal content and the organism. The Se concentrations of both liver (Fig. 6A)

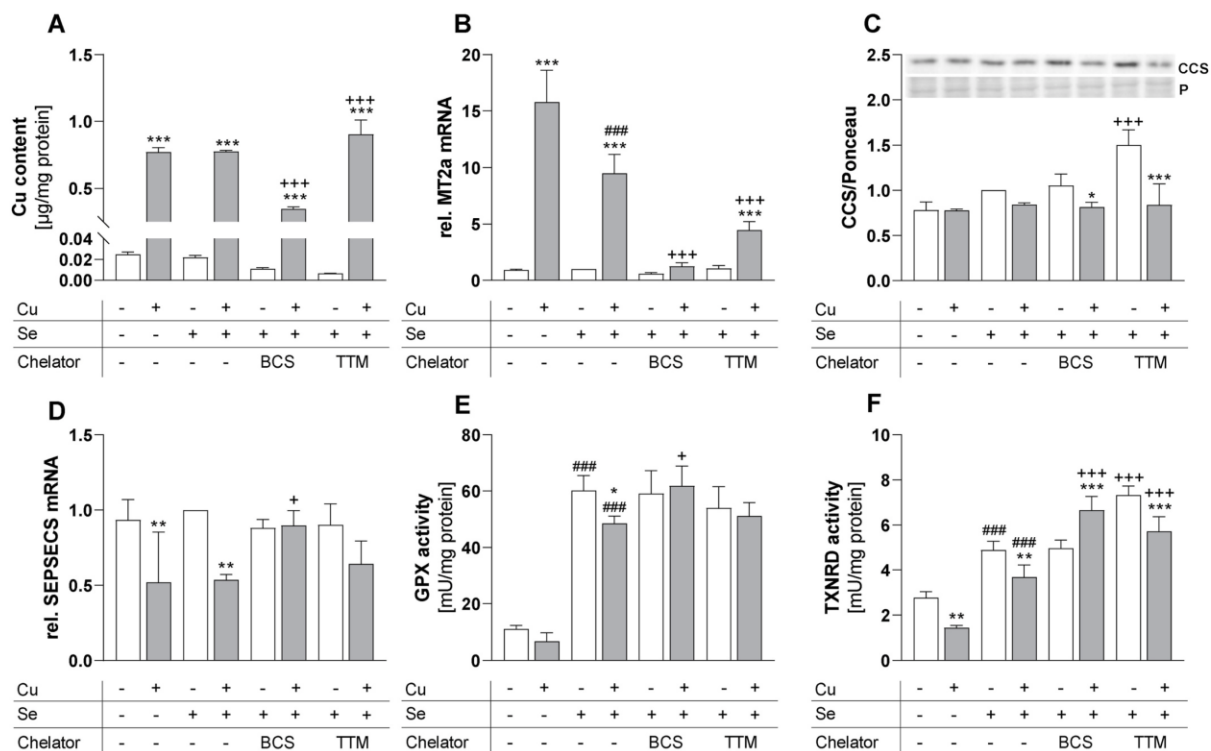


Fig. 5. Cu-induced effects could be reversed by co-treatment with the Cu chelators BCS and TTM. HepG2 cells were treated with 100 µM CuSO₄ in combination with or without 50 nM selenite for 72 h. After 48 h of incubation, the two chelators bathocuproine disulfonic acid (BCS, 400 µM) or tetrathiomolybdate (TTM, 75 µM) were added to the cells. Cu content (A) was measured using TXRF and normalized to protein content. Gene expression (B, D) was determined via qPCR and normalized to the reference genes RPL13A and HPRT. Protein expression (C) was normalized to Ponceau staining (P). Cells with Se, but without chelator or Cu treatment were set as 1. Enzyme activities of GPX and TXNRD (E, F) were measured photometrically. Data are depicted as mean + SD (n = 4). Statistical analyses were based on two-way ANOVA with Bonferroni's post-test. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 vs. 0 µM CuSO₄; ###p < 0.001 vs. 0 nM Se, and †p < 0.05; †††p < 0.001 vs. -chelator.

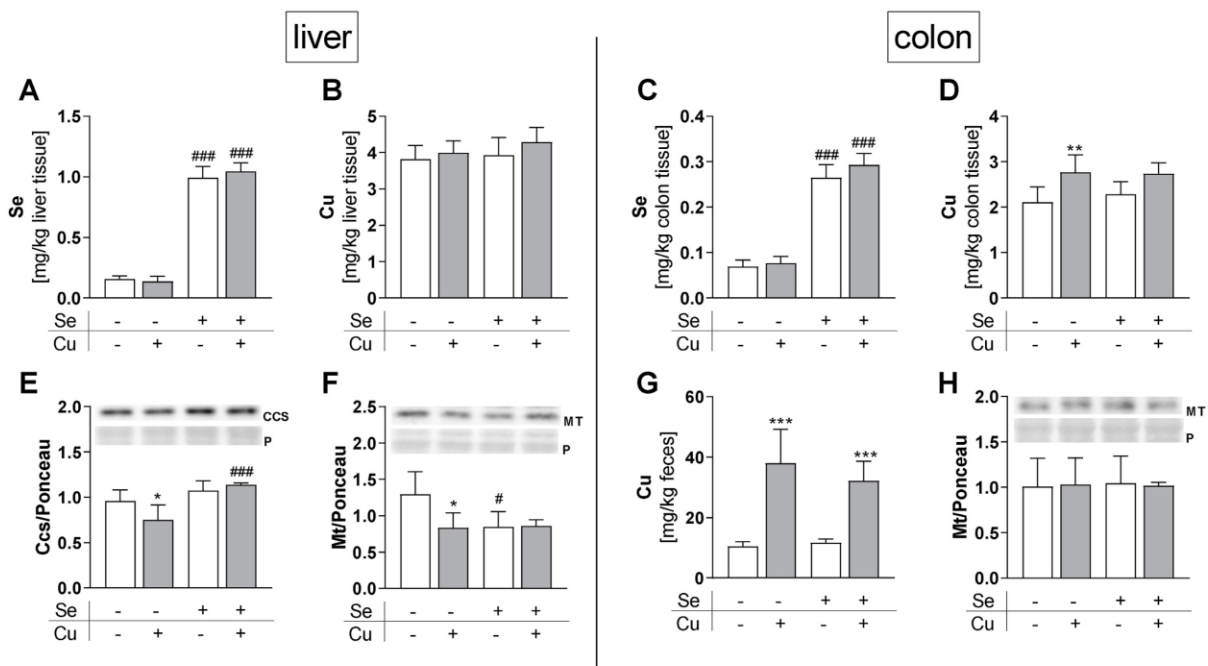


Fig. 6. Dietary intervention with the TEs Cu and Se. Se and Cu contents in liver (A, B), and colon (C, D) of mice supplied with suboptimal (0.02/1.6 ppm) or adequate (0.15/6 ppm) amounts of Se and Cu were determined using ICP-MS/MS. Protein expression (E, F, H) was normalized to Ponceau staining (P). Data are depicted as mean \pm SD (n = 5). *p < 0.05; ***p < 0.001 vs. -Cu; #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001 vs. -Se calculated based on two-way ANOVA with Bonferroni's post-test.

and colon (Fig. 6C) were strongly different in relation to the Se supply, indicating that the feeding conditions were well suitable to modulate the Se status. However, even though there was a 3.75-fold difference in Cu supply between -Cu and +Cu mice, no differences in hepatic Cu levels were observed (Fig. 6B). A difference in Cu concentrations was detectable in the colon only (Fig. 6D), which was even far more pronounced in the feces (Fig. 6G). To further characterize the Cu status of the mice, expression levels of Cu-dependent proteins were analyzed. Hepatic Ccs protein expression was downregulated by Cu which was, however, only detectable under -Se and not under +Se conditions (Fig. 6E). Ccs transcript levels were not significantly modulated by Cu or Se in the liver (Fig. S6A). Mt protein expression was upregulated under conditions of low Se and Cu supply in the liver (Fig. 6F), but not in the colon (Fig. 6H). The mRNA expression in the liver of both, Mt1 and Mt2 was not significantly affected by Se or Cu (Figs. S6B and C) but revealed a comparable pattern as shown on protein level with higher expression under -Cu/-Se conditions. Based on this, we concluded that the Se status was successfully modulated systemically while the Cu status was only locally modulated in the colon and not in the liver.

Next, we studied whether the Cu-induced effects on selenoproteins can be detected *in vivo* despite the marginal changes in systemic Cu status. While hepatic Gpx activity was not modulated by Cu (Fig. 7A), hepatic Txnrd activity was repressed as already observed *in vitro*, however to a smaller extent and only under +Se conditions (Fig. 7B). Hepatic selenoprotein expression was not affected by Cu (Fig. 7E, F, I, J, S6D-F). In the colon, neither Gpx (Fig. 7C) nor Txnrd (Fig. 7D) activity was downregulated by Cu, which was in line with stable Txnrd1 and Txnrd2 protein expression (Fig. 7G and H). In contrast to the *in vitro* results, colonic protein expression of Gpx1 was not downregulated but even upregulated by Cu under +Se conditions (Fig. 7K). Also, Selenoh showed a Cu-induced upregulation of protein expression in colon tissue (Fig. 7L). Hepatic Nqo1 activity was not affected by the Cu supply (Fig. S6K).

4. Discussion

Metabolism of the single TEs, Se and Cu, is characterized well, but interactions of both are rarely investigated. Therefore, we addressed the question of whether Cu interferes with Se metabolism in *in vitro* and *in vivo* experiments. We performed a mouse feeding study with suboptimal (0.02/1.6 ppm) and adequate (0.15/6 ppm) amounts of Se and Cu, respectively, which were supplied via the drinking water. This way, we aimed to address dietary changes of these two TEs in a physiologically relevant concentration range. For Se, both the hepatic concentration (Fig. 6A) and total Gpx activity (Fig. 7A) were downregulated to 14% or 4% in relation to the +Se group, which is in line with previous feeding experiments using the Se-deficient torula yeast diet [37,38]. However, the Cu status was affected only marginally by our intervention, because the low Cu content of the diet was obviously enough to maintain Cu homeostasis efficiently. Hepatic Cu concentrations were unaffected (Fig. 6B) which has previously been described with an even lower Cu supply [39]. Hepatic Cu only responds to severe feeding-induced Cu deficiencies [19,40,41] or in knockout mouse models e.g., for Ctr [42, 43] or Atp7b [44]. Even though, there was no effect on Cu concentrations, Cu-responsive proteins such as Mt and Ccs were upregulated in the -Se/-Cu group (Fig. 6E and F). In contrast to the liver, the Cu concentration was decreased by the low Cu diet in the colon (Fig. 6D) but the effect was rather small. In response to low dietary intake, the intestinal Cu absorption strongly increases in mice [39] and in humans [45], leading to very low fecal content compared to adequately Cu-supplied mice [39]. Also herein, the treatment effect on the fecal Cu concentration was most pronounced (Fig. 6G). Overall, we successfully modulated the Se status whereas the Cu status remained largely unaffected by our experimental design.

The following results were obtained regarding *in vivo* interactions of both elements: (1) no effect on Cu levels in colon and liver after modulating the Se status from an adequate towards a suboptimal supply.

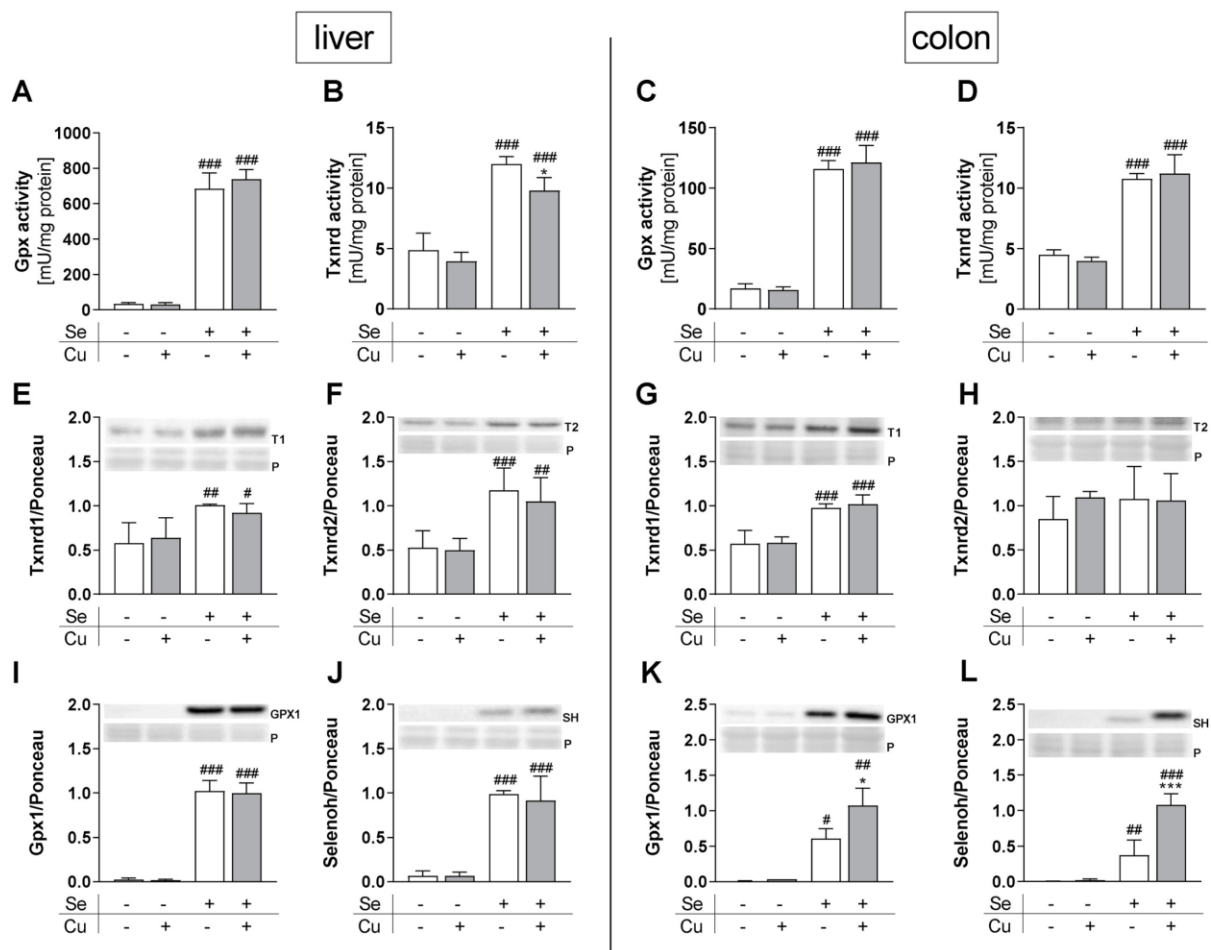


Fig. 7. Activity and expression of selenoproteins in vivo. Enzyme activities of GPX (A, C) and TXNRD (B, D) and selenoprotein expression in liver and colon (E–L) of mice supplied with suboptimal (0.02/1.6 ppm) or adequate (0.15/6 ppm) amounts of Se and Cu were determined photometrically or using Western blot, respectively. Proteins (T1 = Txnrd1; T2 = Txnrd2; SH = Selenoh) were normalized to Ponceau staining (P). Data are depicted as mean \pm SD ($n = 5$). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ vs. -Cu; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ vs. -Se calculated based on two-way ANOVA with Bonferroni's post-test.

This is in line with previous studies showing stable hepatic Cu levels with increasing Se concentrations [46,47]. However, we observed Cu-induced effects on Cu-responsive proteins such as Mt and Ccs (Fig. 6E and F) that were more pronounced under Se deficiency compared to an adequate Se supply indicating an interplay which warrants further investigation. (2) *Vice versa*, we did not observe any effect of Cu on the Se concentration in the liver or colon, but this might be due to the fact that the Cu status was only very marginally affected by our dietary intervention. Unexpectedly, we observed an upregulation of Gpx1 and Selenoh in the colon of the +Se/+Cu group (Fig. 7K and L). Atp7b knockout mice with hepatic Cu accumulation have increased levels of Selenoh in liver nuclei. The nuclear abundance of Selenoh in these mice is supposed to be connected to oxidative stress as a result of excessive Cu accumulation [48]. However, this is unlikely to be the case in our +Se/+Cu mice, as the activity of the Nrf2 target gene Nqo1 as indicator for the hepatic redox balance was not increased but rather decreased in mice of this group (Fig. S6K). In sheep, an increase in hepatic Se concentrations was observed following Cu administration [49] which was also observed herein in HepG2 cells (Fig. 4C).

Thus, under low to adequate conditions, there are only modest interactions of Se and Cu, however, when considering adequate to

supplemented Cu concentrations, as we did in our *in vitro* experimental setting, we observed that Cu substantially interferes with selenoprotein synthesis at different levels. First, there was a Cu-dependent downregulation of transcript levels of GPX1, and SELENOW which are known to be sensitive towards a limited Se supply [50,51]. Cu even enhanced the decrease of GPX1 under low Se conditions (Fig. 1C), thus, worsening functional consequences of a Se deficiency. Interestingly, mRNA levels of SELENOW were only downregulated by Cu under conditions of an adequate Se supply (Fig. 1D) indicating that in case of SELENOW obviously higher Se concentrations are needed to upregulate mRNA levels when Cu levels are high. So far, Cu effects have been attributed mainly to an increase in oxidative stress upon Cu treatment. However, this is not likely to be the case in our experimental setting. If the cellular redox homeostasis is of relevance here, one would expect an upregulation of selenoprotein transcripts by Cu instead of a downregulation [9], which we also observed for Nrf2 target genes (Figs. S1E and F, H–K). In previous experiments, incubation of HepG2 or neuroblastoma cells with 200 μ M Cu decreased p53 reporter activity and mRNA expression of GPX1 [52,53], which is known to be regulated via p53 [54,55]. However, the inhibition of p53 activity by Cu was observed with 200 μ M only and not with lower Cu concentrations [52] which we used herein.

SELENOH and SELENOW have been described as target genes of the metal regulatory transcription factor 1 (MTF-1), but only SELENOH expression is decreased by MTF-1 e.g., in zinc-treated cells [56]. As Cu also enhances transactivation of MTF-1 [57], this could potentially be involved in the regulation of the indicated selenoprotein mRNA levels.

Second, Cu downregulated SEPSECS mRNA expression (Fig. 4B) and read-through efficiency exemplarily shown for the SECIS element of GPX4 (Fig. 4D) indicating that Cu repressed selenoprotein synthesis. SEPSECS expression has been previously shown to be decreased during acute phase response in lipopolysaccharide-treated mice [58]. Interestingly, the effects on SEPSECS and on read-through efficiency were observed in Se-treated cells only. Thus, even though the cells accumulated more Se when co-treated with Cu (Fig. 4C), they use this Se less efficiently to synthesize selenoproteins. This is also in line with the previous finding that selenoprotein mRNAs which are most sensitive towards limited Se availability (such as GPX1) mostly react on the Cu supply. Interestingly, it has been shown that remodeling of the RNA processing machinery is taking place in cells with elevated Cu [48]. Via this mechanism Cu could also interfere with selenoprotein synthesis.

The UGA recoding event is the rate limiting step of selenoprotein expression. Besides Se bioavailability, other exogenous stimuli are discussed to be modulators of Sec insertion efficiency [59]. The Cu status obviously is one of them. However, the Cu effects on read-through efficiency are mirrored only marginally on the protein levels, the third level of interaction between Cu and selenoproteins. For GPX4, a decreased expression following Cu incubation was observed under low Se conditions only, while especially GPX2 was upregulated by Cu under adequate Se conditions (Fig. 2B and C). As shown before, protein levels of selenoproteins are not very informative here because impairments of read-through efficiency could result in enhanced misincorporation of wrong amino acids instead of Sec. This effect has previously been observed after cells were treated with different antibiotics. Especially GPX1, GPX4, and TXNRD1 were highly sensitive towards replacement of Sec by cysteine or arginine [60]. Also under Se deficiency, an alternative aminoacylation of the tRNA^{Sec/Sec} with cysteine has been proposed resulting in cysteine variants of selenoproteins with lower enzymatic activity [61–63]. Indeed, the fourth level of Cu-induced modulation takes place at the activity level, where both total GPX and particularly TXNRD activity are inhibited by Cu. This inhibition was observed in two cell lines (HepG2 and HT29 cells) and upon co-treatment with any of two different selenocompounds, i.e., selenite and SeMet (Fig. 3A, C; S3A–D). In both cases, activity levels cannot be directly explained by changes in protein expression. All three GPXs (GPX1, 2, and 4) are unaffected or even increased by Cu under Se adequate conditions which was also the case for TXNRD1 and TXNRD2 (Fig. 2A–C, E, F). Based on this, we were wondering whether Cu can directly interfere with enzymatic assay conditions, e.g., by binding to NADPH but this was not the case, at least for the Cu concentrations that we presumably reached in our cell lysates (Fig. 3B, D). However, we could show that extracellular thiol concentrations were decreased upon Cu treatment (Fig. S1M) indicating that Cu modulates the cellular redox balance as previously extensively discussed [64]. Interestingly, previous results on the influence of Cu on GPX activity were rather heterogeneous. Similar to the data presented, treatment with 100 μ M Cu showed no effect on GPX activity in HepG2 cells when no further Se was added to cells [65]. In contrast to our results, GPX activity has been reported to be decreased in Cu deficient liver and plasma of mice and rats [23–25]. However, in line with our results GPX activity was significantly lower in LEC rats, an animal model for Wilson's disease, with hepatic Cu accumulation in comparison to rats with lower Cu levels [66], and in Wistar rats that received an injection with Cu [67]. A lower activity of the antioxidant enzymes GPXs and TXNRDs by higher levels of Cu could contribute to Cu-induced oxidative damage and thus amplify the severity of liver disease. Also in Wilson's disease patients hepatic GPX activity is inhibited but only at stage III. The authors concluded from this result that GPX expression is first enhanced in early stages and is decreased

only when the liver is severely damaged [68]. Regarding this hypothesis, we can exclude cytotoxic Cu effects for the Cu concentrations that we used herein as mechanism for the observed inhibition of GPX activity. In another clinical study on Wilson's disease, treatment naive patients were compared with patients receiving Cu reducing therapy. In those patients, higher serum Cu levels were associated with higher and not lower whole blood GPX activity [69]. For Cu effects on TXNRD activity, little data is available from the literature. But there are many well established metal- and semimetal-containing TXNRD inhibitors [70]. Here, the *in vitro* inhibition of TXNRD activity could be recapitulated in the liver of +Se/+Cu compared to +Se/-Cu mice but not in the colon though the hepatic Cu status was only very marginally affected by our intervention (Fig. 6B; 7B). Thus, Cu effects on selenoprotein activity obviously depend on multiple factors including the Cu concentration range and the organ analyzed.

To mechanistically extend the *in vitro* results, we used the two Cu chelators BCS and TTM [42,71]. Two distinct modes of action may underlie the effects observed for BCS: i) Cu is chelated and retained in the media leading to a 50% reduction of intracellular Cu content (Fig. 5A), and ii) Cu is efficiently drained from inside the cell resulting in a super-depletion indicated by lower intracellular and higher extracellular Cu over time in comparison to cells without further BCS treatment during wash out (Figs. S5A and B). In contrast, TTM treatment results in higher intracellular Cu concentrations than in untreated cells [72,73]. Thus, treatment with both chelators resulted in decreased Cu bioavailability for the cells, but BCS appeared to be more efficient because the enhanced MT2a gene expression with Cu treatment was more strongly diminished with BCS than with TTM (Fig. 5B). This has previously also been shown in human neuroblastoma cells [74]. The observed effects on SEPSECS mRNA expression, GPX4 protein expression and on GPX and TXNRD activity were successfully reversed by chelator treatment and are thus Cu specific (Fig. 5D–F; S5C). In addition, there was a clear dependency of TXNRD activity and to a lesser extent for GPX activity on Cu availability. Cells with the lowest Cu availability (BCS-treated cells in combination with Cu and TTM without Cu) had the highest levels of TXNRD activity resulting in an inverse correlation (Fig. 8A and B). The correlation was stronger for TXNRD activity than for GPX activity.

In summary, Cu concentrations up to 100 μ M inhibit activities of GPX and TXNRD *in vitro*. However, *in vivo* the effects were rather small under conditions of a mild modulation of the Cu status in the adequate to suboptimal concentration range in healthy, young mice. The average human serum concentration of Cu ranges from 15 to 31.5 μ M [75–77], and thus concentrations used in cell culture experiments are adequate to supplemented. But under pathophysiological conditions up to 200 μ M Cu were reported in serum [78]. In liver samples of patients with Wilson's disease or of Indian childhood cirrhosis Cu concentrations of 1.142 mg/g dry weight and 4.788 mg/g dry weight, respectively, were observed [79]. This shows that very high values of Cu can be achieved in certain diseases indicating the high relevance of our *in vitro* results. Under these conditions, not only the increase in Cu levels but a potential concomitant functional decrease of selenoproteins might be driving factors for disease progression. Also under physiological conditions, serum Cu concentrations can be increased as recently described when comparing a subcohort of the EPIC Potsdam cohort which has been reinvited after 20 years. Advanced age was associated with increased Cu concentrations and decreased Se concentrations [76]. This indicates that an age-related decline in selenoprotein expression most probably is a result of a combination of lower Se concentrations and higher Cu concentration. Also during disease, the Se to Cu ratio is frequently altered, most likely as a response to acute or chronic inflammation [80,81]. Accordingly, a higher Se intake would be needed to overcome the Cu-induced suppressive effects. These findings indicate that it is meaningful to study interactions of Se and Cu, and to understand the consequences and underlying mechanisms of this interplay in order to identify measures that may help to achieve and maintain health-supporting concentrations of these redox-relevant TEs.

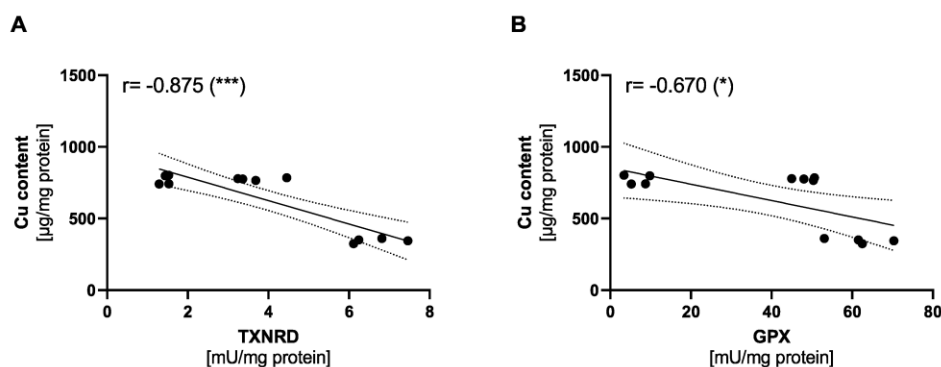


Fig. 8. Correlation of intracellular Cu content with enzyme activities of TXNRD and GPX. Correlation analysis of intracellular Cu content and enzyme activity of TXNRD (A) and GPX (B) was performed using data of HepG2 cells treated with 100 μM CuSO_4 with or without 50 nM selenite for 72 h. After 48 h of incubation, the two chelators bathocuproine disulfonic acid (BCS, 400 μM) or tetrathiomolybdate (TTM, 75 μM) were added to the cells. The TTM + Cu group was excluded from analysis because of the accumulation of non-bioactive but quantifiable intracellular Cu. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ calculated based on Pearson correlation coefficient.

Conflicts of interest

The authors declare that they do not have any conflict of interest.

Funding

This work was supported by the German Research Foundation (DFG), Germany, FOR 2558 (KI 1590/3-2).

Acknowledgement

The authors highly acknowledge the excellent technical support by Stefanie Deubel, Alrun Schumann, and Doreen Ziegenhardt.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101746>.

References

- G.V. Kryukov, et al., Characterization of mammalian selenoproteomes, *Science* 300 (5624) (2003) 1439–1443.
- V.M. Labunsky, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles, *Physiol. Rev.* 94 (3) (2014) 739–777.
- K.Y. Ko, et al., S-Glutathionylation of mouse selenoprotein W prevents oxidative stress-induced cell death by blocking the formation of an intramolecular disulfide bond, *Free Radic. Biol. Med.* 141 (2019) 362–371.
- K. Renko, et al., Aminoglycoside-driven biosynthesis of selenium-deficient Selenoprotein P, *Sci. Rep.* 7 (1) (2017) 4391.
- J. Martitz, et al., Factors impacting the aminoglycoside-induced UGA stop codon readthrough in selenoprotein translation, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 37 (2016) 104–110.
- D.E. Handy, et al., Aminoglycosides decrease glutathione peroxidase-1 activity by interfering with selenocysteine incorporation, *J. Biol. Chem.* 281 (6) (2006) 3382–3388.
- A. Banning, et al., The GPx gene is a target for Nrf2, *Mol. Cell Biol.* 25 (12) (2005) 4914–4923.
- A. Sakurai, et al., Transcriptional regulation of thioredoxin reductase 1 expression by cadmium in vascular endothelial cells: role of NF-E2-related factor-2, *J. Cell. Physiol.* 203 (3) (2005) 529–537.
- Z. Touat-Hamici, et al., Selective up-regulation of human selenoproteins in response to oxidative stress, *J. Biol. Chem.* 289 (21) (2014) 14750–14761.
- M.C. Linder, M. Hazegh-Azam, Copper biochemistry and molecular biology, *Am. J. Clin. Nutr.* 63 (5) (1996) 797S–811S.
- B. Halliwell, J.M. Gutteridge, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochem. J.* 219 (1) (1984) 1–14.
- Y. Hatori, S. Lutsenko, An expanding range of functions for the copper chaperone/antioxidant protein Atox1, *Antioxidants Redox Signal.* 19 (9) (2013) 945–957.
- B. Zhou, J. Gitschier, hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (14) (1997) 7481–7486.
- P.V. van den Berghe, et al., Human copper transporter 2 is localized in late endosomes and lysosomes and facilitates cellular copper uptake, *Biochem. J.* 407 (1) (2007) 49–59.
- M. Arredondo, et al., DMT1, a physiologically relevant apical Cu1+ transporter of intestinal cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284 (6) (2003) C1525–C1530.
- A.C. Illing, et al., Substrate profile and metal-ion selectivity of human divalent metal-ion transporter-1, *J. Biol. Chem.* 287 (36) (2012) 30485–30496.
- H. Tapiero, D.M. Townsend, K.D. Tew, Trace elements in human physiology and pathology, *Copper*, *Biomed Pharmacother* 57 (9) (2003) 386–398.
- V.C. Culotta, et al., The copper chaperone for superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.* 272 (38) (1997) 23469–23472.
- J.R. Prohaska, M. Broderius, B. Brokate, Metallochaperone for Cu,Zn-superoxide dismutase (CCS) protein but not mRNA is higher in organs from copper-deficient mice and rats, *Arch. Biochem. Biophys.* 417 (2) (2003) 227–234.
- J.H. Freedman, M.R. Ciriolo, J. Peisach, The role of glutathione in copper metabolism and toxicity, *J. Biol. Chem.* 264 (10) (1989) 5598–5605.
- J. Jiang, et al., Contribution of glutathione and metallothioneins to protection against copper toxicity and redox cycling: quantitative analysis using MT+/+ and MT-/- mouse lung fibroblast cells, *Chem. Res. Toxicol.* 15 (8) (2002) 1080–1087.
- O.M. Steinebach, H.T. Wolterbeek, Role of cytosolic copper, metallothionein and glutathione in copper toxicity in rat hepatoma tissue culture cells, *Toxicology* 92 (1–3) (1994) 75–90.
- Y. Chen, J.T. Saari, Y.J. Kang, Weak antioxidant defenses make the heart a target for damage in copper-deficient rats, *Free Radic. Biol. Med.* 17 (6) (1994) 529–536.
- K.L. Olin, R.M. Walter, C.L. Keen, Copper deficiency affects selenogluthathione peroxidase and selenodiodinase activities and antioxidant defense in weanling rats, *Am. J. Clin. Nutr.* 59 (3) (1994) 654–658.
- J.R. Prohaska, R.A. Sunde, K.R. Zinn, Livers from copper-deficient rats have lower glutathione peroxidase activity and mRNA levels but normal liver selenium levels, *J. Nutr. Biochem.* 3 (8) (1992) 429–436.
- L.S. Jensen, Modification of a selenium toxicity in chicks by dietary silver and copper, *J. Nutr.* 105 (6) (1975) 769–775.
- R.L. Davis, J.E. Spallholz, B.C. Pence, Inhibition of selenite-induced cytotoxicity and apoptosis in human colonic carcinoma (HT-29) cells by copper, *Nutr. Canc.* 32 (3) (1998) 181–189.
- K. Silva, J. Sundberg, H. Hedrich, *The Laboratory Mouse*, 2012.
- K. Lossow, et al., Aging affects sex- and organ-specific trace element profiles in mice, *Aging (Albany NY)* 12 (13) (2020) 13762–13790.
- M. Böcher, et al., Synthesis of mono- and bifunctional peptide-dextran conjugates for the immobilization of peptide antigens on ELISA plates: properties and application, *J. Immunol. Methods* 208 (2) (1997) 191–202.
- S. Florian, et al., Loss of GPx2 increases apoptosis, mitosis, and GPx1 expression in the intestine of mice, *Free Radic. Biol. Med.* 49 (11) (2010) 1694–1702.
- S. Krehl, et al., Glutathione peroxidase-2 and selenium decreased inflammation and tumors in a mouse model of inflammation-associated carcinogenesis whereas sulfuraphane effects differed with selenium supply, *Carcinogenesis* 33 (3) (2012) 620–628.
- M. Müller, et al., Nrf2 target genes are induced under marginal selenium-deficiency, *Genes Nutr.* 5 (4) (2010) 297–307.
- J.R. Winther, C. Thorpe, Quantification of thiols and disulfides, *Biochim. Biophys. Acta* 1840 (2) (2014) 838–846.
- M.O. Song, J. Li, J.H. Freedman, Physiological and toxicological transcriptome changes in HepG2 cells exposed to copper, *Physiol. Genom.* 38 (3) (2009) 386–401.
- X. Ding, H. Xie, Y.J. Kang, The significance of copper chelators in clinical and experimental application, *J. Nutr. Biochem.* 22 (4) (2011) 301–310.
- M. Schwarz, et al., Crosstalk of Nrf2 with the trace elements selenium, iron, zinc, and copper, *Nutrients* 11 (9) (2019).
- C. Lennicke, et al., Individual effects of different selenocompounds on the hepatic proteome and energy metabolism of mice, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1861 (1 Pt A) (2017) 3323–3334.

- [39] K.T. Suzuki, et al., Roles of metallothionein in copper homeostasis: responses to Cu-deficient diets in mice, *J. Inorg. Biochem.* 88 (2) (2002) 173–182.
- [40] J. Chung, J.R. Prohaska, M. Wessling-Resnick, Ferroportin-1 is not upregulated in copper-deficient mice, *J. Nutr.* 134 (3) (2004) 517–521.
- [41] K.G. Allen, et al., Copper deficiency and tissue glutathione concentration in the rat, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 187 (1) (1988) 38–43.
- [42] H. Chun, et al., Organ-specific regulation of ATP7A abundance is coordinated with systemic copper homeostasis, *Sci. Rep.* 7 (1) (2017) 12001.
- [43] Y. Nose, B.E. Kim, D.J. Thiele, Ctr1 drives intestinal copper absorption and is essential for growth, iron metabolism, and neonatal cardiac function, *Cell Metabol.* 4 (3) (2006) 235–244.
- [44] D. Huster, et al., Consequences of copper accumulation in the livers of the *Atp7b*^{-/-} (Wilson disease gene) knockout mice, *Am. J. Pathol.* 168 (2) (2006) 423–434.
- [45] J.R. Turnlund, Stable isotope studies of the effect of dietary copper on copper absorption and excretion, *Adv. Exp. Med. Biol.* 258 (1989) 21–28.
- [46] W. Buckley, et al., Effect of selenium supplementation on copper metabolism in dairy cows, *Can. J. Anim. Sci.* 66 (4) (1986) 1009–1018.
- [47] M.S. Fehrs, et al., Effect of high but nontoxic dietary intake of copper and selenium on metabolism in calves, *J. Dairy Sci.* 64 (8) (1981) 1700–1706.
- [48] J.L. Burkhead, et al., Elevated copper remodels hepatic RNA processing machinery in the mouse model of Wilson's disease, *J. Mol. Biol.* 406 (1) (2011) 44–58.
- [49] J. Van Ryssen, P. Van Malsen, F. Hartmann, Contribution of dietary sulphur to the interaction between selenium and copper in sheep, *J. Agric. Sci.* 130 (1) (1998) 107–114.
- [50] R.A. Sunde, et al., Selenium status highly regulates selenoprotein mRNA levels for only a subset of the selenoproteins in the selenoproteome, *Biosci. Rep.* 29 (5) (2009) 329–338.
- [51] A. Kipp, et al., Four selenoproteins, protein biosynthesis, and Wnt signalling are particularly sensitive to limited selenium intake in mouse colon, *Mol. Nutr. Food Res.* 53 (12) (2009) 1561–1572.
- [52] N.M. Tassabehji, J.W. VanLandingham, C.W. Levenson, Copper alters the conformation and transcriptional activity of the tumor suppressor protein p53 in human Hep G2 cells, *Exp. Biol. Med.* 230 (10) (2005) 699–708.
- [53] J.W. Vanlandingham, et al., Expression profiling of p53-target genes in copper-mediated neuronal apoptosis, *NeuroMolecular Med.* 7 (4) (2005) 311–324.
- [54] M. Tan, et al., Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53, *J. Biol. Chem.* 274 (17) (1999) 12061–12066.
- [55] S.P. Hussain, et al., p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis, *Canc. Res.* 64 (7) (2004) 2350–2356.
- [56] Z.R. Stoytcheva, et al., Metal transcription factor-1 regulation via MREs in the transcribed regions of selenoprotein H and other metal-responsive genes, *Biochim. Biophys. Acta* 1800 (3) (2010) 416–424.
- [57] R. Heuchel, et al., The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression, *EMBO J.* 13 (12) (1994) 2870–2875.
- [58] K. Renko, et al., Down-regulation of the hepatic selenoprotein biosynthesis machinery impairs selenium metabolism during the acute phase response in mice, *Faseb. J.* 23 (6) (2009) 1758–1765.
- [59] C. Vindry, T. Ohlmann, L. Chavatte, Translation regulation of mammalian selenoproteins, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1862 (11) (2018) 2480–2492.
- [60] R. Tobe, et al., High error rates in selenocysteine insertion in mammalian cells treated with the antibiotic doxycycline, chloramphenicol, or geneticin, *J. Biol. Chem.* 288 (21) (2013) 14709–14715.
- [61] X.M. Xu, et al., Targeted insertion of cysteine by decoding UGA codons with mammalian selenocysteine machinery, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (50) (2010) 21430–21434.
- [62] A.A. Turanov, et al., Regulation of selenocysteine content of human selenoprotein P by dietary selenium and insertion of cysteine in place of selenocysteine, *PLoS One* 10 (10) (2015), e0140353.
- [63] J. Lu, et al., Penultimate selenocysteine residue replaced by cysteine in thioredoxin reductase from selenium-deficient rat liver, *Faseb. J.* 23 (8) (2009) 2394–2402.
- [64] A. Bhattacharjee, K. Chakraborty, A. Shukla, Cellular copper homeostasis: current concepts on its interplay with glutathione homeostasis and its implication in physiology and human diseases, *Metallomics* 9 (10) (2017) 1376–1388.
- [65] I. Jimenez, et al., Chronic exposure of HepG2 cells to excess copper results in depletion of glutathione and induction of metallothionein, *Toxicol. Vitro* 16 (2) (2002) 167–175.
- [66] H. Yamamoto, et al., Mechanism of enhanced lipid peroxidation in the liver of Long-Evans cinnamon (LEC) rats, *Arch. Toxicol.* 73 (8–9) (1999) 457–464.
- [67] J.O. Ossola, M.D. Groppa, M.L. Tomaro, Relationship between oxidative stress and heme oxygenase induction by copper sulfate, *Arch. Biochem. Biophys.* 337 (2) (1997) 332–337.
- [68] H. Nagasaka, et al., Relationship between oxidative stress and antioxidant systems in the liver of patients with Wilson disease: hepatic manifestation in Wilson disease as a consequence of augmented oxidative stress, *Pediatr. Res.* 60 (4) (2006) 472–477.
- [69] G. Gromadzka, et al., Treatment with D-penicillamine or zinc sulphate affects copper metabolism and improves but not normalizes antioxidant capacity parameters in Wilson disease, *Biomaterials* 27 (1) (2014) 207–215.
- [70] V. Gandin, A.P. Fernandes, Metal- and semimetal-containing inhibitors of thioredoxin reductase as anticancer agents, *Molecules* 20 (7) (2015) 12732–12756.
- [71] A.R. Muftic, et al., XIAP Is a copper binding protein deregulated in Wilson's disease and other copper toxicosis disorders, *Mol. Cell* 21 (6) (2006) 775–785.
- [72] F. Bulcke, et al., Modulation of copper accumulation and copper-induced toxicity by antioxidants and copper chelators in cultured primary brain astrocytes, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 32 (2015) 168–176.
- [73] H. Wei, et al., Copper chelation by tetrathiomolybdate inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in vivo, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 301 (3) (2011) H712–H720.
- [74] N. Goto, et al., Hydrogen sulfide increases copper-dependent neurotoxicity via intracellular copper accumulation, *Metallomics* 12 (6) (2020) 868–875.
- [75] S. Olusi, et al., Serum copper levels and not zinc are positively associated with serum leptin concentrations in the healthy adult population, *Biol. Trace Elem. Res.* 91 (2) (2003) 137–144.
- [76] J. Baudry, et al., Changes of trace element status during aging: results of the EPIC-Potsdam cohort study, *Eur. J. Nutr.* (2019) 1–14.
- [77] S. Kumru, et al., Comparison of serum copper, zinc, calcium, and magnesium levels in preeclamptic and healthy pregnant women, *Biol. Trace Elem. Res.* 94 (2) (2003) 105–112.
- [78] R.A. Lewis, et al., Hypercupremia associated with a monoclonal immunoglobulin, *J. Lab. Clin. Med.* 88 (3) (1976) 375–388.
- [79] S. Goldfischer, H. Popper, I. Sternlieb, The significance of variations in the distribution of copper in liver disease, *Am. J. Pathol.* 99 (3) (1980) 715–730.
- [80] Q. Sun, et al., Selenium and copper as biomarkers for pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis, *Nutrients* 12 (6) (2020).
- [81] P. Ozturk, E. Belge Kurutas, A. Ataseven, Copper/zinc and copper/selenium ratios, and oxidative stress as biochemical markers in recurrent aphthous stomatitis, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 27 (4) (2013) 312–316.

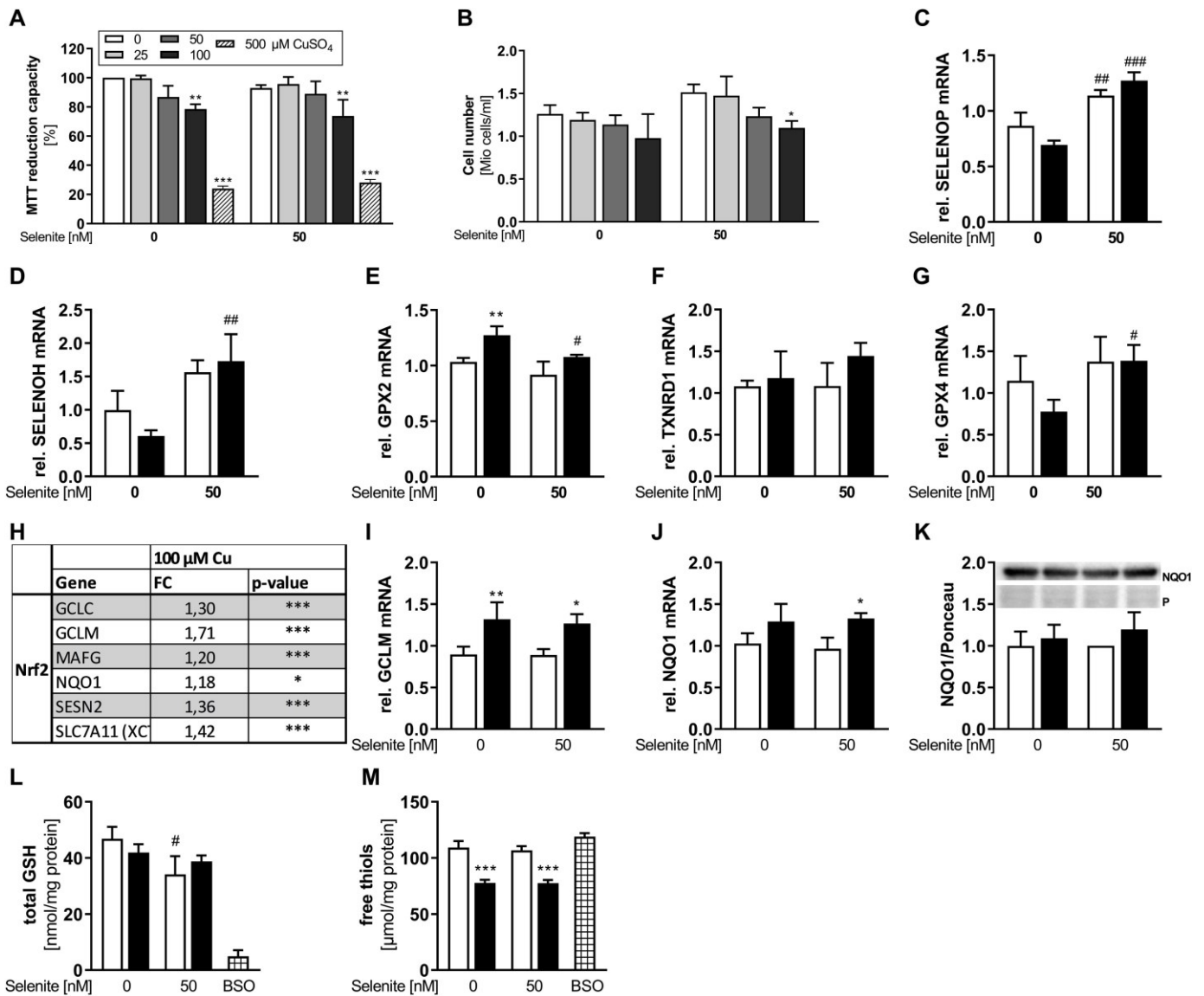


Fig. S1. Markers of cytotoxicity and redox status. MTT reduction capacity (A) and cell number (B) of HepG2 cells cultured with increasing Cu concentrations (0, 25, 50 or 100 μ M) in combination with or without 50 nM selenite for 72 h. 500 μ M Cu was used as positive control for MTT reduction capacity and untreated cells were set as 100%. HepG2 cells were treated with Cu (0 or 100 μ M) in combination with or without 50 nM selenite for 48 h (C-G, I, J) or 72 h (K-M). Gene expression of selenoproteins and Nrf2 target genes and protein expression of NQO1 were analyzed using qPCR or Western Blot (C–K). Gene expression was normalized to the reference genes RPL13A and HPRT. Untreated cells of the first replicate were set as 1. Protein expression was normalized to Ponceau staining (P). Microarray data provided by GEO Profiles (GEO Series Accession No. GSE9539) [35] obtained from HepG2 cells treated for 24 h with 100 μ M CuSO₄ (C). Data are given as fold change (FC) relative to the untreated control (n = 3). Total GSH (G) and free thiols (H) were measured photometrically in cells or supernatant, respectively and were normalized to protein content of the cell lysate. 24 h of BSO treatment was used as positive control. Data are depicted as mean + SD (n = 3–4). *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 vs. 0 μ M CuSO₄ and #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001 vs. 0 nM Se calculated based on two-way ANOVA with Bonferroni's post-test.

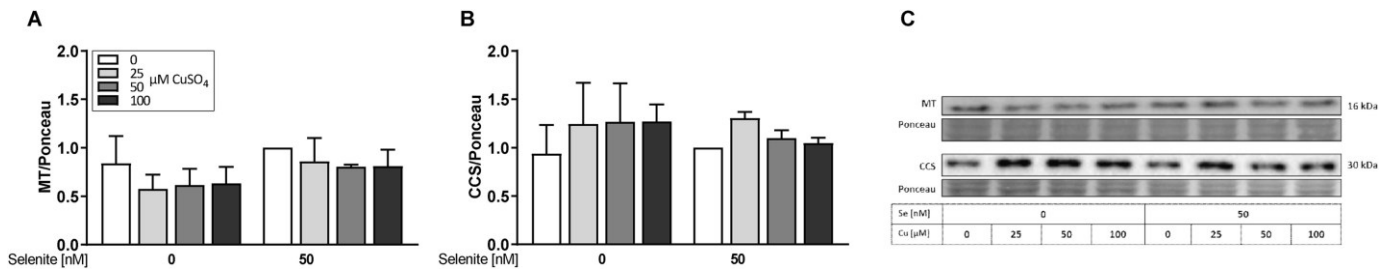


Fig. S2. **Cu responsive proteins are unaffected by the Cu and Se treatment.** HepG2 cells were treated with increasing Cu concentrations (0, 25, 50 or 100 μM) in combination with or without 50 nM selenite for 72 h. Protein expression was determined using Western blot, normalized to Ponceau staining. Samples with Se treatment and without Cu were set as 1 (A, B). Representative blots are shown (C). Data are depicted as mean + SD (n = 3-4). Statistical analyses were based on two-way ANOVA with Bonferroni's post-test.

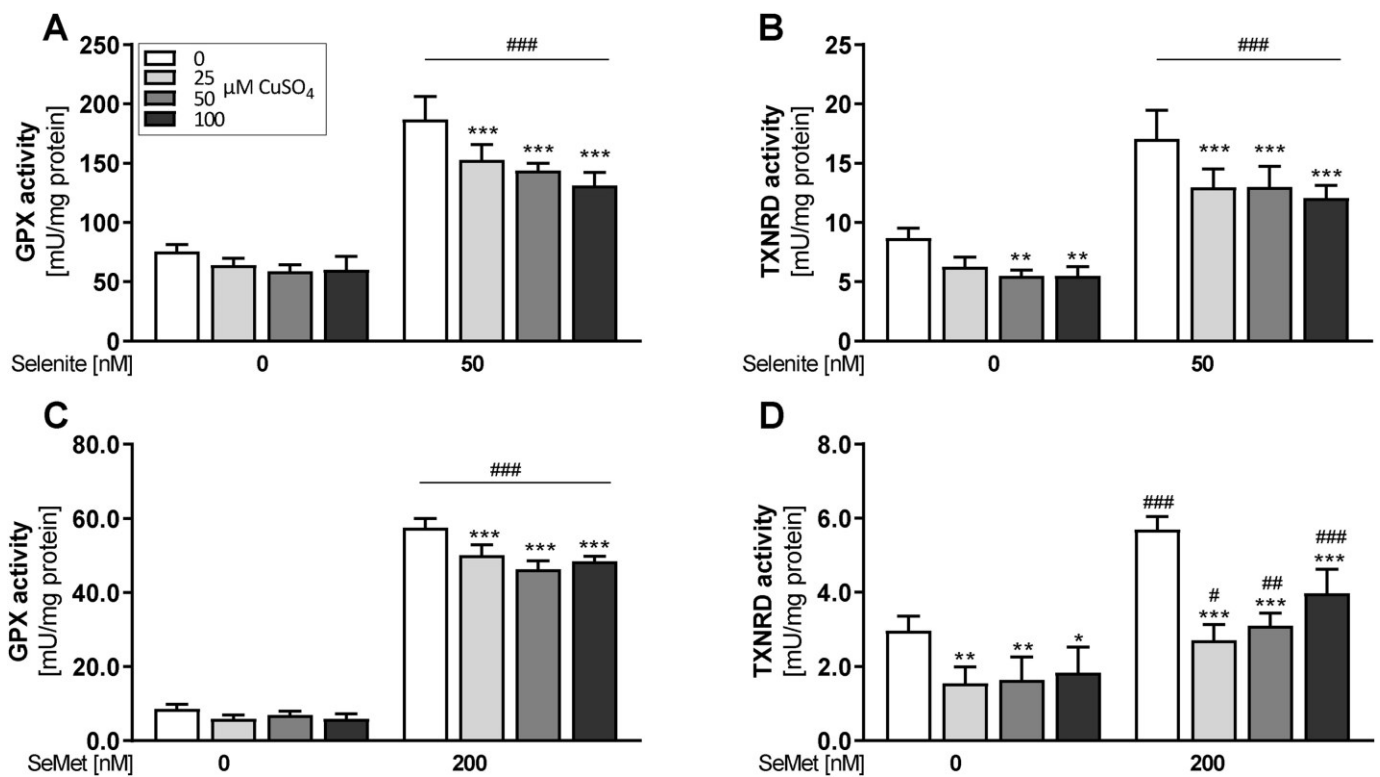


Fig. S3. **Cu decreases selenoprotein activity in HT29 cells and independent of the selenocompound.** Measurement of GPX and TXNRD enzyme activity in HT29 (A, B) and HepG2 cells (C, D) treated with increasing Cu concentrations (0, 25, 50 or 100 μM) in combination with or without 50 nM selenite (A, B) or 200 nM selenomethionine (C, D) for 72 h, respectively. Data are depicted as mean + SD (n = 3-4). *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 vs. 0 μM CuSO_4 and #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001 vs. 0 nM Se calculated based on two-way ANOVA with Bonferroni's post-test.

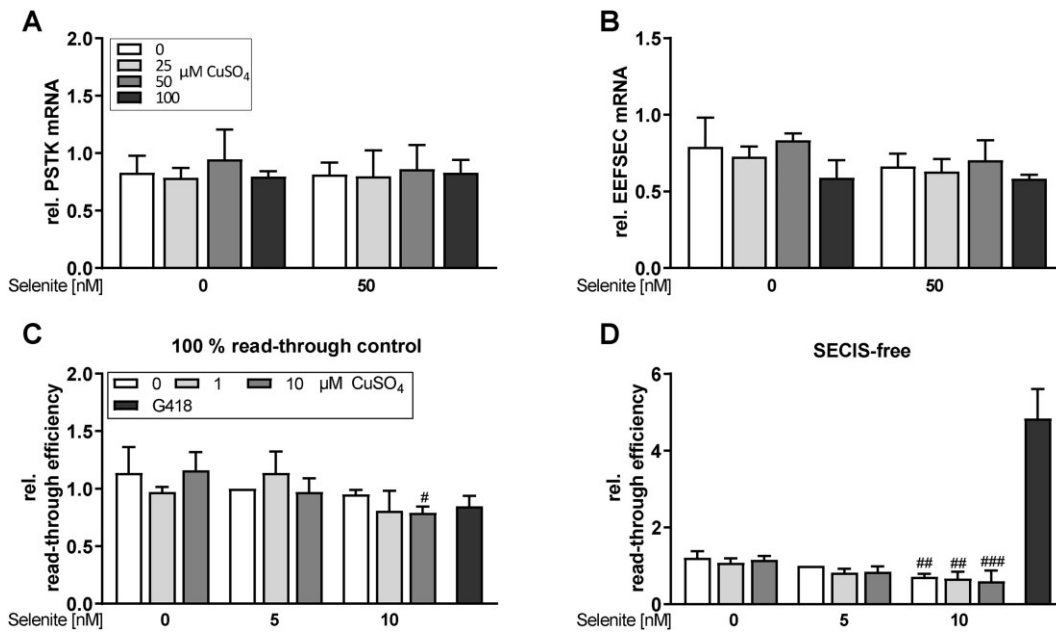


Fig. S4. **Read-through efficiency of control reporters.** HepG2 cells were cultured with increasing Cu concentrations (0, 25, 50 or 100 μ M) in combination with or without 50 nM selenite for 48 h. Gene expression was analyzed by qPCR and normalized to the reference genes RPL13A and HPRT (A, B) and untreated cells of first replicate were set as 1. Positive (C) and negative (D) reporter read-through efficiency was measured using HEK293 cells stably transfected with a UGC triplet (= 100% read-through) or a SECIS-free sequence, respectively. Cells were cultured with 1 or 10 μ M CuSO₄ in combination without or with 5 and 10 nM selenite for 72 h. Read-through efficiency was determined using luminescence measurement and normalized to cells treated only with 5 nM selenite. G418 (+5 nM Se) was used as positive control. Data are depicted as mean + SD (n = 3). #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001 vs. 0 nM Se calculated based on two-way ANOVA with Bonferroni's post-test.

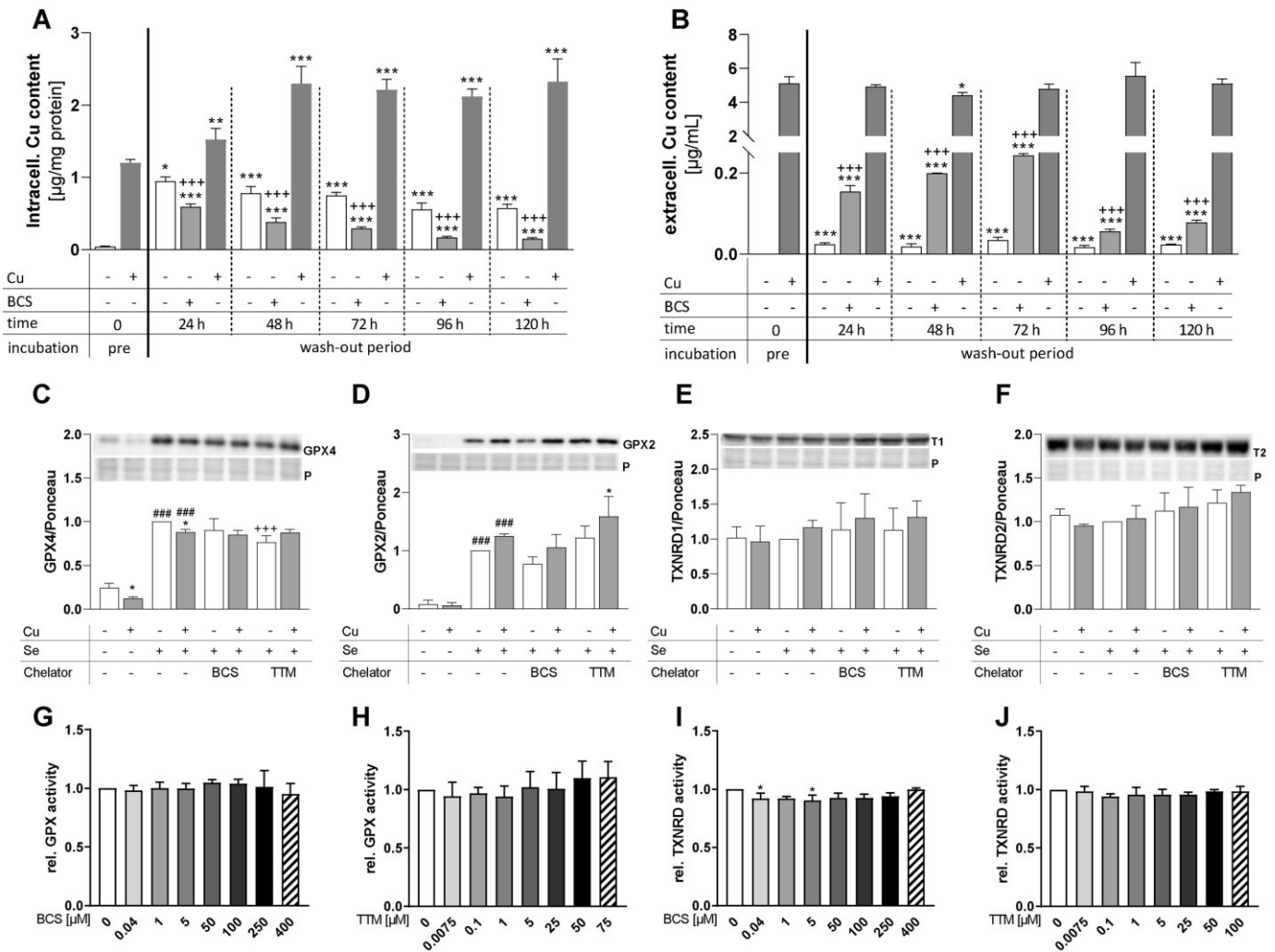


Fig. S5. The Cu chelator BCS affects Cu content, but showed no impact on selenoprotein activity and expression. HepG2 cells were cultured with or without 100 µM CuSO₄ for 72 h. After this period, all samples with prior CuSO₄ treatment were divided into three cultivation groups (-Cu/-BCS, -Cu/+BCS, +Cu/-BCS) for another five days with media exchange after three days. Every day one sample of each group was harvested and Cu content of cells (A) and media (B) was determined using TXRF. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 vs. 72 h + CuSO₄; +++p < 0.001 vs. 0 µM CuSO₄ at the same time point, based on two-way ANOVA with Bonferroni's post-test excluding the +Cu/-BCS group for statistical analysis. HepG2 cells were cultivated with 100 µM CuSO₄ in combination with or without 50 nM selenite for 72 h. After 48 h of incubation, the two chelators bathocuproine disulfonic acid (BCS, 400 µM) or tetrathiomolybdate (TTM, 75 µM) were added to the cells. Protein expression (T1 = TXNRD1; T2 = TXNRD2) was determined using Western blot and normalized to Ponceau staining (P). Samples with Se but without further treatment were set as 1 (C–F). *p < 0.05 vs. 0 µM CuSO₄; ###p < 0.001 vs. 0 nM Se, and +++p < 0.001 vs. -chelator calculated based on two-way ANOVA with Bonferroni's post-test. Lysates of selenite supplemented cells (50 nM for 72 h) were used to measure the direct impact of BCS or TTM on enzyme activities. Increasing concentrations of BCS or TTM were added 15 min prior to measurement of enzyme activities and were normalized to lysates without additional BCS or TTM incubation, respectively. Activities of GPX (G, H) and TXNRD (I, J) were measured photometrically. Data are depicted as mean + SD (n = 3-4). *p < 0.05 vs. 0 µM BCS or TTM calculated based on one-way ANOVA with Bonferroni's post-test.

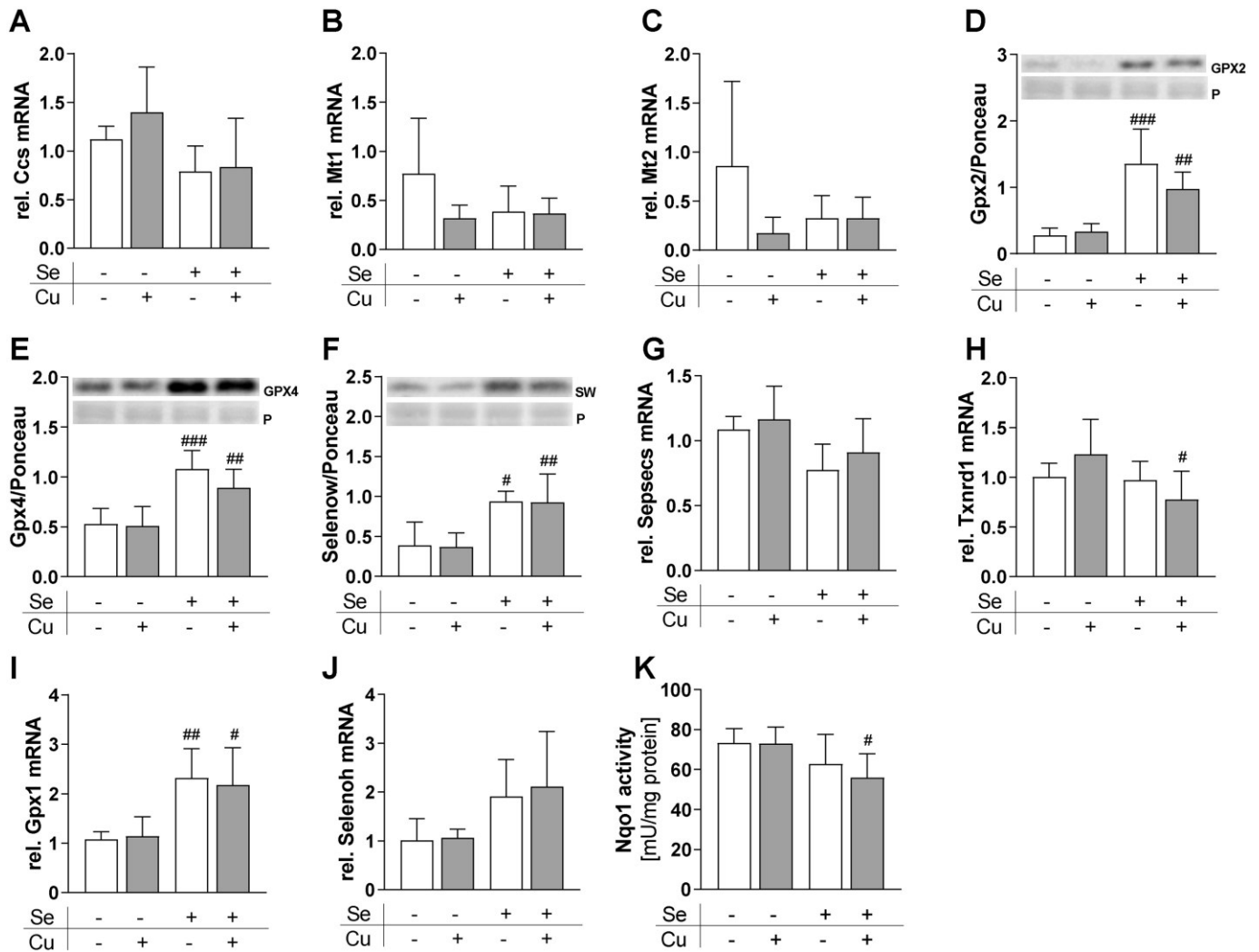


Fig. S6. Hepatic gene and protein expression upon dietary intervention with the TEs Cu and Se. Hepatic gene and protein expression of mice supplied with suboptimal (0.02/1.6 ppm) or adequate (0.15/6 ppm) amounts of Se and Cu were determined using qPCR and Western blot, respectively. Gene expression was normalized to the reference genes Rpl13a and Hprt (A-C, G-J). Protein expression (SW = Selenow) was normalized to Ponceau staining (P). Nqo1 activity was measured photometrically and normalized to protein content. Data are depicted as mean + SD (n = 5). #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001 vs. -Se calculated based on two-way ANOVA with Bonferroni's post-test.

4.3 N-Acetylcysteine as Modulator of the Essential Trace Elements Copper and Zinc

Manuskript Nr. 3

Autoren: Theresa Wolfram, Maria Schwarz, Michaela Reuß, Kristina Lossow, Mario Ost, Susanne Klaus, Tanja Schwerdtle, Anna Patricia Kipp

Bibliographische Informationen:

Wolfram, T., **M. Schwarz**, M. Reuss, K. Lossow, M. Ost, S. Klaus, T. Schwerdtle and A. P. Kipp (2020). "N-Acetylcysteine as Modulator of the Essential Trace Elements Copper and Zinc." Antioxidants (Basel) **9**(11).

Der Kandidat / Die Kandidatin ist (bitte ankreuzen)

Erstautor/-in, Ko-Erstautor/-in, Korresp. Autor/-in, Koautor/-in.

Status: publiziert

Anteile (in %) der Autoren / der Autorinnen an der Publikation (anzugeben ab 20%)

Autor/-in	Konzeptionell	Datenanalyse	Experimentell	Verfassen des Manuskriptes	Bereitstellung von Material
Wolfram, T		50	40	30	
Schwarz, M		40	40	20	
Reuß, M					
Lossow, K					
Ost, M					
Klaus, S					
Schwerdtle, T					
Kipp, AP	50			40	



Article

N-Acetylcysteine as Modulator of the Essential Trace Elements Copper and Zinc

Theresa Wolfram ^{1,†}, Maria Schwarz ^{1,2,†} , Michaela Reuß ¹, Kristina Lossow ^{1,2} , Mario Ost ³ , Susanne Klaus ³, Tanja Schwerdtle ^{2,4,5} and Anna P. Kipp ^{1,2,*}

¹ Department of Molecular Nutritional Physiology, Institute of Nutritional Sciences, Friedrich Schiller University Jena, 07743 Jena, Germany; theresa.wolfram@uni-jena.de (T.W.); schwarz.maria@uni-jena.de (M.S.); michaelareuss@yahoo.de (M.R.); kristina.lossow@uni-jena.de (K.L.)

² TraceAge-DFG Research Unit on Interactions of Essential Trace Elements in Healthy and Diseased Elderly, D-13353 Potsdam-Berlin-Jena-Wuppertal, Germany; tanja.schwerdtle@uni-potsdam.de

³ German Institute of Human Nutrition, 14558 Nuthetal, Germany; mario.ost@dife.de (M.O.); klaus@dife.de (S.K.)

⁴ Department of Food Chemistry, Institute of Nutritional Science, University of Potsdam, 14558 Nuthetal, Germany

⁵ German Federal Institute for Risk Assessment (BfR), 10589 Berlin, Germany

* Correspondence: anna.kipp@uni-jena.de; Tel.: +49-3641-949609

† Authors contributed equally.

Received: 5 October 2020; Accepted: 11 November 2020; Published: 12 November 2020



Abstract: N-acetylcysteine (NAC) is a frequently prescribed drug and known for its metal chelating capability. However, to date it is not well characterized whether NAC intake affects the homeostasis of essential trace elements. As a precursor of glutathione (GSH), NAC also has the potential to modulate the cellular redox homeostasis. Thus, we aimed to analyze effects of acute and chronic NAC treatment on the homeostasis of copper (Cu) and zinc (Zn) and on the activity of the redox-sensitive transcription factor Nrf2. Cells were exposed to 1 mM NAC and were co-treated with 50 µM Cu or Zn. We showed that NAC treatment reduced the cellular concentration of Zn and Cu. In addition, NAC inhibited the Zn-induced Nrf2 activation and limited the concomitant upregulation of cellular GSH concentrations. In contrast, mice chronically received NAC via drinking water (1 g NAC/100 mL). Cu and Zn concentrations were decreased in liver and spleen. In the duodenum, NQO1, TXNRD, and SOD activities were upregulated by NAC. All of them can be induced by Nrf2, thus indicating a putative Nrf2 activation. Overall, NAC modulates the homeostasis of Cu and Zn both in vitro and in vivo and accordingly affects the cellular redox balance.

Keywords: N-acetylcysteine; copper; zinc; glutathione; Nrf2

1. Introduction

N-acetylcysteine (NAC) is a derivative of the amino acid cysteine which contains a reactive thiol group that participates in redox reactions. Oxidation of cysteine gives rise to the disulfide cystine. The cysteine/cystine redox couple is the most abundant one in plasma while glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG) are most important within cells. GSH is a tripeptide consisting of glutamate, cysteine, and glycine, in which the central cysteine is relatively protected from spontaneous oxidation. Cysteine is usually the rate-limiting amino acid for GSH synthesis [1]. Dietary cysteine needs to be actively absorbed in the intestine, while oral NAC can enter the intestinal epithelium by passive diffusion [2]. Thus, NAC is an interesting source to fuel the cellular cysteine pool and GSH synthesis modulating the cellular redox homeostasis and the redox capacity of whole organisms. The master regulator of the cellular redox balance is the transcription factor Nrf2 (NF-E2-related factor 2) which induces target genes involved in cytoprotection such as thioredoxin reductase 1 (TXNRD1) or

NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1). In addition, Nrf2 enhances the de novo GSH synthesis in response to oxidative insults [3,4]. Under basal conditions, Nrf2 is bound to Keap1 resulting in the continuous degradation of Nrf2 via the proteasome [5,6]. However, upon exposure to a multitude of Nrf2 inducers, the degradation of Nrf2 is repressed, which leads to its accumulation and nuclear translocation [7,8]. In different experimental setups, the elimination of H₂O₂ by NAC suppressed Nrf2 activation [9,10]. Vice versa, redox-active, essential trace elements such as copper (Cu) and zinc (Zn) can enhance Nrf2 signaling [11,12]. Besides this, Cu and Zn are important constituents of enzymes to coordinate their structural or catalytic properties. For example, this is the case for the antioxidant enzyme Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1).

Besides its antioxidant effects, NAC has been shown to have metal-chelating capabilities. Chelating agents are defined as compounds which are able to form complexes with metal ions and thus reduce their toxicity. The chelating capacity of NAC is modulated by its thiol group in combination with the carboxyl group. Therefore, NAC is used to treat acute heavy metal poisoning—e.g., against mercury, cadmium, or arsenic intoxication [13]. Even though this function is well established, there is only limited information on how NAC affects essential metals such as Zn and Cu. In a human intervention study, NAC (200 mg three times a day) application to ten healthy volunteers for 2 weeks did not affect plasma levels of calcium, magnesium, iron, Zn, and Cu [14]. As NAC is frequently prescribed as mucolytic drug [15]—e.g., as cold medication—a putative link between NAC intake and the homeostasis of essential trace elements needs to be studied in more detail because especially Zn is an important modulator of the immune response [16]. Based on this, we aimed to use cell culture and mouse models to analyze short-term and chronic NAC effects on Cu and Zn concentrations within cells and organs such as liver (important for trace element homeostasis), duodenum (important for trace element absorption), and spleen (organ of the immune system). We could show that Cu and Zn concentrations were reduced both in vitro and in vivo upon NAC treatment. As both NAC and free Cu and Zn ions can modulate the cellular redox homeostasis, we analyzed the activity of the redox-sensitive transcription factor Nrf2 as stable read-out for redox homeostasis. The enzyme activities of Nrf2-regulated genes were enhanced in the duodenum of mice after chronic NAC supply, while NAC inhibited the Zn-induced nuclear translocation of Nrf2 after short-term treatment in cell culture.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture

The human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 (ATCC[®] HB-8065[™]), the colorectal adenocarcinoma cell line HT-29 (ATCC[®] HTB-38[™]), and the acute monocytic leukemia cell line THP-1 (ATCC[®] TIB-202[™]) were cultured in Roswell Park Memorial Institute 1640 media (RPMI; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) with 10% (*v/v*) fetal calf serum (FCS, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), 1% (*v/v*) penicillin-streptomycin (ThermoFisher Scientific), and 1% GlutaMAX (ThermoFisher Scientific) at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. For experiments, the cells were seeded for 24 h and accordingly were treated with or without 1 mM NAC (Sigma-Aldrich) dissolved in culture medium without FCS. In parallel, copper sulfate (CuSO₄) (Sigma-Aldrich/Merck) and zinc sulfate (ZnSO₄) (Sigma-Aldrich/Merck) were added in a final concentration of 50 μM for 6 h. The concentrations of Cu and Zn were chosen based on previous experiments [17]. Cells were harvest 30 h after seeding.

2.2. Cell Viability Assays

The cell viability was detected by the methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid (MTT, Sigma-Aldrich) reduction capacity and the cell number. For the cell number, cells were dissolved in phosphate-buffered saline (PBS, 140 mM sodium chloride, 10 mM disodium hydrogen phosphate, and 2.99 mM potassium dihydrogen phosphate (Carl Roth, Karlsruhe, Germany), pH 7.4). The cell number was determined using the Vi-Cell XR Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) with 0.4% trypan blue (Sigma-Aldrich) for staining dead cells. For the MTT reduction capacity, the medium was

removed and FCS-free medium containing 0.5 mg/mL MTT was added to the cells. After 60 min of incubation, the medium was discarded and resulting formazan crystals were lysed in dimethyl sulfoxide (DMSO, Carl Roth) by a ten-minute shaking step at 600 rpm. Accordingly, the obtained formazan was measured photometrically at 550 nm with 690 nm as reference wavelength, by using a microplate reader (Synergy H1, BioTek, Bad Friedrichshall, Germany). All measurements were performed in triplicates using 96-well plates.

2.3. Animal Experiment

Male C57BL/6Jrj mice were housed on a 12:12 h light:dark schedule with food and tap water ad libitum. The mouse strain was chosen to allow for comparison with previous results [17]. A commercially available chow diet (V1534, Ssniff, Soest, Germany) with 97 and 8.8 mg/kg Zn and Cu, respectively, was used. After weaning at the age of four weeks, mice were assigned to the NAC-treated or the control group. The former received NAC via drinking water (1 g/100 mL), while the latter only received water. The NAC solution was refreshed every second day. At the age of 24 weeks, mice were anesthetized with isoflurane (Cp-pharma, Burgdorf, Germany) and blood was collected by cardiac puncture. Organs were surgically dissected and immediately frozen. All animal procedures were approved and conducted following national guidelines of the Ministry of Environment, Health and Consumer Protection of the federal state of Brandenburg (Germany, 2347-44-2017) and institutional guidelines of the German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbruecke.

2.4. Enzyme Activities

For enzyme activities, cells and mouse tissues (duodenum, liver, spleen) were homogenized with a TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany) in Tris buffer (100 mM Tris (Carl Roth), 300 mM KCl (Applichem, Darmstadt, Germany), pH 7.6 with 0.1% (*v/v*) Triton X-100 (Serva, Heidelberg, Germany), and 0.1% (*v/v*) protease inhibitor (Merck/Millipore, Burlington, MA, USA)) two times for 60 s at 30 Hz. To remove the cellular debris, the samples were centrifuged for 10 min at 4 °C and 15,000× *g*. The protein concentration was determined by Bradford analysis (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany). The protein lysates were used for NQO1, SOD, TXNRD, and glutathione peroxidase (GPX) activity measurements. All enzyme activities were measured photometrically using a microplate reader (Synergy H1) and were performed in triplicates using 96-well plates. The enzyme activity was normalized to the protein content of the samples. The methods for NQO1 [18], total TXNRD, and GPX [19] activities have been described previously. Briefly, NQO1 catalyzes the reduction of menadione to menadiol which in turn reduces MTT to its water-soluble formazan. TXNRDs convert 5-5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) to 2-nitro-5-thiobenzoic acid (TNB) under NADPH consumption. GPX activity was measured in a NADPH-consuming glutathione reductase (GR)-coupled test using H₂O₂ as substrate. For SOD activity measurements, superoxide anion radicals were produced by 1,2,3-benzenetriol (pyrogallol) autoxidation [20]. One unit of SOD activity corresponded to a 50% inhibition of pyrogallol autoxidation [21].

2.5. Western Blots of Nuclear Lysates

For Western blot analysis, the nuclear lysates of HepG2 cells were used after 4 h of NAC, Zn, and Cu treatments. The cells were scratched from culture dishes with lysis buffer I (10 mM Hepes (Carl Roth); 1.5 mM MgCl₂ (Carl Roth); 10 mM KCl (Applichem); 0.5 mM Dithiothreitol (DTT; Merck); 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; Carl Roth), and 0.1% (*v/v*) NP-40 Alternative (Merck); pH 7.9) and were incubated 10 min at room temperature (RT) under shaking. After a centrifugation step for 1 min (6800× *g*; 4 °C), the cell pellets were lysed in lysis buffer II (40 mM Hepes; 400 mM KCl; 10% glycerol (Carl Roth); 1 mM DTT, and 0.1 mM PMSF; pH 7.9) and 294 mM NaCl for 30 min (4 °C), followed by a 30 min centrifugation step (20,000× *g*; 4 °C). The supernatant containing the nuclear lysates was used for Bradford analysis (Bio-Rad) and Western Blot. SDS polyacrylamide gel electrophoresis was followed by immunoblotting of proteins to nitrocellulose membranes. After immunoblotting,

membranes were gently shaken for 2 min in Ponceau S solution (0.2% (*w/v*) Ponceau S (Carl Roth) with 3% (*w/v*) trichloroacetic acid (Carl Roth)) and bands were recorded by ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad). Subsequently, membranes were blocked in 5% (*w/v*) non-fat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.1% (*v/v*) Tween 20 (T-TBS) for 1 h at RT. The membranes were incubated with the following primary antibody overnight at 4 °C: rabbit anti-Nrf2 (1:1000; 12,721, Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Horseradish peroxidase-coupled goat anti-rabbit IgG (1:50,000; 7074 S, Cell Signaling) served as a secondary antibody. For detection of protein bands, SuperSignal™ West Dura (ThermoFisher Scientific) was used, and band intensities were densitometrically quantified by a ChemiDoc™ MP Imaging System. Finally, target protein expression was normalized to Ponceau staining.

2.6. Total Reflection X-ray Fluorescence (TXRF) Spectroscopy

Trace elements can be analyzed using X-rays, generated by a molybdenum tube using the S2 Picofox™ (Bruker Nano GmbH, Berlin, Germany). Prior to measurement, mouse tissue samples were digested, whereas cell lysates were analyzed without further digestion. Briefly, 50 mg of tissue samples was weighted into microwave vessels and 830 µL ultrapure water, 900 µL 69% HNO₃ (*v/v*) (Suprapure®, Merck/Millipore), 250 µL 30% H₂O₂ (*v/v*) (Sigma-Aldrich/Merck), and 20 µL of 200 mg/L yttrium-solution (Merck/Millipore) as digestion control were added. The samples were heated to 200 °C for 20 min using a Speedwave 2 (Berghof, Eningen, Germany). Afterwards, the samples were diluted with 2 mL ultrapure water and stored at RT. Certified reference material, namely pig kidney (ERM BB-186), was always analyzed in parallel. For the analysis of trace element content in mouse tissue and cells, 0.5 mg/L gallium (ThermoFisher Scientific) or 1 mg/L yttrium was used as internal standard. An amount of 10 µL of each sample was placed on a siliconized quartz glass carrier and dried overnight. Mouse and cell samples were measured randomly in triplicates for 1000 or 500 s, respectively.

2.7. Total GSH Analysis

The measurement of the total GSH content is based on the DTNB-mediated production of GS-TNB (a GSH adduct of TNB). This GS-TNB could be reduced by GR to TNB, which can be quantified as described earlier [22]. For GSH depletion, cells were treated for 6 h with 0.25 mM buthionine-sulfoximine (BSO, Sigma-Aldrich). Cells and liver samples were dissolved in 150 µL ice-cold 10 mM hydrochloric acid (HCl, Carl Roth). To lyse the cells, they were exposed to ten times ultrasound treatment (80% amplitude, 0.5 s cycle). For the liver samples, a TissueLyser (Qiagen) was used 2 × 2 min at 30 Hz for homogenization. After centrifugation for 30 s and 8000× *g*, 30 µL (*w/v*) 5% 5-sulfosalicylic acid (SSA, Sigma-Aldrich) was added to the supernatant and incubated for 10 min. A second centrifugation at 4 °C, for 15 min and 8000× *g* removed the denatured proteins. The extinction was measured for 5 min at 412 nm with a microplate reader (Synergy H1). All measurements were performed in triplicates using 96-well plates. The total GSH content was calculated using a standard curve and was normalized to the protein content of the samples.

2.8. Statistics

Data are provided as the mean ±SD. The statistical analysis was carried out by GraphPad Prism 8 (San Diego, CA, USA) using an unpaired t-test or two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's post-test. A p-value below 0.05 was considered as statistically significant.

3. Results

3.1. NAC Reduces the Cu and Zn Content of Cells and Modulates Glutathione Concentrations

To study the putative chelating activity of NAC, HepG2 cells were treated for 6 h with NAC together with the individual trace elements Zn and Cu or a combination of both. None of these experimental conditions affected the cellular viability as measured by MTT reduction capacity (Figure 1a). However,

regarding cell numbers, there was a reduction down to 60% for the +NAC/+Cu/+Zn treated group in comparison to only NAC-treated cells (Figure 1b). For all other treatment conditions, there was no significant effect on cell number. To characterize the cellular redox homeostasis in response to NAC, Cu, and Zn treatment, the activity of NQO1 and total cellular TXNRD activity were analyzed. Both NQO1 and TXNRD1 expression are known to be regulated by the transcription factor Nrf2 [23,24]. After a short-term 6 h incubation period, neither the trace elements nor NAC modulated the NQO1 (Figure 1c) or TXNRD activity (Figure 1d).

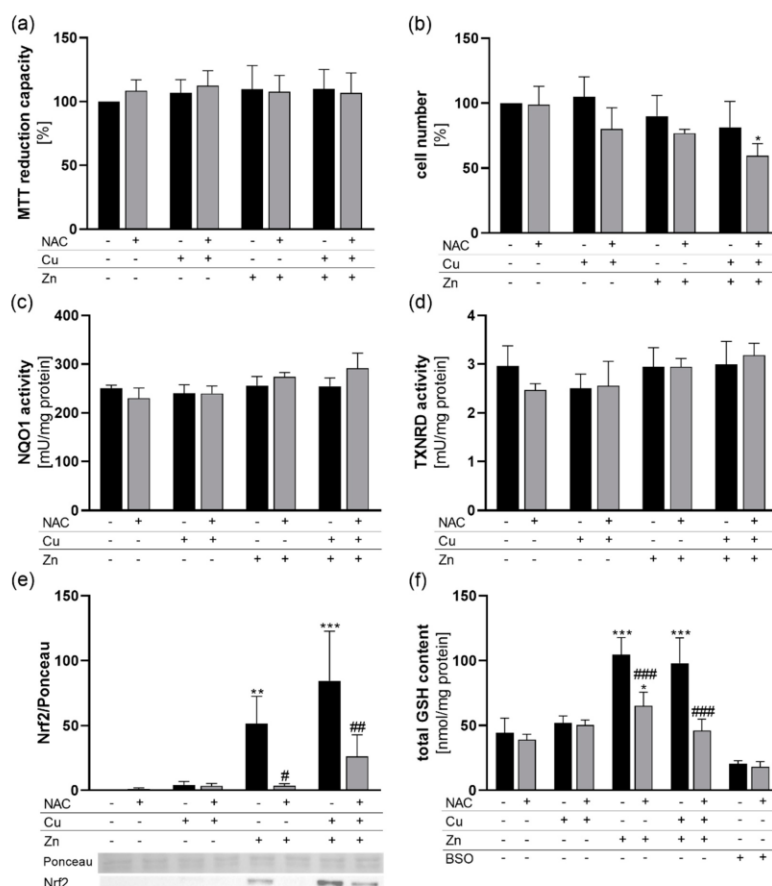


Figure 1. Cell viability and cellular redox homeostasis in response to NAC treatment in combination with Cu and Zn. HepG2 cells were cultured for 6 (a–d,f) or 4 h (e) with or without 1 mM NAC in combination with 50 μ M CuSO₄, 50 μ M ZnSO₄ or both. (a) MTT reduction capacity and (b) cell numbers were analyzed. (c) NQO1 and (d) TXNRD activities were measured photometrically. (e) Nuclear translocation of Nrf2 was analyzed by Western blot and normalized to Ponceau staining. (f) The total GSH content of the cells was determined photometrically. The GSH synthesis inhibitor BSO was used as positive control. Results are depicted as mean + SD ($n = 4$). Statistical analysis was calculated by two-way ANOVA with Bonferroni's post-test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. cells without Zn and Cu treatment (trace element effect); # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ vs. -NAC (NAC effect).

Accordingly, nuclear translocation of the transcription factor Nrf2 was analyzed 4 h after treatment with NAC, Zn, and Cu. While Cu had no effect on Nrf2 translocation, Zn upregulated nuclear Nrf2 levels which was also the case in cells with Cu/Zn co-treatment. NAC had no basal effect on Nrf2 translocation in cells without additional trace elements but inhibited the Zn-induced upregulation of Nrf2. This inhibitory effect was less pronounced in Cu/Zn-treated cells (Figure 1e). As NAC can

be used as a precursor for GSH synthesis, the total cellular GSH content was analyzed. Treating HepG2 cells with Zn increased the cellular GSH content by a factor of 2. This was completely blocked when cells were co-treated with NAC and Zn independent of an additional Cu supply. Under basal conditions and in only Cu-treated cells, NAC had no effect on the GSH content (Figure 1f).

Next, we examined whether NAC had an effect on the cellular concentrations of the trace elements Cu and Zn. Treating HepG2 cells for 6 h with Cu resulted in an 8-fold increase in the cellular Cu content. However, there was only a 4-fold increase when cells were co-treated with Cu and Zn. Co-treatment with NAC diminished the increase in Cu in response to only Cu treatment but had no effect on cells treated with Zn and Cu. Under basal and only Zn-treated conditions, no NAC effect on the Cu content was observed (Figure 2a). The NAC effect on the cellular Cu content could be confirmed in HT-29 and THP-1 cells but the inhibitory effect of Zn on the Cu content appears to be unique for HepG2 cells (Figure 2c,e). The Zn uptake of all three cell lines was strongly reduced by co-treatment with NAC, but this reduction was not observed in Cu/Zn-treated HepG2 cells. Cu co-treatment increased the cellular Zn levels of HT-29 and THP-1 cells but not of HepG2 cells. Again, NAC did not affect basal Zn levels in cells without trace element treatment or in only Cu treated cells (Figure 2b,d,f). Thus, short-term NAC treatment reduced the Cu and Zn content of cells in culture.

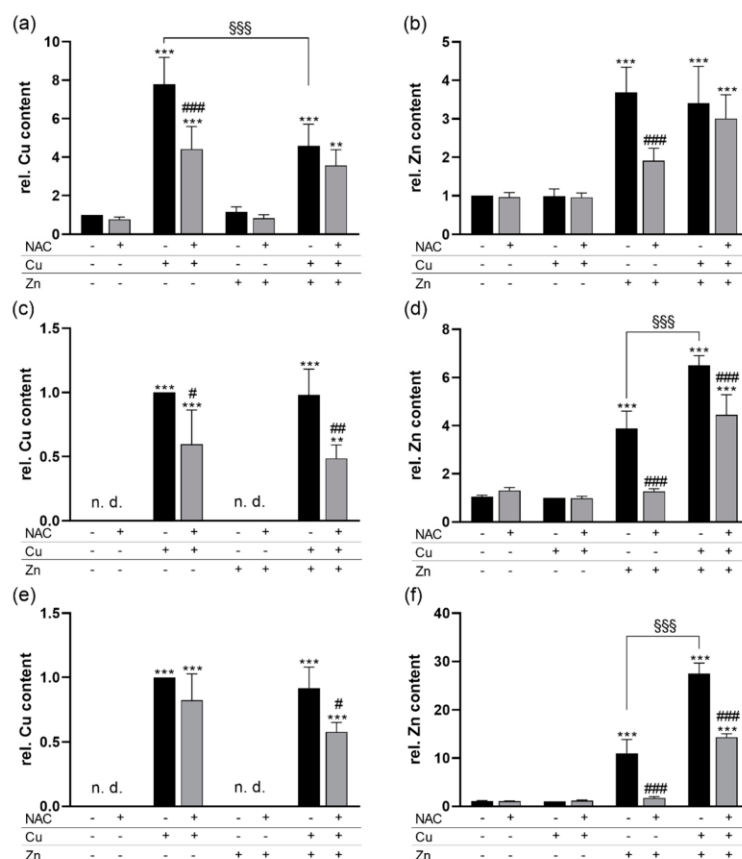


Figure 2. NAC effects on the cellular Cu and Zn content of HepG2, HT-29, and THP-1 cells. Cells were cultured 6 h with or without 1 mM NAC in combination with 50 μ M CuSO₄, 50 μ M ZnSO₄ or both. The (a,c,e) Cu and (b,d,f) Zn content was measured using total reflection X-ray fluorescence (TXRF) spectroscopy in HepG2 (a,b), HT-29 (c,d), and THP-1 (e,f) cells. Results are depicted as mean \pm SD ($n = 3-4$). Statistical analysis was calculated by two-way ANOVA with Bonferroni's post-test. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. cells without Zn and Cu treatment (trace element effect); # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ vs. -NAC (NAC effect); \$\$\$ $p < 0.001$ as indicated. n.d. = not detectable.

3.2. Chronic NAC Treatment Reduced the Cu and Zn Content of Murine Liver and Spleen

To analyze the NAC effects on trace elements in an in vivo model, male mice chronically received NAC via the drinking water for 20 weeks. This treatment neither affected the body weight of the mice (Table 1) nor any tissue weight except for the spleen. The relative spleen weight was increased in NAC-treated mice in comparison to mice without NAC treatment (Table 1). The total hepatic GSH content was not significantly affected by NAC (Table 1). As GPXs need GSH to become reduced again, we measured total GPX activity in the liver as well. Additionally, GPX activity was not modulated by NAC (Table 1).

Table 1. Effects of chronic NAC treatment on the body and spleen weight, the hepatic GSH content, and hepatic GPX activity in vivo. Four-week-old male mice (C57BL/6Jrj) chronically received NAC for 20 weeks via the drinking water (1 g NAC/100 mL). The data are shown as mean \pm SD ($n = 10$) and were calculated by unpaired t-test. # $p < 0.05$ vs. -NAC (NAC effect).

	-NAC	+NAC
body weight [g]	31.2 \pm 2.5	30.7 \pm 2.9
spleen weight/body weight [mg/g]	2.6 \pm 0.4	3.1 \pm 0.4 #
total hepatic GSH content [μ M]	65.4 \pm 8.3	70.2 \pm 6.9
hepatic GPX activity [mU/mg liver]	894.0 \pm 84.1	952.9 \pm 103.3

For further analyses, we focused on three organs, duodenum, liver, and spleen. In line with the analyses performed in HepG2 cells, we measured NQO1 and TXNRD activities as markers for Nrf2 activity. The NQO1 activity was significantly increased in the duodenum and liver of NAC-treated mice in comparison to untreated mice, while it was not affected by NAC in the spleen (Figure 3a–c). In line with NQO1, TXNRD activity was increased by NAC in the duodenum. In the liver, TXNRD was unaffected, while it was even reduced by NAC in the spleen (Figure 3d–f). SOD activity was also increased by NAC in the duodenum but remained constant in liver and spleen (Figure 3g–i).

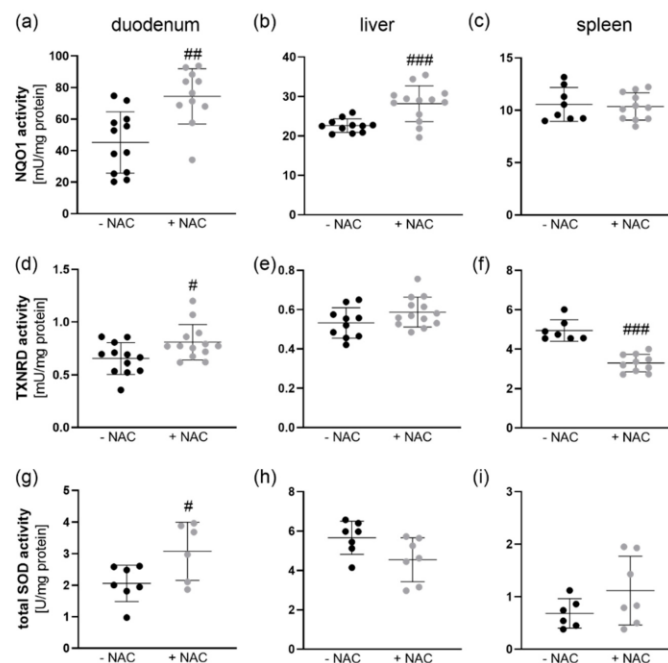


Figure 3. Activities of enzymes known to be induced by Nrf2 in NAC-treated mice. Four-week-old male mice (C57BL/6Jrj) chronically received NAC for 20 weeks via the drinking water (1 g NAC/100 mL). NQO1,

TXNRD, and SOD activities were measured photometrically in (a,d,g) duodenum, (b,e,h) liver, and (c,f,i) spleen. The data are shown as mean \pm SD and were calculated by unpaired t-test. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. -NAC (NAC effect).

Next, we analyzed the tissue content of Zn and Cu in the duodenum, liver, and spleen. In the duodenum, NAC had no influence on the Cu and Zn content (Figure 4a,d). However, the Cu content was reduced in the liver (Figure 4b) and spleen (Figure 4c), while Zn was only downregulated in the spleen (Figure 4f) and not in the liver (Figure 4e). Thus, NAC appears to have chelating abilities also in vivo.

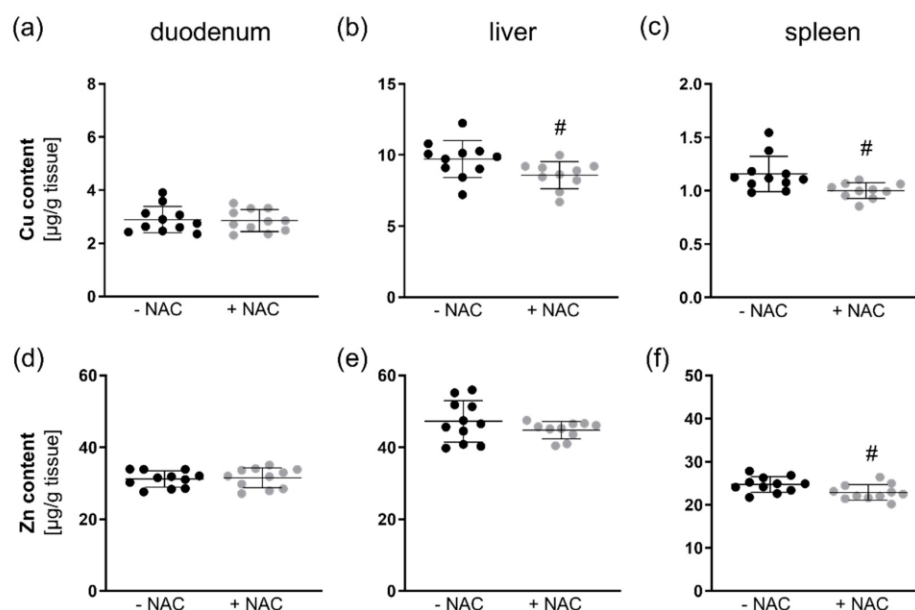


Figure 4. Zn and Cu concentrations in different organs of NAC-treated mice. Four-week-old male mice (C57BL/6Jrj) chronically received NAC for 20 weeks via the drinking water (1 g NAC/100 mL). The Cu and Zn content in (a,d) duodenum, (b,e) liver, and (c,f) spleen was measured using total reflection X-ray fluorescence (TXRF) spectroscopy. The data are shown as mean \pm SD and were calculated by unpaired t-test. # $p < 0.05$ vs. -NAC (NAC effect).

4. Discussion

In this study, we investigated whether NAC has the ability to modulate Cu and Zn homeostasis during acute and chronic application. We could show in cell culture that NAC co-treatment reduced the availability of both Cu and Zn for the cellular uptake (Figure 2). As described before, NAC is able to form stable complexes with both Cu and Zn [25]. In contrast to our results, the cellular amount of free Cu or Zn determined by fluorescent probes was not affected by NAC in an ovarian cancer cell line. The combination of Cu and NAC was toxic for the cells by inducing oxidative stress, while the combination of Zn and NAC was not [26]. Comparable results were obtained in primary rat cerebellar granule neurons [27]. However, other studies indicate that GSH is essential for protecting cells against Cu cytotoxicity by preventing Cu-induced oxidative stress [28]. In cell culture studies, NAC increased the GSH content—e.g., in rat cardiomyocytes [29]. However, under basal conditions, we did not observe any effects of NAC treatment on the cellular GSH content of HepG2 cells (Figure 1f). Whether or not GSH levels are increased in response to NAC obviously depends on the cell type, the treatment conditions, and NAC concentration and determines the outcome regarding Cu toxicity. We did not observe any toxicity in our in vitro experiments except for a moderate effect by the combination of Cu,

Zn, and NAC (Figure 1a,b). In contrast to previous studies, we further aimed to elucidate effects of Zn and Cu concentrations related to the physiological situation.

In line with the *in vitro* results, Cu levels were reduced by chronic NAC treatment in the liver and spleen of C57BL/6Jrj mice, while Zn was only reduced in the spleen, but effects were rather small (Figure 4). While liver is the most important organ for maintaining trace element homeostasis, the spleen is not typically related to trace element metabolism. We could recently show that a suboptimal supply of Fe, Zn, Cu, I, and Se in mice results in splenomegaly indicating that the spleen is sensitive towards the systemic trace element status [30]. Similar effects have also been described for Zn deficiency in rats [31]. However, in this study, mice received a standard chow diet with high levels of Cu (1.5-fold the requirement) and Zn (3-fold the requirement) which were only very moderately reduced by NAC treatment. In this scenario, NAC treatment also increased the spleen weight (Table 1). In the duodenum, no NAC effect on Zn and Cu levels was observed indicating that intestinal trace element absorption was either unaffected by NAC or was able to compensate for the reduced availability of Cu and Zn by increasing the uptake.

Previous *in vivo* studies dealing with NAC were mainly addressing protective effects against oxidative stress or toxic concentrations of trace elements such as Cu [32]. These effects were not obtained by modulating Cu concentrations as e.g., no effect of NAC on the brain Cu content was detected, but the NAC-induced increase in GSH was supposed to protect from Cu toxicity [32]. However, in our *in vivo* experiments NAC did not modulate total hepatic GSH concentrations (Table 1). One explanation could be that the NAC-containing drinking water was refreshed every second day which was already 24 h before sacrificing the mice. In the plasma, NAC has only a half-life of about 2–3 h [33]. Using radioactively labeled NAC, oral applications in rats revealed that NAC is distributed to most tissues within 1 h and remains elevated for up to 12 h [34]. This indicates that a putative increase in hepatic GSH levels by NAC could have been already counter regulated before harvesting the samples. In the aforementioned study, the increase in hepatic GSH levels in response to a high NAC dosage was also very moderate [34].

In contrast to the liver, GSH levels were strongly upregulated by Zn in HepG2 cells (Figure 1f) which was independent of Cu co-treatment. The Zn-induced effect on GSH could be inhibited by NAC (Figure 1f), which, however, appears to be an indirect effect modulated rather by a lower availability of Zn and thus reduced upregulation of GSH. In murine lung fibroblasts, Zn increased the cellular GSH content independently of metallothionein expression [35]. In primary rat endothelial cells, the Zn-induced GSH upregulation was mediated via Nrf2 activation and upregulation of the catalytic subunit of glutamate cysteine ligase (GCLC) [12]. However, we did not observe any differences in the activity of the Nrf2 target genes NQO1 and TXNRD1 after 6 h of NAC, Zn, and Cu stimulation (Figure 1c,d), indicating that the Zn-induced increase in GSH 6 h after stimulation appears to be a direct effect independent of *de novo* synthesis of GCLC via Nrf2 activation. Zn was able to increase nuclear translocation of Nrf2 which was maintained 4 h after treatment (Figure 1e). It is now well established that Keap1 is equipped with multiple cysteine-based sensors to detect various endogenous and exogenous stresses. ZnCl₂ is categorized into class IV together with H₂O₂ which activate Nrf2 signaling independently of Cys151/Cys273/Cys288 of Keap1 [8]. Again, the NAC effect on nuclear Nrf2 levels was limited to the inhibition of the Zn-mediated upregulation, but no direct NAC effect on Nrf2 was observed (Figure 1e). Besides effects on Nrf2, Zn co-treatment reduced the Cu content of HepG2 cells (Figure 2a). Such inhibitory effects of a high Zn intake on Cu absorption have been described before [36] and are e.g., used for the treatment of Wilson's disease patients [37]. However, in CaCo₂ cells, Zn did not inhibit Cu uptake [38] which was also the case in HT-29 and THP-1 cells (Figure 2c,e). The observed Zn effect on Cu could also involve GSH. Within cells, Cu is first bound to GSH before it is transferred to metallothioneins [39] which accordingly regulate the delivery of Cu to the Cu exporter ATP7A [40]. Thus, increasing cellular GSH levels could enhance Cu export resulting in lower intracellular Cu concentrations when co-treated with Zn.

In vivo, the chronic treatment with NAC upregulated NQO1, SOD, and TXNRD activities in the duodenum (Figure 3). This could be regulated via Nrf2 which is known to induce the transcription of all three enzymes. In contrast, cell culture studies revealed that NAC inhibits Nrf2 signaling by reducing H₂O₂ levels [9]. Most of these studies do not analyze basal unstressed conditions but rather conditions characterized by an increase in oxidative stress which is counteracted by NAC [10]. Thus, under basal conditions, chronic NAC might also shift the cellular redox balance to a more oxidative environment resulting in Nrf2 activation.

5. Conclusions

We could herein show that Cu and Zn homeostasis is modulated by acute and chronic NAC treatment in vitro and in vivo. In both cases, the cellular content of Cu and Zn was reduced by NAC. In mice, effects were rather small, but animals were well supplied with the trace elements Cu and Zn. However, under conditions of a limited trace element intake, the homeostasis could be more susceptible towards disturbance by chronic NAC intake. Thus, it would be important to recapitulate the obtained results when feeding adequate to suboptimal trace element concentrations. This is of particular importance for Zn, because e.g., old individuals exhibit a high prevalence for Zn deficiency. Especially during a cold, when NAC is frequently used as medication, lower Zn levels could prolong the cold by limiting the immune response.

Author Contributions: Conceptualization, S.K., T.S. and A.P.K.; investigation, T.W., M.R. and M.S.; resources, M.O., S.K.; visualization, T.W.; writing—original draft preparation, T.W., A.P.K.; writing—review and editing, M.S., M.O., K.L. and S.K.; supervision, K.L., S.K. and T.S.; funding acquisition, T.S. and A.P.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Deutsche Forschungsgemeinschaft (German research foundation; DFG), grant number FOR 2558.

Acknowledgments: The technical support of Stefanie Deubel is highly acknowledged.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Yin, J.; Ren, W.; Yang, G.; Duan, J.; Huang, X.; Fang, R.; Li, C.; Li, T.; Yin, Y.; Hou, Y.; et al. L-Cysteine metabolism and its nutritional implications. *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, *60*, 134–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Greene, S.C.; Noonan, P.K.; Sanabria, C.; Peacock, W.F. Effervescent N-Acetylcysteine Tablets versus Oral Solution N-Acetylcysteine in Fasting Healthy Adults: An Open-Label, Randomized, Single-Dose, Crossover, Relative Bioavailability Study. *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.* **2016**, *83*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Itoh, K.; Chiba, T.; Takahashi, S.; Ishii, T.; Igarashi, K.; Katoh, Y.; Oyake, T.; Hayashi, N.; Satoh, K.; Hatayama, I.; et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *236*, 313–322. [[CrossRef](#)]
4. Yamamoto, M.; Kensler, T.W.; Motohashi, H. The KEAP1-NRF2 System: A Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis. *Physiol. Rev.* **2018**, *98*, 1169–1203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Itoh, K.; Wakabayashi, N.; Katoh, Y.; Ishii, T.; Igarashi, K.; Engel, J.D.; Yamamoto, M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 76–86. [[CrossRef](#)]
6. Kobayashi, A.; Kang, M.I.; Okawa, H.; Ohtsui, M.; Zenke, Y.; Chiba, T.; Igarashi, K.; Yamamoto, M. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 7130–7139. [[CrossRef](#)]
7. Ishii, T.; Itoh, K.; Takahashi, S.; Sato, H.; Yanagawa, T.; Katoh, Y.; Bannai, S.; Yamamoto, M. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 16023–16029. [[CrossRef](#)]
8. Suzuki, T.; Muramatsu, A.; Saito, R.; Iso, T.; Shibata, T.; Kuwata, K.; Kawaguchi, S.I.; Iwawaki, T.; Adachi, S.; Suda, H.; et al. Molecular Mechanism of Cellular Oxidative Stress Sensing by Keap1. *Cell Rep.* **2019**, *28*, 746–758. [[CrossRef](#)]

9. Ng, A.Y.H.; Li, Z.; Jones, M.M.; Yang, S.; Li, C.; Fu, C.; Tu, C.; Oursler, M.J.; Qu, J.; Yang, S. Regulator of G protein signaling 12 enhances osteoclastogenesis by suppressing Nrf2-dependent antioxidant proteins to promote the generation of reactive oxygen species. *eLife* **2019**, *8*, e42951. [[CrossRef](#)]
10. Park, S.; Jang, J.W.; Moon, E.Y. Spleen tyrosine kinase-dependent Nrf2 activation regulates oxidative stress-induced cell death in WiL2-NS human B lymphoblasts. *Free Radic. Res.* **2018**, *52*, 977–987. [[CrossRef](#)]
11. Song, M.O.; Mattie, M.D.; Lee, C.H.; Freedman, J.H. The role of Nrf1 and Nrf2 in the regulation of copper-responsive transcription. *Exp. Cell. Res.* **2014**, *322*, 39–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Cortese, M.M.; Suschek, C.V.; Wetzels, W.; Kroncke, K.D.; Kolb-Bachofen, V. Zinc protects endothelial cells from hydrogen peroxide via Nrf2-dependent stimulation of glutathione biosynthesis. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *44*, 2002–2012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Rossignol, D.A. *The Use of N-Acetylcysteine as a Chelator for Metal Toxicity*; Springer: Singapore, 2019. [[CrossRef](#)]
14. Hjortso, E.; Fomsgaard, J.S.; Fogh-Andersen, N. Does N-acetylcysteine increase the excretion of trace metals (calcium, magnesium, iron, zinc and copper) when given orally? *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1990**, *39*, 29–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kelly, G.S. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern. Med. Rev.* **1998**, *3*, 114–127.
16. Wessels, I.; Maywald, M.; Rink, L. Zinc as a Gatekeeper of Immune Function. *Nutrients* **2017**, *9*, 1286. [[CrossRef](#)]
17. Schwarz, M.; Lossow, K.; Schirl, K.; Hackler, J.; Renko, K.; Kopp, J.F.; Schwerdtle, T.; Schomburg, L.; Kipp, A.P. Copper interferes with selenoprotein synthesis and activity. *Redox Biol.* **2020**, *37*, 101746. [[CrossRef](#)]
18. Müller, M.; Banning, A.; Brigelius-Flohé, R.; Kipp, A. Nrf2 target genes are induced under marginal selenium-deficiency. *Genes Nutr.* **2010**, *5*, 297–307. [[CrossRef](#)]
19. Kipp, A.P.; Frombach, J.; Deubel, S.; Brigelius-Flohé, R. Selenoprotein W as biomarker for the efficacy of selenium compounds to act as source for selenoprotein biosynthesis. *Methods Enzymol.* **2013**, *527*, 87–112. [[CrossRef](#)]
20. Marklund, S.; Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **1974**, *47*, 469–474. [[CrossRef](#)]
21. Zhang, C.; Bruins, M.E.; Yang, Z.Q.; Liu, S.T.; Rao, P.F. A new formula to calculate activity of superoxide dismutase in indirect assays. *Anal. Biochem.* **2016**, *503*, 65–67. [[CrossRef](#)]
22. Winther, J.R.; Thorpe, C. Quantification of thiols and disulfides. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840*, 838–846. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Sakurai, A.; Nishimoto, M.; Himeno, S.; Imura, N.; Tsujimoto, M.; Kunitomo, M.; Hara, S. Transcriptional regulation of thioredoxin reductase 1 expression by cadmium in vascular endothelial cells: Role of NF-E2-related factor-2. *J. Cell. Physiol.* **2005**, *203*, 529–537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Favreau, L.V.; Pickett, C.B. Transcriptional regulation of the rat NAD(P)H:quinone reductase gene. Identification of regulatory elements controlling basal level expression and inducible expression by planar aromatic compounds and phenolic antioxidants. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 4556–4561. [[PubMed](#)]
25. Santoso, S.P.; Chandra, I.K.; Soetaredjo, F.E.; Angkawijaya, A.E.; Ju, Y.H. Equilibrium Studies of Complexes between N-Acetylcysteine and Divalent Metal Ions in Aqueous Solutions. *J. Chem. Eng. Data* **2014**, *59*, 1661–1666. [[CrossRef](#)]
26. Zheng, J.; Lou, J.R.; Zhang, X.X.; Benbrook, D.M.; Hanigan, M.H.; Lind, S.E.; Ding, W.Q. N-Acetylcysteine interacts with copper to generate hydrogen peroxide and selectively induce cancer cell death. *Cancer Lett.* **2010**, *298*, 186–194. [[CrossRef](#)]
27. Stelmashook, E.V.; Genrikhs, E.E.; Kapkaeva, M.R.; Zelenova, E.A.; Isaev, N.K. N-Acetyl-L-cysteine in the Presence of Cu(2+) Induces Oxidative Stress and Death of Granule Neurons in Dissociated Cultures of Rat Cerebellum. *Biochemistry* **2017**, *82*, 1176–1182. [[CrossRef](#)]
28. White, A.R.; Bush, A.I.; Beyreuther, K.; Masters, C.L.; Cappai, R. Exacerbation of copper toxicity in primary neuronal cultures depleted of cellular glutathione. *J. Neurochem.* **1999**, *72*, 2092–2098. [[CrossRef](#)]
29. Liu, X.; Wang, L.; Cai, J.; Liu, K.; Liu, M.; Wang, H.; Zhang, H. N-acetylcysteine alleviates H₂O₂-induced damage via regulating the redox status of intracellular antioxidants in H9c2 cells. *Int. J. Mol. Med.* **2019**, *43*, 199–208. [[CrossRef](#)]

30. Finke, H.; Winkelbeiner, N.; Lossow, K.; Hertel, B.; Wandt, V.K.; Schwarz, M.; Pohl, G.; Kopp, J.F.; Ebert, F.; Kipp, A.P.; et al. Effects of a Cumulative, Suboptimal Supply of Multiple Trace Elements in Mice: Trace Element Status, Genomic Stability, Inflammation, and Epigenetics. *Mol. Nutr. Food Res.* **2020**, *64*, e2000325. [[CrossRef](#)]
31. Kumari, D.; Nair, N.; Bedwal, R.S. Morphological changes in spleen after dietary zinc deficiency and supplementation in Wistar rats. *Pharmacol. Rep.* **2019**, *71*, 206–217. [[CrossRef](#)]
32. Özcelik, D.; Uzun, H.; Naziroglu, M. N-acetylcysteine attenuates copper overload-induced oxidative injury in brain of rat. *Biol. Trace Elem. Res.* **2012**, *147*, 292–298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. De Caro, L.; Ghizzi, A.; Costa, R.; Longo, A.; Ventresca, G.P.; Lodola, E. Pharmacokinetics and bioavailability of oral acetylcysteine in healthy volunteers. *Arzneimittelforschung* **1989**, *39*, 382–386. [[PubMed](#)]
34. Arfsten, D.P.; Johnson, E.W.; Wilfong, E.R.; Jung, A.E.; Bobb, A.J. Distribution of radio-labeled N-Acetyl-L-Cysteine in Sprague-Dawley rats and its effect on glutathione metabolism following single and repeat dosing by oral gavage. *Cutan. Ocul. Toxicol.* **2007**, *26*, 113–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Jiang, J.; St. Croix, C.M.; Sussman, N.; Zhao, Q.; Pitt, B.R.; Kagan, V.E. Contribution of glutathione and metallothioneins to protection against copper toxicity and redox cycling: Quantitative analysis using MT+/+ and MT-/- mouse lung fibroblast cells. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 1080–1087. [[CrossRef](#)]
36. Hoffman, H.N., II; Phylidy, R.L.; Fleming, C.R. Zinc-induced copper deficiency. *Gastroenterology* **1988**, *94*, 508–512. [[CrossRef](#)]
37. Brewer, G.J. Practical recommendations and new therapies for Wilson's disease. *Drugs* **1995**, *50*, 240–249. [[CrossRef](#)]
38. Arredondo, M.; Martinez, R.; Nunez, M.T.; Ruz, M.; Olivares, M. Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc. *Biol. Res.* **2006**, *39*, 95–102. [[CrossRef](#)]
39. Freedman, J.H.; Ciriolo, M.R.; Peisach, J. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 5598–5605.
40. Gudekar, N.; Shanbhag, V.; Wang, Y.; Ralle, M.; Weisman, G.A.; Petris, M.J. Metallothioneins regulate ATP7A trafficking and control cell viability during copper deficiency and excess. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 7856. [[CrossRef](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

5 Diskussion

Die Essentialität der Spurenelemente Selen, Kupfer, Zink und Eisen ist seit Jahrzehnten beschrieben und die Forschung zu den einzelnen Spurenelementen ist weit vorangeschritten. Jedoch ist es entscheidend, neben den einzelnen Charakterisierungen, auch die Kombinationen der Spurenelemente untereinander zu betrachten. Alle vier Spurenelemente werden im Dünndarm absorbiert, welches den ersten Schnittpunkt im Metabolismus von Selen, Kupfer, Zink und Eisen darstellt. Über gemeinsame Transportmechanismen können die Spurenelemente so die Homöostase gegenseitig beeinflussen. Weiterhin sind alle vier Spurenelemente an der Regulation der Redoxhomöostase beteiligt, die unter anderem auch durch Nrf2 reguliert wird. Die vorliegende Dissertation sollte dazu beitragen die Interaktionen der Spurenelemente untereinander und in Hinblick auf den redox-sensitiven Transkriptionsfaktor Nrf2 zu verstehen sowie potenzielle mechanistische Erklärungen der Interaktionen zu beschreiben. Anhand verschiedener Mäusefütterungsstudien, die unter anderem an Mäusen mit systemischen Nrf2-KO durchgeführt wurden, sollte der Einfluss einer defizienten und adäquaten Spurenelementversorgung untersucht werden (**Kapitel 4.1, 4.2**). Anschließend *in vitro*-Versuche sollten der weiteren mechanistischen Aufklärung der Spurenelementinteraktionen dienen. Hierbei wurden die Spurenelementkonzentrationen zwischen defizient und leicht supplementiert moduliert (**Kapitel 4.2, 4.3**). In allen durchgeführten Experimenten wurden Marker der Spurenelementhomöostase sowie am Beispiel des Nrf2-Signalswegs die Auswirkungen auf den zellulären Redoxstatus untersucht (**Kapitel 4.1-4.3**).

5.1 Der Einfluss von Nrf2 auf die Spurenelementhomöostase

Der redox-sensitive Transkriptionsfaktor Nrf2 wird unter anderem als Antwort auf erhöhten intrazellulären oxidativen Stress aktiviert und kann so die Expression von Zielgenen induzieren. Zu diesen Zielgenen gehören viele Enzyme, die am Spurenelementmetabolismus von Selen, Kupfer, Zink und Eisen beteiligt sind (**siehe Kapitel 1.6.2, Abbildung 9**) [380, 381]. Ob Nrf2 dabei auch die Spurenelementhomöostase beeinflusst, ist bisher nicht geklärt. Der Einfluss eines Nrf2-KOs auf die Spurenelementhomöostase sowie Spurenelement-assoziierte Enzyme bei mit nährstoffreichem Haltungsfutter gefütterten Mäusen wurde in **Kapitel 4.1** untersucht.

Ein KO von Nrf2 hatte im Vergleich der vier Spurenelemente den größten Einfluss auf die Eisenhomöostase (**Kapitel 4.1, Abb. 1 A-C**). Dies zeigte sich in gesteigertem intestinalem und hepatischem Eisengehalt, welcher mit einem reduzierten Plasmaeisengehalt einherging. Dies ist

vermutlich auf eine verminderte Genexpression des Nrf2-Zielgens FPN1 (**Kapitel 4.1, Abb. 4F; Abbildung 10**), welches den Export von Eisen vermittelt [338], zurückzuführen. In der Literatur wurde beschrieben, dass ein systemischer Nrf2-KO zunächst keine deutlichen phänotypischen Veränderungen mit sich bringt [370], jedoch wurden bei alternden Tieren Anzeichen einer Anämie mit veränderter Morphologie der Erythrozyten beobachtet [421]. Eine weitere Auswirkung eines Nrf2-KOs waren extrem weiße Schneidezähne bei Nrf2-KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen, die auf einen verminderten Eisengehalt des Zahnschmelzes zurückgeführt wurde [422].

Ein systemischer Nrf2-KO bei adäquat mit Spurenelementen versorgten Mäusen resultierte in einer verminderten Zinkkonzentration im Intestinum und Plasma, während der Gehalt in der Leber unbeeinflusst war (**Kapitel 4.1, Abb. 1G-I, 5D, E; Abbildung 10**). Gleichzeitig zeigte sich bei Nrf2-KO-Tiereine erhöhte hepatische Expression des ZIP14-Transporters, welcher für den Zinkimport verantwortlich ist. Eine Untersuchung zum Einfluss von Nrf2 auf die bekannten Zinktransporter (ZIPs und ZnTs) zeigte, dass ZIP14 nicht auf eine Aktivierung von Nrf2 reagierte und somit vermutlich nicht durch Nrf2 reguliert ist [423]. ZIP14 ist neben der Zinkaufnahme auch am Eisentransport beteiligt [331, 343] und somit vermutlich durch die Veränderung des Eisenstatus reguliert (**Kapitel 4.1**).

Der intestinale Selengehalt war bei adäquater Spurenelementzufuhr durch einen systemischen Nrf2-KO vermindert, während der Selengehalt in Leber und Plasma unverändert war (**Kapitel 4.1, Abb. 1D-F, 2A-B; Abbildung 10**). Auch die hepatische GPX-Aktivität war von einem Nrf2-KO unbeeinflusst (**Kapitel 4.1, Abb. 2D**). Obwohl auch die GPX2, als Zielgen von Nrf2 [132], einen Beitrag zur GPX-Aktivität leistet, ist dieser Einfluss in der Leber zu vernachlässigen, wie es auch bei der Untersuchung von GPX2-KO-Mäusen bereits beschrieben wurde [152]. Dem gegenüber war die hepatische Gesamt-TXNRD-Aktivität, zu der TXNRD1 als Nrf2-Zielgen [133] maßgeblich beiträgt, durch einen systemischen Nrf2-KO auf ca. 60 % der WT-Aktivität reduziert (**Kapitel 4.1, Abb. 2C**).

Der KO von Nrf2 scheint bei Mäusen, die ein nährstoffreiches Haltungsfutter bekamen, nur marginale Einflüsse auf den Kupferstatus zu haben. Der hepatische Kupfergehalt war bei den Nrf2-KO-Mäusen reduziert, was sich aber nicht in der Expression von am Kupfermetabolismus-beteiligten Proteinen wie Ctr1 oder MT widerspiegelte (**Kapitel 4.1, Abb. 5B, C, I**). Auswirkungen eines Nrf2-KOs auf die Kupferhomöostase wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben. Der erniedrigte hepatische Kupfergehalt könnte auch eine Folge des gesteigerten hepatischen Eisengehaltes sein - eine Interaktion, die bereits in vielen Tierstudien beschrieben wurde [396-398].

5.2 Die Beeinflussung von Nrf2 durch Selen, Kupfer, Zink und Eisen

5.2.1 Einfluss der einzelnen Spurenelemente auf Nrf2

Alle vier Spurenelemente können die Redoxhomöostase beeinflussen, indem sie entweder als Bestandteil von antioxidativen Enzymen oxidativem Stress entgegenwirken oder selbst oxidativen Stress induzieren können. Oxidativer Stress kann entweder aufgrund der Defizienz der Spurenelemente entstehen, bei dem unter anderem die Funktion der Spurenelement-abhängigen Enzyme eingeschränkt ist, oder durch die Bildung von reaktiven Verbindungen nach Inkubation mit hohen, toxischen Konzentrationen der Spurenelemente (**siehe Kapitel 1.6.2**).

Nahezu alle bisher funktionell charakterisierten Selenoproteine sind für die Redoxregulation wichtig [137]. Die GPX2 und die TXNRD1 gehören aus der Gruppe der Selenoproteine zu den Nrf2-Zielgenen [132, 133]. Ein Mangel an Selen bzw. Selenoproteinen und die damit einhergehende Induktion des Nrf2-Signalweges [134, 135, 384, 385, 424, 425] wird auf unzureichend vorhandene zelluläre antioxidative Enzyme wie die GPXen und die TXNRDen zurückgeführt [426, 427] (**Abbildung 10**).

Eine Deletion des TRSP-Gens in Hepatozyten oder Makrophagen, welches zum Verlust von Selenoproteinen in diesen spezifischen Geweben führt, ging mit einer gesteigerten nukleären Nrf2-Translokation und einer erhöhten Genexpression von Nrf2-Zielgenen einher [384]. Traten der TRSP- und Nrf2-KO in Kombination auf, wurden erhöhte intrazelluläre ROS-Spiegel, eine erhöhte H₂O₂-Cytotoxizität, verminderte RNA-Expressionsspiegel von antioxidativen Enzymen sowie eine deutlich verringerte Überlebensfähigkeit von Mäusen beobachtet [384, 428]. Auch der Verlust an hepatischem SECISBP2 führte zur Induktion der Genexpression von Nrf2-Zielgenen [385]. Weiterhin ist der KO einzelner Selenoproteine eng mit der Nrf2-Aktivierung verknüpft. Eine Inhibition von TXNRD1 bzw. ein Leber-spezifischer KO führte *in vivo* und *in vitro* zu einer gesteigerten Translokation und somit Aktivierung von Nrf2 [167, 386, 429]. Die TXNRD1 wird auch als *Gatekeeper* von Nrf2 beschrieben und kann die Nrf2-Aktivierung steuern (Überblick in [167]). Tiere mit einem hepatischen GPX4-KO, der ca. 48 h nach der Geburt von Mäusen letal war, zeigten am ersten Lebenstag eine deutlich gesteigerte Expression einiger Nrf2-Zielproteine [387]. Im Gegensatz dazu führte ein KO von SELENOS in Thyreozyten zu einer Reduktion der Nrf2-Aktivität und seiner Zielgene, weswegen SELENOS als positiver Regulator von Nrf2, zumindest in Thyreozyten, beschrieben wurde [430]. Diese Ergebnisse unterstützen die wichtige Rolle von Selen und Selenoproteinen für die Nrf2-Antwort.

Die Effekte einer nutritiven Selendefizienz auf den Selenstatus und auf Nrf2 sind von verschiedenen Faktoren wie der Fütterungsdauer, dem Fütterungsstart und der Futtermatrix abhängig. So wurde mit einer achtwöchigen Selen-defizienten Torula-Hefe-basierten Diät eine leichte Steigerung der hepatischen NQO1-Aktivität, als klassisches Nrf2-Zielgen [431], und der mRNA-Expression der TXNRD1 beobachtet (**Kapitel 4.2, Abb. S6H, K**), nicht aber bei einer Dauer von sieben Wochen oder weniger (**Kapitel 4.1, Abb. 3A**) [432, 433]. Studien mit einem sehr deutlich ausgeprägten Effekt einer Selendefizienz auf Nrf2-Zielgene wurden über einen Zeitraum von bis zu sechs Monaten durchgeführt [135, 434-436]. Am häufigsten wird zur Induktion einer Selendefizienz ein Torula-Hefe-basiertes Futter verwendet. In der Torula-Hefe liegt Selen hauptsächlich als Selenhomolanthionin vor, welches zwar wasserlöslich ist, aber kaum bioverfügbar zu sein scheint [437, 438]. Während die Induktion einer Selendefizienz mit einem auf Torula-Hefe basierenden Futter über sechs Wochen erfolgreich war (Reduktion der Plasmaselenkonzentration um 87 %) [439], konnte in einer Studie mit vergleichbaren Selengehalten im Futter, welches nicht auf einer Torula-Hefe basierte, nur eine leichte Selendefizienz (Reduktion der Plasmaselenkonzentration um 14 %) erreicht werden, obwohl die Fütterung sogar über neun Wochen erfolgte [440]. Weiterhin spielt auch der Zeitpunkt des Beginns der Fütterung eine wichtige Rolle. Für Ratten wurde beschrieben, dass die Induktion einer Selendefizienz möglichst während der Säugephase beginnen sollte, da zu diesem Zeitpunkt die Selenkörperspeicher noch nicht vollständig gefüllt sind [437]. Die Selenquelle scheint hingegen keinen Einfluss auf die Selenhomöostase zu haben. Als zugesetzte Selenquelle werden in Tierversuchen am häufigsten Selenit oder Selenomethionin verwendet. Beide Substanzen steigerten im physiologischen Konzentrationsbereich sowohl den intrazellulären Selengehalt als auch die GPX-Aktivität in vergleichbarem Ausmaß [436].

Der Einfluss einer Selendefizienz auf die Nrf2-Aktivierung scheint bei Mäusen außerdem organspezifisch reguliert zu sein. In Organlysaten aus dem vorgestellten Tierversuch mit defizienter und adäquater Fütterung von Selen und Kupfer wurde die NQO1-Aktivität in fünf Abschnitten des Gastrointestinaltraktes (Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, Colon) und der Leber untersucht (**Kapitel 4.2, Abb. S6K; Anhang Abb. 13**). Lediglich im Duodenum (**Anhang Abb. 13A**) und in der Leber wurde eine leichte Steigerung der NQO1-Aktivität unter Selendefizienz sichtbar (**Kapitel 4.2, Abb. S6K**), während in den restlichen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes die NQO1-Aktivität unbeeinflusst war (**Anhang Abb. 13B-E**). Auch die Proteinexpression der NQO1 war in der Leber und im Colon durch die verschiedenen Fütterungen unbeeinflusst (**Anhang Abb. 14**). In verschiedenen Publikationen zeigten sich ebenfalls Unterschiede in den untersuchten Organen. So beobachteten Müller und Kollegen, dass die sechswöchige Fütterung einer Selen-armen Diät vornehmlich die Expression von

Nrf2-Zielgenen im Duodenum, weniger im Colon und nicht in der Leber beeinflusste [134]. Die Aktivität der NQO1 war ebenfalls am stärksten im Duodenum aktiviert, jedoch auch in der Leber [441]. Blum und Kollegen zeigten hingegen, dass die Genexpression von Nrf2-Zielgenen nur in der Leber durch eine Selendefizienz induziert werden konnte, während die Aktivitäten der beiden Nrf2-Zielgene NQO1 und GST in Leber und Colon unter Selen-defizienten Bedingungen gesteigert waren [442]. Bei Untersuchungen der HO-Aktivität in verschiedenen Organen von Selen-defizienten Ratten wurde ebenfalls nur in der Leber eine gesteigerte Aktivität ermittelt, nicht aber in Gehirn, Niere, Milz und den Testes [434]. Diese Ergebnisse und die der vorliegenden Publikationen deuten darauf hin, dass es unterschiedliche Regulationen der mRNA- und Proteinexpression sowie der Aktivitätsspiegel von Nrf2-Zielgenen in Abhängigkeit des Organs gibt.

Die Effektivität einer diätetischen Selendefizienz wirkt sich im Vergleich zu genetisch induzierbaren globalen Selenoprotein-Defizienzen (TRSP-KO [428], SECISBP2-KO [385]) bzw. der von einzelnen Selenoproteinen (TXRND1-KO [386], GPX4 [387]) weniger stark auf die Induktion von Nrf2 aus. Eine diätetische Selendefizienz hatte bei Mäusen keinen Einfluss auf die Lebensdauer [432], während die o. g. KOs zu deutlich verkürzter Lebenszeit führten [384, 385, 387]. Bei einer nutritiven Selendefizienz wird aufgrund der hierarchischen Regulation der Selenoproteine die Funktion der *housekeeping* Selenoproteine möglichst lange aufrechterhalten, sodass die Funktion der Selenoproteine, die hoch in Hierarchie stehen, nur wenig beeinflusst wird. Damit könnten die Unterschiede zwischen nutritiver und globaler Selenoprotein-Defizienz erklärt werden.

In vitro wurden in HepG2-Zellen keine Effekte einer Selendefizienz auf die Nrf2-Aktivierung festgestellt. Weder die mRNA-Expression, noch die Proteinexpression oder Aktivität von Nrf2-Zielgenen waren vom Selenstatus beeinflusst (**Kapitel 4.2, Abb. S11, J, K**). Das Ausbleiben einer Nrf2-Aktivierung könnte auf den basalen Selenspiegel im Zellkulturmedium (5 nM) unter den hier verwendeten -Selen-Kulturbedingungen (10 % Serum) zurückzuführen sein, der zu keiner manifesten Selendefizienz führte (**Kapitel 4.2**). Studien in verschiedenen Zelllinien (HepG2, Caco2) zeigten ebenfalls, dass eine alleinige Selendefizienz (Serumfreies Kultur- und Behandlungsmedium) *in vitro* keine Auswirkung auf eine Nrf2-Aktivierung hatte [429, 443, 444]. Im Gegensatz dazu konnte in einer anderen Studie an Caco2-Zellen gezeigt werden, dass nach zwei Tagen einer Selendefizienz (in Serumfreiem Medium) eine deutliche Steigerung der Expression zweier Isoformen der GST erreicht wurde. Auch die GPX2-Genexpression war leicht, aber nicht signifikant, gesteigert (Ratio -Selen/+Selen: 1,63) [445].

Der intrazelluläre GSH-Spiegel war nach 72-stündiger Inkubation von HepG2-Zellen mit 50 nM Selenit leicht vermindert (**Kapitel 4.2, Abb. S1L**). Dies wurde auch bei Ratten mit einer adäquaten Selenversorgung im Vergleich zu Ratten mit einer Selendefizienz festgestellt [446] und könnte auf eine Nrf2-Aktivierung, die zu einer gesteigerten Expression von Enzymen der GSH-Synthese (GCLC, GCLM) führt [447], hindeuten. Jedoch war die Genexpression des Nrf2-Zielgens GCLM durch eine Selenbehandlung nicht verändert (**Kapitel 4.2, Abb. S1I**). Weitere Studien zeigten hingegen verminderte hepatische und erhöhte Plasma-GSH-Spiegel bei Mäusen und isolierten Hepatozyten von Ratten, die eine Selen-defiziente Diät gefüttert bekommen haben [436, 448]. Die an der GSH-Synthese und dem -Export beteiligten Proteine waren unter Selendefizienz vermehrt exprimiert. Die erhöhten Plasma-GSH-Gehalte wurden mit einer erhöhten GSH-Synthese und dem anschließenden vermehrten hepatischen Export von GSH erklärt [436, 448]. Insgesamt scheint eine langfristige Selendefizienz, die nutritiv oder funktionell bedingt ist, eine Nrf2-Aktivierung zu vermitteln. Über die Aktivierung von Nrf2 wird die Expression von Nrf2-Zielgenen, zu denen einige antioxidative Enzyme gehören, gesteigert und somit oxidativem Stress entgegengewirkt.

Die genaue Wirkung von Kupfer auf Nrf2 ist kontrovers diskutiert und sollte vor allem vor dem Hintergrund der eingesetzten Konzentrationen kritisch betrachtet werden. In verschiedenen Studien wurde eine Hochregulation von Nrf2-Zielgenen (HO-1, TXNRD1, GCLM, GCLC, GPX2, GSTs), aber auch eine verminderte NQO1-Genexpression nach der Inkubation mit 100 - 600 μM CuSO_4 , beschrieben [383, 449, 450] (**Abbildung 10**). Auch in der hier durchgeführten Studie zeigten Nrf2-Zielgene wie GPX2, TXNRD1, GCLM und NQO1 auch bei einer 48-stündigen Inkubation von HepG2-Zellen mit 100 μM CuSO_4 eine gesteigerte Expression (**Kapitel 4.2, Abb. S1E, F, I, J**). Die Steigerung der mRNA-Expression hatte jedoch, bis auf eine konzentrationsabhängige Steigerung der GPX2-Proteinexpression, keinen Einfluss auf Proteinexpression oder Enzymaktivität von Nrf2-abhängigen Proteine (**Kapitel 4.2, Abb. 2B, E, S1K**).

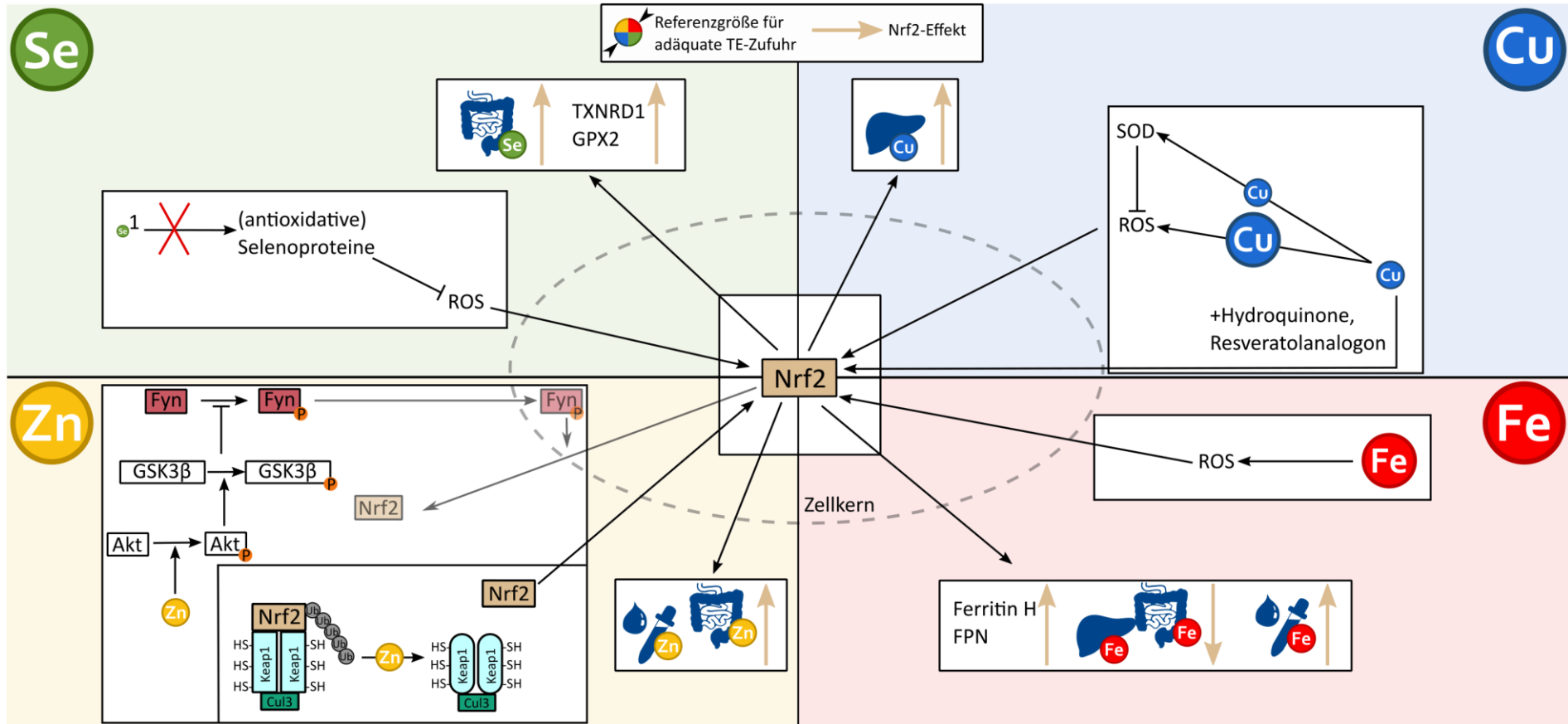


Abbildung 10. Die Wechselwirkungen zwischen den essentiellen Spurenelementen Selen, Kupfer, Zink und Eisen und dem Transkriptionsfaktor Nrf2. Übersicht anhand der Daten aus *in vitro*- und *in vivo*-Studien (Kapitel 4.1-4.3). Für jedes der Spurenelemente ist die Wirkung und der vermutete Mechanismus zur Beeinflussung von *nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2* (Nrf2) dargestellt. Die Größe der Spurenelementensymbole beschreibt die Konzentration des Spurenelements, die für die Nrf2-Aktivierung nötig ist. Ebenso ist der Effekt von Nrf2 auf den Metabolismus der einzelnen Spurenelemente dargestellt.¹Selenoproteindefizienz durch unzureichende Selenzufuhr oder durch KO einzelner Selenoproteine bzw. Gene, die an der Selenoproteinbiosynthese beteiligt sind. Cu – Kupfer; Fe – Eisen; FPN – Ferroportin; GPX2 – Glutathionperoxidase 2; GSK3β – Glykogensynthase Kinase 3β; ROS – reaktive Sauerstoffspezies; Se – Selen; SOD – Superoxiddismutase; TXNRD1 – Thioredoxinreduktase 1

Eine kurzzeitige Inkubation von HepG2- und HT29-Zellen mit 50 μM CuSO_4 hatte keinen Einfluss auf die nukleäre Nrf2-Translokation *in vitro* (**Kapitel 4.3, Abb. 1E**), wie es auch in vaskulären Endothelzellen gezeigt wurde [451]. Eine Modulation des Kupferstatus von defizient zu adäquat in der Mausfütterungsstudie, die zu keiner offensichtlichen Veränderung von Kupferbiomarkern führte, hatte auch keinen Einfluss auf die Aktivität und Expression von Nrf2-Zielgenen (**Kapitel 4.2, Abb. S6D, H, K**). Demgegenüber wurde bei Mäusen, die eine Kupfer-defiziente Fütterung ab Geburt erhielten, eine gesteigerte Aktivität und Expression der NQO1 in der Leber gemessen (nicht veröffentlichte Daten). Möglicherweise könnte dies auf erhöhten intrazellulären oxidativen Stress, der aufgrund einer Herunterregulation des Cuproenzym SOD1 ausgelöst wird, zurückzuführen sein [391]. In dieser Fütterungsstudie war die Gesamt-SOD-Aktivität jedoch unverändert (nicht veröffentlichte Daten).

Weiterhin wurde für Kupfer beschrieben, dass es verschiedene Substanzen aktivieren kann, die anschließend Nrf2 aktivieren (**Abbildung 10**). So konnte Kupfer nicht allein, aber in Kombination mit Hydroquinonen zu einem starken Anstieg der ARE-getriebenen Genexpression und der Proteinexpression von HO-1 führen [452]. Weiterhin ist Kupfer für die Aktivierung von 3,4-dihydroxy-trans-stilben, einem hydroxylierten Analogon von Resveratol, welches im Folgenden die Nrf2-Signalkaskade aktiviert, essentiell. Der protektive Effekt beider Substanzen gegenüber oxidativen Schäden aufgrund von erhöhtem intrazellulärem oxidativem Stress konnte nur im Zusammenspiel mit Kupfer erreicht werden [453]. Somit scheint Kupfer vor allem im Zusammenspiel mit Nrf2-Aktivatoren Nrf2 zu aktivieren und weniger stark, wenn es allein verwendet wird. Der Einfluss von Kupfer auf Nrf2 lässt sich hauptsächlich auf hohe, toxische Konzentrationen oder das Zusammenspiel mit anderen Substanzen zurückführen. Bei leicht defizienten bzw. adäquaten Kupferbedingungen, wie sie in der vorliegenden Dissertation untersucht wurden (**Kapitel 4.2, 4.3**), erfolgte, wenn überhaupt, nur eine geringe Nrf2-Aktivierung.

Verschiedene *in-vitro* und *in-vivo* Studien zeigten, dass bei einer Zinkdefizienz erhöhte Spiegel an oxidativem Stress bzw. oxidativen Schäden auftreten [388, 454-456]. Demgegenüber führte die Inkubation mit nicht toxischen Zinkkonzentrationen (50 - 100 μM) durch eine Nrf2-Aktivierung zum Schutz vor oxidativem Stress [457-459] (**Abbildung 10**). Eine Inkubation von HepG2- und HT-29-Zellen mit 50 μM ZnSO_4 für vier Stunden führte ebenfalls zu einer 50- bzw. 30-fach gesteigerten nukleären Nrf2-Translokation (**Kapitel 4.3, Abb. 1E; Anhang Abb. 15D**). In Zink-behandelten HepG2- und HT29-Zellen konnte zudem ein erhöhter gesamt-GSH-Gehalt nach Behandlung mit Zink gemessen werden (**Kapitel 4.3, Abb. 1F; Abb. 15E**), wie es auch in der Literatur beschrieben wurde [458, 459]. Die Induktion der GSH-Synthese wird auf die gesteigerte

Expression des Nrf2-Zielgens GCL, welches den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der *de novo*-GSH-Synthese katalysiert [460], zurückgeführt [458, 459].

Für die Wirkung von Zink auf Nrf2 werden verschiedene Mechanismen beschrieben. Zink beeinflusst die Nrf2-Aktivierung zum einen vermutlich über eine Stimulation der AKT und folglich der Glykogensynthase Kinase (GSK)-3 β -Phosphorylierung [461, 462]. Bei einer Zinkdefizienz wurde eine verringerte AKT- und GSK3 β -Phosphorylierung beobachtet, während Negativregulatoren von AKT hochreguliert wurden. Dies hatte eine erhöhte nukleäre Fyn-Expression, einem wichtigen negativen Regulator von Nrf2, zur Folge [456, 457] (**Abbildung 10**). Als zweiter Mechanismus wurde beschrieben, dass die Zinkbindung an das Nrf2-Inhibitorprotein KEAP1 zu dessen Konformationsänderung führte und Nrf2 somit nicht mehr ubiquitiniert und degradiert wurde [463] (**Abbildung 10**).

In der Literatur ist beschrieben, dass sowohl die Inkubation mit nicht-cytotoxischen als auch mit cytotoxischen Eisenkonzentrationen Nrf2 *in vivo* und *in vitro* aktivieren konnte [464-466]. Die Inkubation mit ansteigenden Eisenkonzentrationen hatte keinen Einfluss auf die Zellviabilität von primären Hepatozyten von WT-Mäusen, während die Zellviabilität von primären Hepatozyten von Nrf2-KO-Mäusen bei 200-fach geringerer Eisenkonzentration schon deutlich reduziert war. Der nicht-cytotoxische Effekt der Eisenbehandlung in WT-Zellen wurde auf eine deutliche Nrf2-Aktivierung zurückgeführt [464]. In verschiedenen Tierstudien konnte durch Fütterung eines Eisen-reichen Futters ebenfalls eine Nrf2-Aktivierung und eine gesteigerte Expression der Zielgene beobachtet werden [464, 465]. Eine Nrf2-Aktivierung wurde in murinen Astrozyten nur mit Eisenkonzentrationen beobachtet, die cytotoxisch waren [466]. Eine Eiseninkubation führt vermutlich über die Induktion von reaktiven Verbindungen, die zellschädigend wirken, zu einer Nrf2-Aktivierung [464, 466] (**Abbildung 10**). Der Einfluss von Eisen auf Nrf2 wurde im Rahmen der vorgestellten Arbeit nicht untersucht.

5.2.2 Interaktion von Kupfer und Zink im Hinblick auf Nrf2 und MTF1

Die bisherigen Untersuchungen zu den Interaktionen von Kupfer und Zink wurden hauptsächlich unter dem Schwerpunkt des therapeutischen Effekts einer Zinksupplementation bei Morbus Wilson durchgeführt [411]. Im Rahmen des in **Kapitel 4.3** vorgestellten Manuskripts wurden die Interaktionen zwischen Zink und Kupfer auf Ebene der zellulären Homöostase sowie der Modulation der Transkriptionsfaktoren Nrf2 und MTF1 untersucht (**Abbildung 11**). Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit NAC, einem GSH-Vorläufer und Metalchelator, soll hierbei nicht weiter betrachtet werden.

Drei verschiedene humane Krebszelllinien (HepG2, HT29, THP-1) wurden für sechs Stunden mit je 50 μ M Kupfer und/oder Zink behandelt. Der Kupfergehalt war nach sechsstündiger Inkubation in den THP-1- und HepG2-Zellen ähnlich, während in den HT29-Zellen die Kupferkonzentration ca. halb so hoch war. Auffällig war, dass ohne Kupferbehandlung die Kupferkonzentrationen nur in den THP-1- und HT29-Zellen unterhalb des Detektionslimits lagen, während in den HepG2-Zellen der basale Kupfergehalt messbar war. Eine zusätzliche Zinkgabe führte nur in den HepG2-Zellen zu einer verminderten intrazellulären Kupferkonzentration (**Kapitel 4.3, Abb. 2A, C, E, Abbildung 11**). Die Verminderung des intrazellulären Kupfergehaltes durch Zink ist wie bereits beschrieben das Prinzip des therapeutischen Wirkens von Zink bei einer Morbus Wilson-Erkrankung [411]. In diesem Falle soll bereits das in der Nahrung enthaltene Kupfer nicht aufgenommen bzw. direkt über die Enterozyten ausgeschieden werden. In vielen Tier- und Humanstudien wurde der hemmende Effekt einer Zinksupplementation auf die Kupferaufnahme beschrieben [411, 420, 467, 468]. In Caco2-Zellen konnte gezeigt werden, dass Zink den intrazellulären Kupfergehalt leicht senkt [469] oder keinen Einfluss auf die Kupferhomöostase hatte [470]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Zinkeffekte auf den Kupferhaushalt zelltypspezifisch sind und vor allem die Leber betreffen. Insgesamt scheint der Zinkeffekt einer Reduktion der intrazellulären Kupferkonzentration eine höhere Relevanz bei der Wilson-Erkrankung zu haben. Zur mechanistischen Aufklärung der hier identifizierten zelltypspezifischen Effekte könnten Expressions- und Translokationsstudien von Transportproteinen durchgeführt werden.

Sowohl der intrazelluläre Zinkgehalt als auch der Einfluss von Kupfer auf diesen unterschieden sich in den drei verwendeten Zelllinien. (**Abbildung 11**). Die intrazellulären Zinkgehalte ordnen sich nach folgendem Muster: THP-1 < HepG2 < HT29, mit der größten prozentualen Steigerung des Zinkgehaltes im Vergleich zu den nicht mit Zink behandelten Zellen in den THP-1-Zellen (**Kapitel 4.3, Abb. 2B, D, F**). Zink spielt v. a. eine wichtige Rolle im Immunsystem (Überblick [471]), weswegen vermutet werden könnte, dass die Monozyten am stärksten auf eine Veränderung in der Zinkversorgung ansprechen. Eine zusätzliche Kupferbehandlung führte in HT29- und THP-1-, nicht aber in HepG2-Zellen zu einer gesteigerten Zinkaufnahme (**Kapitel 4.3, Abb. 2D, F; Abbildung 11**). Hierbei wird deutlich, dass Kupfer und Zink die gegenseitige Homöostase zelltypspezifisch beeinflussen und somit mögliche gemeinsame Aufnahme-, Speicher- und Transportmechanismen eine Rolle spielen könnten. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass eine 48-stündige Kupferbehandlung den intrazellulären Zinkgehalt in Caco2- und HepG2-Zellen verminderte [403]. Bei einem DMT1- oder Ctr1-KO war die Aufnahme von Kupfer und Zink vermindert [472], während andere Studien eine Beteiligung des DMT1-Transporters an der Aufnahme von Kupfer und Zink widerlegen [224]. Um diese Interaktionen weiter zu

charakterisieren, müssten genauere Untersuchungen von verschiedenen Transportern oder Speicherproteinen durchgeführt werden. Hierfür würden sich zum einen Expressionsanalysen (Gen- und Proteinebene) und zum anderen mögliche intrazelluläre Translokationsanalysen anbieten.

Da Kupfer und Zink von MTs gebunden werden können, spielen MTs vermutlich eine besondere Rolle bei den Interaktionen von Kupfer und Zink. Kupfer weist eine deutlich höhere Affinität zu MTs auf als Zink und kann dieses im MT ersetzen [414, 415, 473]. Induziert wird die Expression von MTs hauptsächlich durch MTF1 [308-311], aber auch die Beteiligung von Nrf2 ist beschrieben [383]. Die Untersuchung der nukleären Translokation von Nrf2 und MTF1 in den drei humanen Krebszelllinien sollte einen Aufschluss über den Einfluss einer Kupfer- und Zinkbehandlung geben und mögliche Interaktionen beider Elemente in Bezug auf die Transkriptionsfaktoren aufzeigen. Die nukleäre Translokation von MTF1 in HepG2- und HT29-Zellen wurde ausschließlich durch Zink, aber nicht durch Kupfer induziert (**Anhang Abb. 15A, C, Abbildung 11**). In den Kernlysaten der THP-Zellen konnte keine Expression von MTF1 nachgewiesen werden. Die stärkere Aktivierung von MTF1 und eine nachgeschaltete höhere Expression von MTs durch Zink im Vergleich zu Kupfer wurde auch in anderen Studien gezeigt [311, 412, 474, 475]. Die Proteinexpression der MTs war jedoch sowohl durch die sechsstündige Inkubation mit Kupfer und Zink (**Anhang Abb. 15B**), als auch durch die 72-stündige Inkubation mit Kupfer nicht beeinflusst (**Kapitel 4.2, Abb. S2A**).

Eine Ko-Inkubation mit Kupfer führte trotz des gesteigerten intrazellulären Zinkgehaltes (**Kapitel 4.3, Abb. 2D**) zu einer verminderten MTF1-Translokation in HT29-Zellen (**Anhang Abb. 15C**). Die nukleäre MTF1-Translokation in den HepG2-Zellen blieb hingegen durch eine Ko-Inkubation unbeeinflusst (**Anhang Abb. 15A**). Eine weitere Untersuchung von MTF1-Zielgenen oder des intrazellulären Gehaltes an „freiem“ Zink, welches als die biologisch aktive Form des Zinks gilt [298], würde helfen, diese Ergebnisse zu interpretieren. Auch eine Unterscheidung des an MT-gebundenen Kupfers bzw. Zinks im Vergleich zum Gesamt-MT-Gehalt könnte weitere Indizien für die möglichen Interaktionen von Zink und Kupfer und deren gemeinsamen Einfluss auf MTF1 liefern.

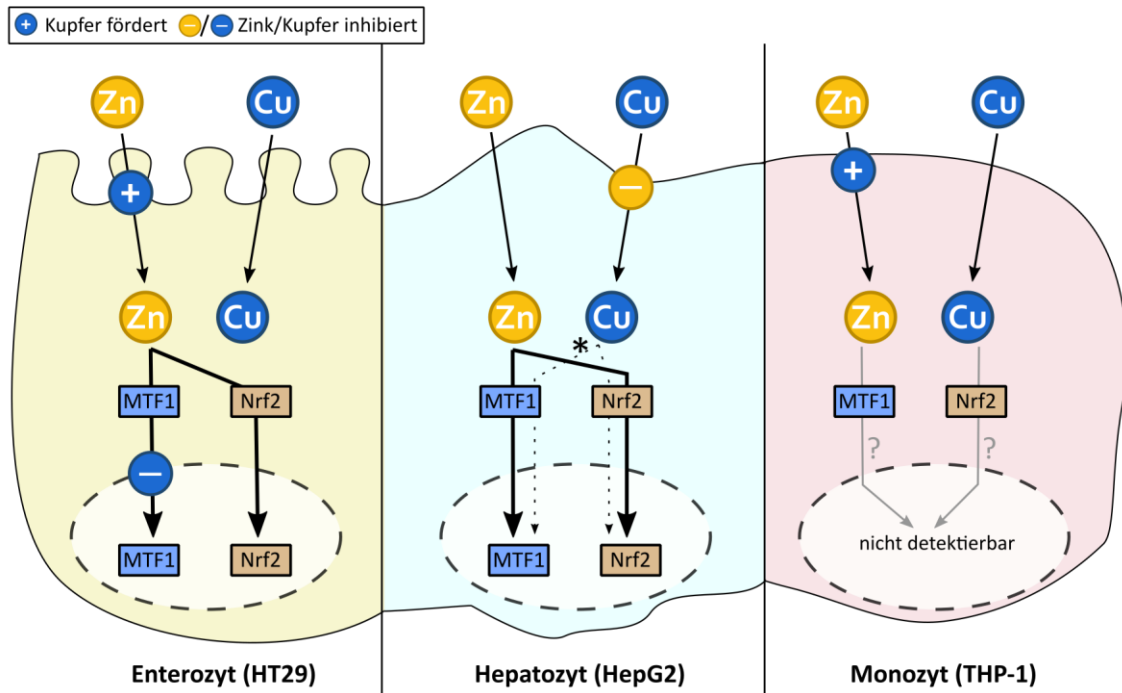


Abbildung 11. Die Interaktionen von Kupfer und Zink in verschiedenen Zelllinien. Dargestellt sind der Prozess der Spurenelementaufnahme, gemessen als intrazelluläre Spurenelementkonzentration nach einer sechsständigen Inkubation mit Kupfer und/oder Zink sowie der Einfluss beider Spurenelemente auf die Translokation der Transkriptionsfaktoren *nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2* (Nrf2) und *metal regulatory transcription factor 1* (MTF1) nach 4-stündiger Inkubation mit beiden Spurenelementen in HT29-, HepG2- und THP-1-Zellen. *Daten aus *in vitro*-Versuchen über 72 h (Kapitel 4.2), bei denen Effekte auf MTF1- und NRF2-Zielgene ermittelt wurden, jedoch keine direkte Translokation der Transkriptionsfaktoren betrachtet wurde (gestrichelte Linie).

In der Literatur ist für beide Spurenelemente beschrieben, dass sie Nrf2 aktivieren können [383, 458]. In HepG2- und HT29-Zellen konnte eine Nrf2-Translokation nur durch Zink, nicht aber durch Kupfer induziert werden (Kapitel 4.3, Abb. 1E, Anhang Abb. 15D). Weiterhin hatte eine Ko-Inkubation mit Kupfer keinen Einfluss auf die durch Zink-induzierte Nrf2-Translokation (Kapitel 4.3, Abb. 1E, Anhang Abb. 15D; Abbildung 11). In einer Studie, in der der Einfluss von Kupfer und Zink auf die Nrf2-Aktivierung in fünf verschiedenen humanen Krebszelllinien untersucht wurde, zeigte sich, dass Kupfer überwiegend eine stärkere Nrf2-Aktivierung als Zink auslöste [476]. Vergleicht man jedoch die eingesetzten Konzentrationen zwischen Kupfer und Zink fiel auf, dass für die Aktivierung von Nrf2 durch Kupfer höhere Konzentrationen nötig waren als für Zink [476]. Zink scheint also Nrf2 in physiologischen Konzentrationen zu aktivieren, während diese für eine Kupfer-abhängige Nrf2-Aktivierung nicht ausreichen. Die Translokation von Nrf2 in HT29-Zellen war durch die alleinige Zinkgabe maximiert und konnte durch die von Kupfer-vermittelte Steigerung der intrazellulären Zinkkonzentration nicht weiter stimuliert werden (Kapitel 4.3, Abb. 2D, Anhang Abb. 15D; Abbildung 11). Interessant wäre herauszufinden, ob bei sehr hohen, toxischen Kupferkonzentration in Kombination mit einer

Zinkbehandlung ein additiver Effekt auf die Nrf2-Aktivierung auftritt, oder ob auch in dieser Situation Zink als Hauptaktivator von Nrf2 wirkt.

Eine weitere Interaktion von Kupfer und Zink, die Auswirkung auf den intrazellulären Redoxstatus haben könnte, zeigte sich bei der Bestimmung des Gesamt-GSH-Gehaltes (GSH+GSSG). Während der intrazelluläre GSSG-Gehalt von einer kurzfristigen Kupfer- und Zinkbehandlung unbeeinflusst war (Daten nicht gezeigt), wurde der Gesamt-GSH-Gehalt in HepG2- und HT29-Zellen durch Zink, aber nicht durch Kupfer gesteigert (**Kapitel 4.3, Abb. 1F; Anhang Abb. 15E**). Dies könnte durch eine Zink-induzierte Steigerung der Expression des Nrf2-Zielgens GCL ausgelöst werden, die in der vorliegenden Studie nicht untersucht wurde, jedoch in der Literatur beschrieben ist [231, 458, 459]. Eine Ko-Inkubation mit Kupfer hatte keinen Einfluss auf den GSH-Gehalt in HepG2-Zellen (**Kapitel 4.3, Abb. 1F**), reduzierte jedoch den GSH-Gehalt in HT29-Zellen (**Anhang Abb. 15E**), ein Muster, dass sich bereits für die nukleäre Translokation von MTF1 zeigte (**Anhang Abb. 15C**). Ob sich durch die veränderte MTF1-Translokation auch die Gen- und Proteinexpression von MTs in HT29-Zellen verändert, bleibt zunächst unklar. Da das Zusammenspiel zwischen GSH und MT, wichtig für die Regulation der Kupferhomöostase ist (siehe **Kapitel 1.3; Abbildung 5**), könnte dies in diesem Kontext weiter charakterisiert werden.

5.2.3 Interaktion von Selen und Kupfer im Hinblick auf Nrf2

Der Zusammenhang zwischen Selen bzw. Kupfer und Nrf2 wurde bereits diskutiert (siehe **Kapitel 5.2.1**). Während Kupfer erst bei sehr hohen, cytotoxischen Konzentrationen zu einer Nrf2-Aktivierung führt [383, 449], konnte für Selen dieser Effekt vor allem bei einer Defizienz gezeigt werden [134, 135]. In der hier durchgeführten Mausfütterungsstudie wurden die Selen- und Kupfergehalte jeweils von suboptimal zu adäquat moduliert (**Kapitel 4.2**). Die Veränderungen der NQO1-Aktivität im Duodenum und der Leber wurden durch die Unterschiede in der Selenfütterung ausgelöst. Die zusätzliche Kupferintervention hatte jedoch keinen weiteren Einfluss auf die NQO1-Aktivität (**Kapitel 4.3, Abb. S6K; Anhang Abb. 13**). *In vitro* wurde der Kupferstatus von adäquat zu leicht supplementiert verändert, während der Selenstatus defizient bzw. adäquat war. Die durch Kupfer-induzierten Effekte auf die Genexpression der Nrf2-Zielgene (TXNRD1, NQO1, GCLM) wurden durch die Modulation des Selenstatus nicht verändert (**Kapitel 4.3, Abb. S1, F, I, J**). Das einzige Nrf2-Zielgen, welches ein anderes Muster zeigte, ist die GPX2. Die Selengabe bei mit Kupfer-behandelten Zellen resultierte in einer verminderten GPX2-Genexpression (**Kapitel 4.3, Abb. S1E**), während eine Kupferbehandlung bei adäquater Selenversorgung auf Proteinebene zur Induktion der GPX2-

Expression führte (**Kapitel 4.3, Abb. 2C**). Die zugrundeliegenden Mechanismen für diesen Effekt sind jedoch unklar. Da die GPX2 hauptsächlich im Darm und weniger in der Leber exprimiert ist, wäre es interessant, diese Interaktionen auch in intestinalen Zellen zu untersuchen und möglicherweise weiter zu charakterisieren.

5.3 Veränderungen in der Spurenelementhomöostase von Kupfer, Zink und Eisen durch eine Modulation des Selenstatus

Für die Betrachtung der Veränderungen in der Spurenelementhomöostase von Kupfer, Zink und Eisen durch die Modulation des Selenstatus werden von der im **Kapitel 4.1** vorgestellten Studie nur die WT-Tiere, die eine unterschiedliche Selenfütterung (defizient, adäquat, supplementiert) erhielten, miteinander verglichen.

Die Modulation des Selenstatus hatte keinen Einfluss auf die intrazellulären Eisengehalte (**Kapitel 4.1, Abb. 4A, D**). Auch die weiteren funktionellen Marker und Transportproteine des Eisenstoffwechsels waren bis auf die Ferritin H-Proteinexpression, die vermutlich eher als Effekt der Selendefizienz auf Nrf2 zu erklären ist, unbeeinflusst (**Kapitel 4.1, Abb. 4B, C, E-J**). Ratten, die mit zwölf bzw. 24 Wochen über einen deutlich längeren Zeitraum als in der vorliegenden Studie (**Kapitel 4.1**) Selen-defizient gefüttert wurden, wiesen deutlich erhöhte Eisengehalte in Serum und Organen (Leber, Niere, Milz) im Vergleich zu adäquat mit Selen gefütterten Tieren auf [477].

Die Kupfer- und Zinkhomöostase waren vom Selenstatus gegensätzlich reguliert. So konnte für eine adäquate Selenversorgung gezeigt werden, dass die zirkulierende Kupferkonzentration im Vergleich zur Selen-defizienten Gruppe stieg, während der zirkulierende Zinkgehalt sank (**Kapitel 4.1, Abb. 5A, D**). Eine gesteigerte zirkulierende Kupferkonzentration nach Selensupplementation wurde auch bei Wiederkäuern gezeigt [478], während in anderen Studien kein Effekt einer Selensupplementation auf den Kupfer- [477, 479, 480] bzw. den Zink-Status beobachtet wurde [481]. Dabei muss beachtet werden, dass in der hier gezeigten Studie die Auswirkung einer adäquaten Selenversorgung im Vergleich zu einer Selendefizienz betrachtet wurde, während in der Literatur der Effekt einer Selensupplementation bei vorher adäquater Selenversorgung untersucht wurde. In einer Studie, die eine 24-wöchige Selendefizienz im Vergleich zur adäquaten Selenversorgung bei Ratten untersuchte, wurden wie in der vorliegenden Studie erniedrigte Zinkgehalte im Serum von adäquat gefütterten Ratten beobachtet [477].

Die Expression einzelner Transporter oder assoziierter Proteine von Kupfer und Zink war hingegen durch die Modulation des Selenstatus in den WT-Tieren nicht verändert (**Kapitel 4.1, Abb. 4H, I; 5C, F, G, H; I**). Hierbei wurden jedoch Gen- und Proteinexpression von verschiedenen Genen und Proteinen untersucht und somit kann keine generelle Aussage getroffen werden. Eine zusätzliche Untersuchung der Translokation von Transportern bzw. Transportproteinen könnte helfen, die leichten Unterschiede in der Kupfer- und Zinkhomöostase zu verstehen. Ein gemeinsamer Transportmechanismus von Zink und Selen stellt der ZIP8-Transporter dar [482]. Es wurde gezeigt, dass ZIP8 Zink- und Bicarbonat-abhängig Selen transportieren kann [482] und dass eine ZIP8-Defizienz die hepatische Selenkonzentration verminderte, während die Zinkkonzentration unbeeinflusst war [483]. Dies könnte einen Zusammenhang zwischen dem verminderten Zinkplasmagehalt bei gesteigerter Selenzufuhr erklären und könnte durch eine Expressionsanalyse von ZIP8 und dem Zinkgehalt in verschiedenen Organen unterstützt werden.

In HepG2-Zellen, die defizient bzw. adäquat mit Selen und adäquat bzw. supplementiert mit Kupfer versorgt wurden, hatte Selen keinen Einfluss auf die intrazelluläre Kupferkonzentration (**Kapitel 4.2, Abb. 5A**), reduzierte jedoch die MT2a-Expression (**Kapitel 4.2, Abb. 1B; 5B**). Eine Selengabe führte in verschiedenen Rattenmodellen, die zusätzlich Cadmium erhielten, zu einer verminderten MT-Expression [484, 485]. Da MTs v. a. über MTF1 reguliert werden, könnte Selen über diesen Transkriptionsfaktor die Expression hemmen. Anhand der Daten der Fütterungsstudie, in der die MTF1-Expression mit steigender Selenzufuhr induziert wurde (**Kapitel 4.1, Abb. 5J**), kann diese Vermutung zunächst nicht unterstützt werden. Jedoch muss beachtet werden, dass hierbei die Gesamtexpression im Leberhomogenat und nicht die nukleäre Translokation untersucht wurde und somit keine Aussage über eine mögliche Aktivierung und Translokation von MTF1 formuliert werden kann. In ersten *in vitro*-Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses von Selen auf die nukleäre Translokation von MTF1 konnte kein Effekt einer Selenbehandlung ermittelt werden (Daten nicht gezeigt).

5.4 Interaktionen des Selen- und Kupfermetabolismus

Die Interaktionen zwischen Selen und Kupfer sind im Gegensatz zu den Interaktionen zwischen Kupfer und Eisen und Kupfer und Zink (siehe **Kapitel 1.7**) bisher nur wenig untersucht. Bisherige *in vivo*-Studien zu den Interaktionen von Selen und Kupfer lieferten widersprüchliche Resultate. So konnte in verschiedenen Fütterungsstudien gezeigt werden, dass beide Spurenelemente die Homöostase des jeweils anderen nicht beeinflussen [479, 480], eine Kupfergabe zu erhöhten hepatischen Selenkonzentrationen führte [486] oder eine Gabe Selen-angereicherter Diäten die Konzentration des zirkulierenden Kupfers steigerte [478]. Weiterhin wurde bei Mäusen und

Ratten mit einer Kupferdefizienz eine Inhibierung der GPX-Aktivität beschrieben [391, 487-489]. Jedoch wurde auch nach einer subkutanen Kupferinjektion [490] und bei Ratten mit einer hepatischen Kupferakkumulation aufgrund eines ATP7B-KOs [491] eine verminderte GPX-Aktivität gemessen.

Diese Daten zeigen, dass Kupfer die Selenhomöostase beeinflussen kann, jedoch wurden bisher meist nicht-physiologische Veränderungen der Kupferhomöostase untersucht. Bei gesunden Menschen treten sowohl eine schwere nutritive Kupferdefizienz als auch eine Kupferübersorgung selten auf. Um zu untersuchen, ob Kupfer auch unter physiologischen Bedingungen den Selenstatus verändern kann, wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation zwei verschiedene Modelle gewählt. In einer *in vivo*-Studie wurden Mäusen für acht Wochen ab dem Absatz defizient und adäquat mit Kupfer (1,6 ppm und 6 ppm) und Selen (0,02 ppm und 0,15 ppm) gefüttert, um Veränderungen des Kupfer- und Selenstatus zu erreichen. Eine deutliche Modulation des Kupferstatus, die sich in Veränderungen des Plasmakupferspiegels bzw. der hepatischen Kupfergehalte äußerte, ist aufgrund der strikten homöostatischen Regulation des Kupfermetabolismus schwer zu erreichen. Nur im Colon wurden leicht verminderte Kupfergehalte gemessen, während der hepatische Kupfergehalt unverändert war (**Kapitel 4.2, Abb. 6B, D**). Studien, in denen eine deutliche Modulation der Kupferhomöostase durch eine Kupfer-defiziente Fütterung erreicht wurde, begannen die Intervention bereits entweder intrauterin oder ab der Geburt über die Muttermilch mit noch geringeren Kupfergehalten des Futters als in dem hier vorgestellten Versuch [391, 406]. Der um 40 % reduzierte Kupfergehalt in den Fäzes der Kupfer-defizienten Mäuse (**Kapitel 4.2, Abb. 6G**) indiziert eine erfolgreiche Fütterung, da bei Kupfer-defizienten Diäten die Absorptionsrate für Kupfer bis auf das fünffache gesteigert werden kann und somit die Ausscheidung sinkt [272-274].

Im *in vitro*-Modell wurde mit der Kupferinkubation eine Modulation des Kupferstatus von adäquat bis leicht supplementiert dargestellt. Diese Behandlung resultierte in einer Steigerung des intrazellulären Kupfergehaltes um 37 % (**Kapitel 4.2, Abb. 5A**), die nur eine leichte Verminderung der MTT-Reduktionskapazität und des Zellwachstums mit sich brachte (**Kapitel 4.2, Abb. S1A, B**). Dies könnte darauf hindeuten, dass Kupfer vorrangig das Zellwachstum verlangsamt und folglich zu einer Verminderung der Stoffwechselaktivität führt. Es ist davon auszugehen, dass die Kupferbehandlung der vorliegenden Studie nicht zu einer deutlichen Zellschädigung oder der Induktion von oxidativem Stress führte, die einhergehend mit einer Dysfunktion der Zellen wäre (**Kapitel 4.2**).

Um genauer zu verstehen wie Kupfer auf die verschiedenen Selenoproteine bzw. auf die verschiedenen Ebenen der Selenoproteinexpression und der Selenoproteinsynthese wirkt, ist es wichtig, verschiedene Faktoren, die die Regulation der Selenoproteine beeinflussen, zu betrachten. Insgesamt beeinflusste Kupfer die Selenhomöostase verstärkt in Zellen, die adäquat mit Selen versorgt waren (**Kapitel 4.2**). Dies zeigte sich auf Ebene der Selenaufnahme, der UGA-Rekodierungseffizienz, der Transkript- und Aktivitätsebene von Selenoproteinen, während Kupfer nur geringe bis keine Einflüsse auf Ebene der Proteinexpression von Selenoproteinen hatte (**Kapitel 4.2; Abbildung 12**).

Die Selenaufnahme war in Kupfer-supplementierten Hepatozyten nahezu verdoppelt (**Kapitel 4.2, Abb. 4C**). Auch in früheren Tierstudien konnte eine hepatische intrazelluläre Selenakkumulation nach Kupferfütterung gezeigt werden [486]. Eine Modulation des nutritiven Kupfers von defizient zu adäquat in der Mausfütterungsstudie hatte jedoch keine Auswirkungen auf den intrazellulären Selengehalt (**Kapitel 4.2, Abb. 6A, C**), was darauf hinweist, dass eine Kupfersupplementation die Selenaufnahme beeinflusst (**Abbildung 12-1**). Das intrazelluläre Selen steht im Anschluss für die Inkorporation in Selenoproteine zur Verfügung. Die Genexpression von verschiedenen Proteinen des Selenoproteinsyntheseapparates war wenig bis gar nicht durch Kupfer beeinflusst (**Kapitel 4.2, Abb. 4A, B; S4A, B**). Auch die beiden Regulatoren der Selenoproteinsynthese Nucleolin und EIF4a3 (**Abbildung 3**), die die Selenoproteinsynthese positiv bzw. negativ beeinflussen [82], waren nicht durch eine Behandlung mit 100 µM CuSO₄ beeinflusst (*Microarray data provided by GEO Profiles (GEO Series Accession No. GSE9539)*; [449]).

Die UGA-Rekodierung, die mittels des SECIS-Elements für GPX4 (**Kapitel 4.2, Abb. 4D**) und der SECIS-Elemente von SELENOP [Schwarz, in Vorbereitung] untersucht wurde, war hingegen deutlich durch Kupfer vermindert (**Abbildung 12-2**). Weitere Substanzen, die die UGA-Rekodierung beeinflussen, umfassen die Gruppe von Aminoglykosiden wie z. B. Geneticin (G418). Im Gegensatz zu Kupfer steigern diese die UGA-Rekodierung [492-494]. Es wurde jedoch festgestellt, dass durch die Antibiotika-Behandlung anstelle von Sec andere Aminosäuren wie Arginin, Cys oder Tryptophan, in die Selenoproteine TXNRD1, GPX1, GPX4 und SELENOP eingebaut wurden [493-495]. Der Einbau von Cys anstelle von Sec wurde auch unter Selendefizienz für die TXNRD1 [128, 131] und SELENOP [129] gezeigt. Diese Inkorporation von anderen Aminosäuren führte zwar zu scheinbar vergleichbaren Selenoproteinspiegeln, diese wiesen jedoch eine deutlich verminderte Enzymaktivität auf [131, 494, 495]. Obwohl die UGA-Rekodierung vom GPX4-SECIS-Element (**Kapitel 4.2, Abb. 4D**) und die Gesamt-GPX-Aktivität (**Kapitel 4.2, Abb. 3A; 5E; S3A, C; Abbildung 12-4**) bei gleichzeitiger Selengabe durch Kupfer

inhibiert wurde, war die Proteinexpression von GPX1 und GPX4 bei gleicher Behandlung unbeeinflusst (**Kapitel 4.2, Abb. 2A, C**). Eine Reduktion der GPX-Aktivität durch Kupfer wurde auch bei Ratten mit einer subkutanen Kupferinjektion oder mit hepatischer Kupferakkumulation aufgrund eines ATP7B-KOs beobachtet [490, 491]. Auch bei Wilson-Patienten wurde in der schwersten Erkrankungsstufe eine Inhibition der GPX-Aktivität gemessen [496]. Jedoch ist zu beachten, dass die hepatischen Kupferkonzentrationen dieser *in vivo*-Studien bereits pathophysiologische Auswirkungen wie Leberschädigungen verursachten [491, 496]. Die hier gezeigten Daten beziehen sich jedoch auf physiologische Konzentrationsbereiche von Kupfer, die keine deutliche Zellschädigung verursachten (**Kapitel 4.2, Abb. S1A, B**) und dennoch zu einer verminderten GPX-Aktivität, zumindest *in vitro*, führten (**Kapitel 4.2, Abb. 3A; 5E; S3A, C**).

Auch die TXNRD-Aktivität wurde *in vitro* durch Kupfer stark reduziert (**Kapitel 4.2, Abb. 3C; 5F; S3B, D; Abbildung 12-4**), während die Proteinexpression von TXNRD1 und TXNRD2 unverändert war (**Kapitel 4.2, Abb. 2E, F; S5E, F**). Die Unterschiede zwischen Aktivitäts- und Proteinexpressionsspiegeln von GPXen und TXNRDn könnten auf eine Kupfer-getriebene Fehlinsertion einer anderen Aminosäure hinweisen (**Abbildung 12-3**), wie es auch in anderen Studien nach Inkubation mit Aminoglykosiden oder bei Selendefizienz gezeigt wurde [128, 129, 131, 493-495]. Dies wurde jedoch nicht weiter untersucht. Die *in vitro*-gezeigte Inhibition der TXNRD-Aktivität, nicht jedoch die der GPX-Aktivität, scheint auch *in vivo* bei nur marginalen Veränderungen des Kupferstatus eine Rolle zu spielen (**Kapitel 4.2, Abb. 7B**). Vergleichbare Ergebnisse zur Beeinflussung der TXNRD-Aktivität durch Kupfer sind bisher nicht publiziert. Die Bedeutung der hier gezeigten Effekte von Kupfer auf die Selenhomöostase spiegelt sich darin wider, dass alle durch Kupfer-induzierten Effekte durch eine Chelatorbehandlung rückgängig gemacht werden konnten. Vor allem die Enzymaktivitäten von GPX und TXNRD korrelieren stark mit dem intrazellulären Kupfergehalt (**Kapitel 4.2, Abb. 8A, B**).

Weiterhin haben verschiedene Transkriptionsfaktoren einen Einfluss auf die Regulation der Selenoproteine. Hierbei spielen u. a. (i) Nrf2, (ii) MTF1, (iii) p53 und (iv) Sp1 eine Rolle für die Regulation von (i) GPX2, (i, iv) TXNRD1, (ii) SELENOH und SELENOW sowie (iii) GPX1 (Überblick in [497]), den Selenoproteinen mit den stärksten Effekten nach einer Kupferbehandlung. Der Zusammenhang zwischen Selen bzw. Kupfer und Nrf2 wurde bereits diskutiert (**Kapitel 5.2.3**). Für MTF1 wurde beschrieben, dass es für die Transkription von SELENOH (human und murin), TXNRD2 (murin) [498] und SELENOW (murin) [316, 499] mitverantwortlich ist. Eine Wirkung von Kupfer auf MTF1 zeigte sich durch eine gesteigerte Genexpression des MTF1-Zielgens MT2A in HepG2-Zellen nach 72-stündiger Kupferinkubation. (**Kapitel 4.2, Abb. 1B**), wie es auch in der

Literatur bereits beschrieben wurde [449]. Die Proteinexpression von MT beeinflusste Kupfer jedoch nicht (**Kapitel 4.2, Abb. S2A, C**). Bei einer vierstündigen Behandlung von HepG2- und HT29-Zellen mit Kupfer konnte jedoch keine nukleäre Translokation von MTF1 detektiert werden (**Anhang Abb. 15A, C**). Es könnte demnach vermutet werden, dass für die Aktivierung und Translokation von MTF1 durch Kupfer eine längere Behandlungsdauer nötig ist.

Für SELENOH und TXNRD2 wurde in der Literatur eine inverse Regulation durch MTF1 beschrieben, während SELENOH durch Behandlung mit Zink oder Cadmium, den hauptsächlichen MTF1-Aktivatoren, vermehrt exprimiert war [316, 498]. Die SELENOH-Proteinexpression, nicht jedoch die mRNA-Expression, war durch eine Kupferbehandlung reduziert. In Versuchen mit dem stärkeren MTF1-Aktiviator Zink im Vergleich zu Kupfer wurde die SELENOH-Proteinexpression noch deutlicher vermindert (Daten nicht gezeigt). Diese Daten unterstützen die in der Literatur beschriebenen Effekt einer negativen Regulation von SELENOH durch MTF1 [498] (**Abbildung 12-6**). Ob die Steigerung der intestinalen SELENOH-Expression im Rahmen der Mausfütterungsstudie (**Kapitel 4.2, Abb. 7L**) mit einer reduzierten MTF1-Aktivierung im Zusammenhang steht, ist unklar. Die MT-Expression als Beispiel für ein MTF1-Zielgen war hingegen bei adäquater Kupferfütterung unverändert (**Kapitel 4.2, Abb. 6H**).

Ein dritter Transkriptionsfaktor, der eine Rolle bei der Regulation der Selenoproteine, vor allem der GPX1 spielt, ist p53 [500-503]. p53 wird als Antwort auf verschiedene intrazelluläre Stresssituationen (u. a. Hypoxie, DNA-Schäden) aktiviert, was die Induktion von Zielgenen, die an Prozessen wie der DNA-Reparatur, Zellzyklus-Progression und Zelltod beteiligt sind, zur Folge hat (Überblick in [504]). Eine durch p53-induzierte GPX-Aktivierung kann dazu führen, dass intrazelluläres H₂O₂ abgebaut wird und somit Zellen vor weiteren oxidativen Schädigungen geschützt werden [505]. Für Kupfer konnte gezeigt werden, dass es zu einer Expressionssteigerung von p53 führte [506-508]. Erst eine Kupferbehandlung mit 200 µM reduzierte die transkriptionale Aktivität von p53 [506]. Es wurde weiterhin gezeigt, dass eine Kupferbehandlung die mRNA-Expression von GPX1 reduzierte [506, 507], was jedoch als ein p53-unabhängiger Mechanismus identifiziert wurde [507]. Ob die hier gefundenen Effekte von Kupfer auf die GPX-Aktivität (**Kapitel 4.2, Abb. 3A; 5E; S3A, C; Abbildung 12-4**) durch p53 reguliert sind, bleibt unklar. Zu beachten ist aber, dass viele Krebszellen inaktivierende Mutationen im p53-Gen aufweisen, was eine Regulation bzw. die genaue Klärung der zugrundeliegenden Mechanismen erschwert (Überblick in [509]).

Im Promotor von TXNRD1 wurden Bindestellen für drei weitere Transkriptionsfaktoren (Oct-1, Sp1, Sp3) gefunden [510]. Sp1, ein Zink-Finger-Protein, kann ebenfalls die Induktion von Ctr1 vermitteln und ist somit für die Regulation der Kupferhomöostase wichtig [511]. Kupfer weist

eine höhere Bindeaffinität für Sp1 auf und kann so Zink aus der Bindung an Sp1 verdrängen. Die Kupferbindung führte zu keiner strukturellen Veränderung, jedoch war die Bindung des Kupfer-Sp1-Moleküls an den Ctr1-Promotor nicht mehr möglich [512]. Dies könnte eine Möglichkeit darstellen, wie TXNRD1 durch Kupfer reguliert wird (**Abbildung 12-4**), erklärt jedoch nicht die Unterschiede, die zwischen mRNA-, Proteinexpression und Enzymaktivität bestehen (**Kapitel 4.2**).

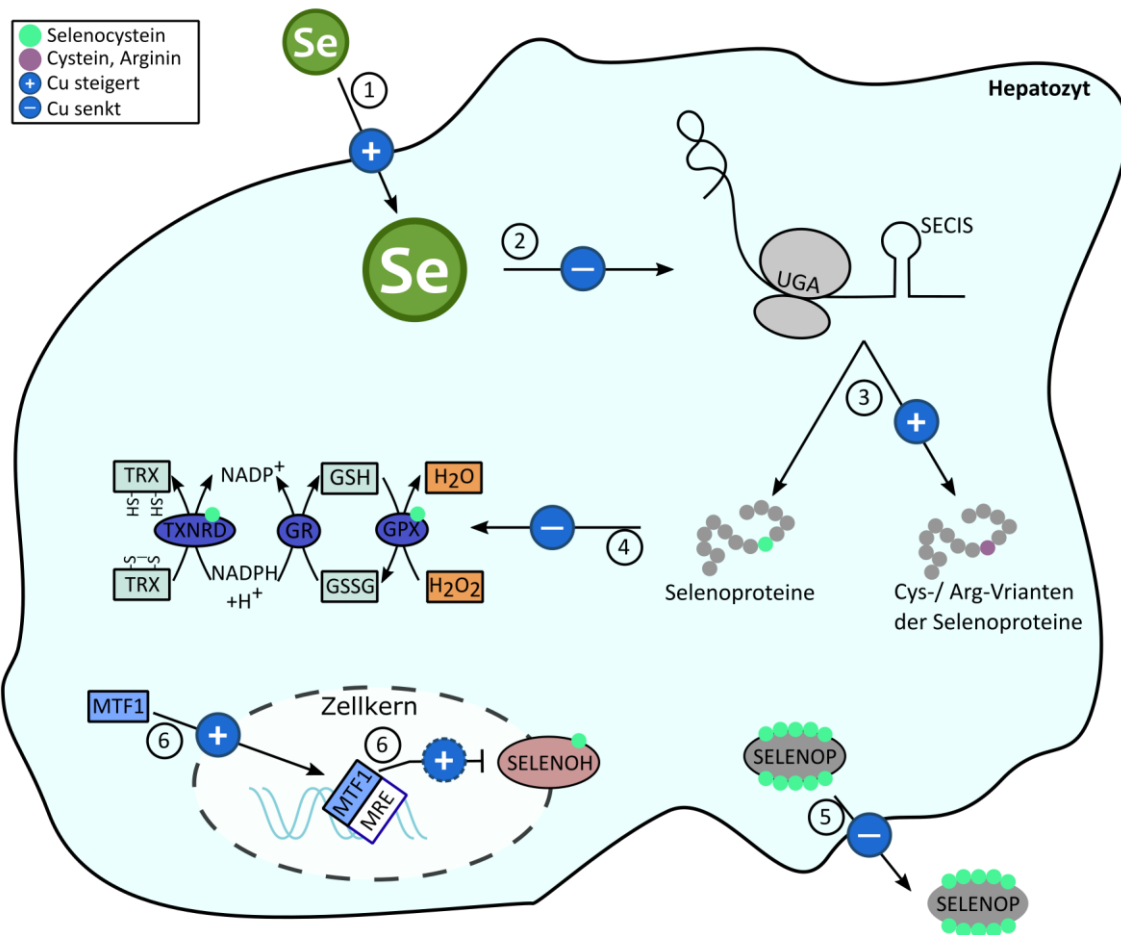


Abbildung 12. Der Einfluss von Kupfer auf die Selenhomöostase. Dargestellt sind die Stellen, an denen Kupfer mit der Selenhomöostase interagiert, in dem es verschiedene Prozesse steigert (+) oder blockiert (-). 1: Selenaufnahme, 2: UGA-Rekodierung, 3: Proteinexpression, 4: Selenoproteinaktivität, 5: SELENOP-Sekretion, 6: die *metal regulatory transcription factor 1* (MTF1)-gesteuerte negative Regulation der SELENOH-Expression. Arg – Arginin; Cu – Kupfer; Cys – Cystein; GPX – Glutathionperoxidase; GR – Glutathion Reduktase; GSH – reduziertes Glutathion; GSSG – oxidiertes Glutathion; H₂O₂ – Hydroperoxide; MRE - Metall-responsives Element; NADPH - Nicotinamadenindinukleotidphosphat; Se – Selen; TXNRD – Thioredoxinreduktase; TRX – Thioredoxin.

Zusammenfassend können die Daten zu den Interaktionen von Selen und Kupfer erste Indizien liefern, wie Kupfer die Selenhomöostase sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beeinflusst (**Abbildung 12**). Betrachtet man Hepatozyten (HIER: HepG2-Zellen) im Zusammenhang mit dem Selenstatus, ist ein weiteres relevantes Selenoprotein das SELENOP. SELENOP wird hauptsächlich von den Hepatozyten synthetisiert und sekretiert [170, 171] und dient als Transportprotein von Selen zu den peripheren Organen [172, 173], in die es über verschiedene Mechanismen aufgenommen wird [174-176, 513].

Auch die hepatische SELENOP-Sekretion wurde durch Kupfer deutlich gehemmt [Schwarz, in Vorbereitung] (**Abbildung 12-5**), während das Selen intrazellulär zu akkumulieren scheint (**Kapitel 4.2, Abb. 4C; Abbildung 12-1**). Besonders interessant ist dies, weil SELENOP hauptsächlich in der Leber synthetisiert und anschließend sekretiert wird [170, 171]. Der intrazelluläre Selengehalt war in HT29-Zellen [Schwarz, in Vorbereitung] im Gegensatz zu HepG2-Zellen nach einer Kupferinkubation jedoch deutlich vermindert. Dies würde bedeuten, dass die geringeren Enzymaktivitäten und die verminderte UGA-Rekodierung nach Kupferbehandlung *in vitro* auf eine verminderte Selenverfügbarkeit zurückzuführen sind. Eine leichte Steigerung der Expression des intrazellulären SELENOPs nach Kupferbehandlung in HepG2-Zellen könnte eine Akkumulation des intrazellulären Selens im SELENOP andeuten, die jedoch nicht allein die Verdopplung des intrazellulären Selengehaltes nach einer Kupferbehandlung erklärt (**Kapitel 4.2, Abb. 4C; Abbildung 12-1**) [Schwarz, in Vorbereitung].

5.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, den Zusammenhang zwischen den vier essentiellen Spurenelementen Selen, Kupfer, Zink und Eisen und dem redox-sensitiven Transkriptionsfaktor Nrf2 zu untersuchen. Die bisherige Betrachtung möglicher Interaktionen zwischen Selen und Kupfer im hier betrachteten physiologischen Konzentrationsbereich lieferte mit der deutlichen Reduktion der GPX- und TXNRD-Aktivität sowie der SELENOP-Sekretion vielversprechende Ansätze für weitere Analysen. Physiologische und pathophysiologische Veränderungen in der Selen- und Kupferhomöostase treten bei zahlreichen Erkrankungen wie Infektionen oder Krebs, aber auch während des Alterns auf. Hierbei sind die Spurenelemente mit gesteigerten Kupfer- und verminderten Selenkonzentrationen gegensätzlich reguliert.

Ein genetischer Defekt mit starker hepatischer Kupferakkumulation ist die Wilson-Erkrankung, die durch einen KO von ATP7B oder COMMD1 ausgelöst werden kann. Ob derartige pathophysiologische Kupferakkumulationen in der Leber die physiologisch verfügbare Menge von Selen bzw. des in der Leber produzierten SELENOPs weiter vermindern, soll in zukünftigen Untersuchungen ermittelt werden. Hierfür stehen Leber- und Plasmaproben von LEC-Ratten, die einen homozygoten ATP7B-KO aufzeigen, in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung sowie Kontrolltiere und Plasmaproben von humanen Wilson-Patienten zur Verfügung. Basierend auf der Möglichkeit, Tier- und Humanproben in unterschiedlichen Erkrankungsstadien zu untersuchen, soll überprüft werden, ob die Verfügbarkeit des Selens linear mit der Kupferkonzentration korreliert oder ob sich möglicherweise ab bestimmten Kupferkonzentrationen die Selenhomöostase nicht weiter einschränken lässt. Mit diesen Untersuchungen soll einerseits die (patho)physiologische Relevanz der hier gezeigten *in vitro* und *in vivo* Daten evaluiert werden bzw. andererseits das Verständnis der Interaktion und ihre physiologischen Konsequenzen erweitert werden.

Aus nicht veröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe geht hervor, dass Zink im Gegensatz zu Kupfer die Gesamtaktivität der TXNRDn steigern kann. Hierbei gilt es folglich zu klären, ob diese Beobachtungen eine physiologische oder mögliche pathophysiologische Relevanz im *in vivo*-System haben. Weiterhin stellt sich die Frage, ob sich die entgegengesetzt wirkenden Kupfer- und Zink-induzierten Effekte auf die Selenhomöostase aufheben, oder ob der Effekt eines einzelnen Spurenelements auf die Selenhomöostase dominanter ist. Dies könnte Indizien dafür liefern, ob Kupfer und Zink über identische Mechanismen auf die Selenhomöostase wirken und eine Grundlage für eine erweiterte Analyse von Spurenelementinteraktionen sein.

Darüber hinaus sollen die zelltypspezifischen Unterschiede der Wechselwirkung von Kupfer und Zink und die Auswirkung auf die zwei Transkriptionsfaktoren Nrf2 und MTF1 und deren Zielgene weiter mechanistisch untersucht werden. Hierbei stehen verschiedene *in vitro*-Modelle wie Nrf2-KO- oder MTF1-Überexpressionszellen zur Verfügung. Hiermit könnte die Frage beantwortet werden, ob die Interaktionen von Kupfer und Zink von der Verfügbarkeit der beiden Transkriptionsfaktoren abhängig sind bzw. welche Rolle die Transkriptionsfaktoren in der Regulation der Spurenelementhomöostase bei spezifischen Veränderungen der Spurenelementverfügbarkeit (defizient, adäquat, supplementiert), wie sie bei verschiedenen Erkrankungen oder dem Altern auftritt, spielen. In diese Untersuchungen soll auch Selen mit eingeschlossen werden, da auch die Selenhomöostase eng mit den beiden Transkriptionsfaktoren MTF1 und Nrf2 verknüpft ist.

Neben *in vitro*-Studien zu möglichen Wirkmechanismen sollen auch weitere Fütterungsstudien, bei denen gezielt einzelne Spurenelemente und die Kombinationen aus Selen, Kupfer und Zink modifiziert werden, durchgeführt werden. Auf diesem Weg sollen die möglichen physiologischen und pathophysiologischen Konsequenzen einzelner Spurenelementdefizienzen im Vergleich zu gemeinsam auftretenden Spurenelementdefizienzen, wie sie am häufigsten in der Bevölkerung auftreten, näher charakterisiert werden. Dies könnte die Beantwortung der Frage erlauben, ob eine kombinierte Spurenelementdefizienz im Vergleich zu einer singulären Spurenelementdefizienz stärkere Auswirkungen auf die Spurenelement- und systemische Homöostase hat und ob sich bei Verschiebungen schwerwiegende Folgen ergeben.

Die mechanistischen Untersuchungen der Interaktionen von Selen, Kupfer und Zink sollen anschließend in human-relevanten Situationen untersucht werden. Studien der letzten Jahrzehnte deuten darauf hin, dass es zu einer Veränderung der Spurenelementhomöostase während Krebserkrankungen kommt. Ob diese Veränderungen jedoch durch eine Krebserkrankung bedingt sind, oder eine Voraussetzung für die Entstehung darstellen, ist unklar. Mechanistische Untersuchungen zur Beteiligung von Spurenelementen an Tumorentstehung und -progression könnten hierfür hilfreiche Erkenntnisse liefern und mögliche frühzeitige therapeutische Angriffspunkte identifizieren. Auch die Untersuchung der Spurenelementkonzentration in Serum oder Tumorgewebe von Krebspatienten im Vergleich zu Kontrollpersonen oder umliegendem tumorfreiem Gewebe könnte Indizien liefern, wie sich verschiedene Krebserkrankungen auf die lokale bzw. systemische Spurenelementhomöostase auswirken und damit Therapieansätze bei einer bereits vorliegenden Krebserkrankung darstellen.

Literaturverzeichnis

1. Frieden E, The chemical elements of life. *Sci Am*, 1972. 227(1): p. 52-60.
2. Taylor A, Detection and monitoring of disorders of essential trace elements. *Ann Clin Biochem*, 1996. 33 (Pt 6): p. 486-510.
3. Ritchie H and Roser M. Micronutrient Deficiency. *Our World in Data*, 2017, 26.04.2021; Available from: <https://ourworldindata.org/micronutrient-deficiency>.
4. Zimmermann MB and Hurrell RF, Nutritional iron deficiency. *Lancet*, 2007. 370(9586): p. 511-20.
5. WHO, The global prevalence of anaemia in 2011. Geneva: World Health Organization, 2015.
6. Sandstead HH, Zinc deficiency. A public health problem? *Am J Dis Child*, 1991. 145(8): p. 853-9.
7. Wessells KR and Brown KH, Estimating the global prevalence of zinc deficiency: results based on zinc availability in national food supplies and the prevalence of stunting. *PLoS One*, 2012. 7(11): p. e50568.
8. Ramakrishnan U, Prevalence of micronutrient malnutrition worldwide. *Nutrition reviews*, 2002. 60(suppl_5): p. S46-S52.
9. Combs GF, Jr., Selenium in global food systems. *Br J Nutr*, 2001. 85(5): p. 517-47.
10. Peters KM, Galinn SE, and Tsuji PA, Selenium: Dietary sources, human nutritional requirements and intake across populations, in *Selenium*. 2016, Springer. p. 295-305.
11. Institute of Medicine, Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. 2001, Washington, DC: The National Academies Press. 800.
12. EFSA Panel on Dietetic Products N and Allergies, Scientific Opinion on Dietary Reference Values for copper. *EFSA Journal*, 2015. 13(10): p. 4253.
13. Kodama H, Fujisawa C, and Bhadhrasit W, Inherited copper transport disorders: biochemical mechanisms, diagnosis, and treatment. *Curr Drug Metab*, 2012. 13(3): p. 237-50.
14. Hurst R, Siyame EW, Young SD, Chilimba AD, Joy EJ, Black CR, Ander EL, Watts MJ, Chilima B, Gondwe J, Kang'ombe D, Stein AJ, Fairweather-Tait SJ, Gibson RS, Kalimbara AA, and Broadley MR, Soil-type influences human selenium status and underlies widespread selenium deficiency risks in Malawi. *Sci Rep*, 2013. 3: p. 1425.
15. Levander OA and Beck MA, Interacting nutritional and infectious etiologies of Keshan disease. Insights from coxsackie virus B-induced myocarditis in mice deficient in selenium or vitamin E. *Biol Trace Elem Res*, 1997. 56(1): p. 5-21.
16. Chen X, Yang G, Chen J, Chen X, Wen Z, and Ge K, Studies on the relations of selenium and Keshan disease. *Biol Trace Elem Res*, 1980. 2(2): p. 91-107.
17. Yao Y, Pei F, and Kang P, Selenium, iodine, and the relation with Kashin-Beck disease. *Nutrition*, 2011. 27(11-12): p. 1095-100.
18. Goldhaber SB, Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2003. 38(2): p. 232-42.
19. Kim BE, Smith K, and Petris MJ, A copper treatable Menkes disease mutation associated with defective trafficking of a functional Menkes copper ATPase. *J Med Genet*, 2003. 40(4): p. 290-5.
20. Menkes JH, Alter M, Steigleder GK, Weakley DR, and Sung JH, A sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar hair, and focal cerebral and cerebellar degeneration. *Pediatrics*, 1962. 29: p. 764-79.
21. Czlonkowska A, Litwin T, Dusek P, Ferenci P, Lutsenko S, Medici V, Rybakowski JK, Weiss KH, and Schilsky ML, Wilson disease. *Nat Rev Dis Primers*, 2018. 4(1): p. 21.
22. Tümer Z and Møller LB, Menkes disease. *Eur J Hum Genet*, 2010. 18(5): p. 511-8.
23. Ala A, Walker AP, Ashkan K, Dooley JS, and Schilsky ML, Wilson's disease. *Lancet*, 2007. 369(9559): p. 397-408.

24. Plum LM, Rink L, and Haase H, The essential toxin: impact of zinc on human health. *Int J Environ Res Public Health*, 2010. 7(4): p. 1342-65.
25. Haase H and Rink L, Zinc signals and immune function. *Biofactors*, 2014. 40(1): p. 27-40.
26. Fosmire GJ, Zinc toxicity. *Am J Clin Nutr*, 1990. 51(2): p. 225-7.
27. Lönnerdal B, Dietary factors influencing zinc absorption. *J Nutr*, 2000. 130(5S Suppl): p. 1378S-83S.
28. Wang K, Zhou B, Kuo YM, Zemansky J, and Gitschier J, A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. *Am J Hum Genet*, 2002. 71(1): p. 66-73.
29. Prasad AS, Clinical manifestations of zinc deficiency. *Annu Rev Nutr*, 1985. 5: p. 341-63.
30. De Domenico I, McVey Ward D, and Kaplan J, Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. 9(1): p. 72-81.
31. Baudry J, Kopp JF, Boeing H, Kipp AP, Schwerdtle T, and Schulze MB, Changes of trace element status during aging: results of the EPIC-Potsdam cohort study. *Eur J Nutr*, 2020. 59(7): p. 3045-58.
32. Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Nesi B, Pratelli L, Savarino L, Cucinotta D, and Cavalli G, Blood micronutrient and thyroid hormone concentrations in the oldest-old. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. 85(6): p. 2260-5.
33. Sfar S, Jawed A, Braham H, Amor S, Laporte F, and Kerkeni A, Zinc, copper and antioxidant enzyme activities in healthy elderly Tunisian subjects. *Exp Gerontol*, 2009. 44(12): p. 812-7.
34. Fischer PW, L'Abbé MR, and Giroux A, Effects of age, smoking, drinking, exercise and estrogen use on indices of copper status in healthy adults¹. *Nutrition Research*, 1990. 10(10): p. 1081-90.
35. Lossow K, Kopp JF, Schwarz M, Finke H, Winkelbeiner N, Renko K, Meci X, Ott C, Alker W, Hackler J, Grune T, Schomburg L, Haase H, Schwerdtle T, and Kipp AP, Aging affects sex- and organ-specific trace element profiles in mice. *Aging (Albany NY)*, 2020. 12(13): p. 13762-90.
36. Woodward WD, Filteau SM, and Allen OB, Decline in serum zinc level throughout adult life in the laboratory mouse. *J Gerontol*, 1984. 39(5): p. 521-4.
37. Wong CP, Magnusson KR, and Ho E, Increased inflammatory response in aged mice is associated with age-related zinc deficiency and zinc transporter dysregulation. *J Nutr Biochem*, 2013. 24(1): p. 353-9.
38. Hoeger J, Simon TP, Beeker T, Marx G, Haase H, and Schuerholz T, Persistent low serum zinc is associated with recurrent sepsis in critically ill patients - A pilot study. *PLoS One*, 2017. 12(5): p. e0176069.
39. Mertens K, Lowes DA, Webster NR, Talib J, Hall L, Davies MJ, Beattie JH, and Galley HF, Low zinc and selenium concentrations in sepsis are associated with oxidative damage and inflammation. *Br J Anaesth*, 2015. 114(6): p. 990-9.
40. Srinivas U, Braconier JH, Jeppsson B, Abdulla M, Akesson B, and Ockerman PA, Trace element alterations in infectious diseases. *Scand J Clin Lab Invest*, 1988. 48(6): p. 495-500.
41. Renko K, Hofmann PJ, Stoedter M, Hollenbach B, Behrends T, Kohrle J, Schweizer U, and Schomburg L, Down-regulation of the hepatic selenoprotein biosynthesis machinery impairs selenium metabolism during the acute phase response in mice. *FASEB J*, 2009. 23(6): p. 1758-65.
42. Sun Q, Hackler J, Hilger J, Gluschke H, Muric A, Simmons S, Schomburg L, and Siegert E, Selenium and Copper as Biomarkers for Pulmonary Arterial Hypertension in Systemic Sclerosis. *Nutrients*, 2020. 12(6).
43. Ozturk P, Belge Kurutas E, and Ataseven A, Copper/zinc and copper/selenium ratios, and oxidative stress as biochemical markers in recurrent aphthous stomatitis. *J Trace Elem Med Biol*, 2013. 27(4): p. 312-6.
44. Lossow K, Schwarz M, and Kipp AP, Are trace element concentrations suitable biomarkers for the diagnosis of cancer? *Redox Biol*, 2021: p. 101900.
45. Schwarz K and Foltz CM, Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Journal of the American Chemical Society*, 1957. 79(12): p. 3292-3.

46. Flohé L, Günzler WA, and Schock HH, Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett*, 1973. 32(1): p. 132-4.
47. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, and Hoekstra WG, Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 1973. 179(4073): p. 588-90.
48. Cone JE, Del Rio RM, Davis JN, and Stadtman TC, Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: identification of selenocysteine as the organoselenium moiety. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976. 73(8): p. 2659-63.
49. Forstrom JW, Zakowski JJ, and Tappel AL, Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry*, 1978. 17(13): p. 2639-44.
50. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigó R, and Gladyshev VN, Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, 2003. 300(5624): p. 1439-43.
51. Schrauzer GN, Nutritional selenium supplements: product types, quality, and safety. *J Am Coll Nutr*, 2001. 20(1): p. 1-4.
52. Papp LV, Lu J, Holmgren A, and Khanna KK, From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal*, 2007. 9(7): p. 775-806.
53. Rayman MP, Infante HG, and Sargent M, Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. *Br J Nutr*, 2008. 100(2): p. 238-53.
54. Wastney ME, Combs GF, Jr., Canfield WK, Taylor PR, Patterson KY, Hill AD, Moler JE, and Patterson BH, A human model of selenium that integrates metabolism from selenite and selenomethionine. *J Nutr*, 2011. 141(4): p. 708-17.
55. Ardüser F, Wolfram S, Scharrer E, and Schneider B, Transport of selenate and selenite across the brush border membrane of rat and sheep small intestine. *Biological Trace Element Research*, 1986. 9(4): p. 281-90.
56. Ardüser F, Wolfram S, and Scharrer E, Active absorption of selenate by rat ileum. *J Nutr*, 1985. 115(9): p. 1203-8.
57. Wolfram S, Ardüser F, and Scharrer E, *In vivo* intestinal absorption of selenate and selenite by rats. *J Nutr*, 1985. 115(4): p. 454-9.
58. Wolfram S, Berger B, Grenacher B, and Scharrer E, Transport of selenoamino acids and their sulfur analogues across the intestinal brush border membrane of pigs. *J Nutr*, 1989. 119(5): p. 706-12.
59. McConnell KP and Cho GJ, Active transport of L-selenomethionine in the intestine. *Am J Physiol*, 1967. 213(1): p. 150-6.
60. Burk RF and Hill KE, Regulation of Selenium Metabolism and Transport. *Annu Rev Nutr*, 2015. 35: p. 109-34.
61. Duffield AJ, Thomson CD, Hill KE, and Williams S, An estimation of selenium requirements for New Zealanders. *The American journal of clinical nutrition*, 1999. 70(5): p. 896-903.
62. Hurst R, Armah CN, Dainty JR, Hart DJ, Teucher B, Goldson AJ, Broadley MR, Motley AK, and Fairweather-Tait SJ, Establishing optimal selenium status: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr*, 2010. 91(4): p. 923-31.
63. Xia Y, Hill KE, Byrne DW, Xu J, and Burk RF, Effectiveness of selenium supplements in a low-selenium area of China. *Am J Clin Nutr*, 2005. 81(4): p. 829-34.
64. Xia Y, Hill KE, Li P, Xu J, Zhou D, Motley AK, Wang L, Byrne DW, and Burk RF, Optimization of selenoprotein P and other plasma selenium biomarkers for the assessment of the selenium nutritional requirement: a placebo-controlled, double-blind study of selenomethionine supplementation in selenium-deficient Chinese subjects. *Am J Clin Nutr*, 2010. 92(3): p. 525-31.
65. Burk RF, Norsworthy BK, Hill KE, Motley AK, and Byrne DW, Effects of chemical form of selenium on plasma biomarkers in a high-dose human supplementation trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006. 15(4): p. 804-10.
66. Ravn-Haren G, Bugel S, Krath BN, Hoac T, Stagsted J, Jorgensen K, Bresson JR, Larsen EH, and Dragsted LO, A short-term intervention trial with selenate, selenium-enriched yeast and

- selenium-enriched milk: effects on oxidative defence regulation. *Br J Nutr*, 2008. 99(4): p. 883-92.
67. Burk RF, Hill KE, and Motley AK, Plasma selenium in specific and non-specific forms. *Biofactors*, 2001. 14(1-4): p. 107-14.
 68. Chambers I, Frampton J, Goldfarb P, Affara N, McBain W, and Harrison PR, The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *EMBO J*, 1986. 5(6): p. 1221-7.
 69. Zinoni F, Birkmann A, Stadtman TC, and Bock A, Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. 83(13): p. 4650-4.
 70. Hatfield D, Lee BJ, Hampton L, and Diamond AM, Selenium induces changes in the selenocysteine tRNA^{[Ser]Sec} population in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 1991. 19(4): p. 939-43.
 71. Lee BJ, Worland PJ, Davis JN, Stadtman TC, and Hatfield DL, Identification of a selenocysteyl-tRNA^{Ser} in mammalian cells that recognizes the nonsense codon, UGA. *Journal of Biological Chemistry*, 1989. 264(17): p. 9724-7.
 72. Bosl MR, Takaku K, Oshima M, Nishimura S, and Taketo MM, Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (*Trsp*). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(11): p. 5531-4.
 73. Leinfelder W, Zehelein E, Mandrand-Berthelot MA, and Bock A, Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine. *Nature*, 1988. 331(6158): p. 723-5.
 74. Carlson BA, Xu XM, Kryukov GV, Rao M, Berry MJ, Gladyshev VN, and Hatfield DL, Identification and characterization of phosphoseryl-tRNA^{[Ser]Sec} kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(35): p. 12848-53.
 75. Guimarães MJ, Peterson D, Vicari A, Cocks BG, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Ferrick DA, Kastelein RA, and Bazan JF, Identification of a novel selD homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996. 93(26): p. 15086-91.
 76. Kim IY, Guimarães MJ, Zlotnik A, Bazan JF, and Stadtman TC, Fetal mouse selenophosphate synthetase 2 (SPS2): Characterization of the cysteine mutant form overproduced in a baculovirus-insect cell system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997. 94(2): p. 418-21.
 77. Glass RS, Singh WP, Jung W, Veres Z, Scholz TD, and Stadtman TC, Monoselenophosphate: synthesis, characterization, and identity with the prokaryotic biological selenium donor, compound SePX. *Biochemistry*, 1993. 32(47): p. 12555-9.
 78. Veres Z, Kim IY, Scholz TD, and Stadtman TC, Selenophosphate synthetase. Enzyme properties and catalytic reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 1994. 269(14): p. 10597-603.
 79. Yuan J, Palioura S, Salazar JC, Su D, O'Donoghue P, Hohn MJ, Cardoso AM, Whitman WB, and Soll D, RNA-dependent conversion of phosphoserine forms selenocysteine in eukaryotes and archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(50): p. 18923-7.
 80. Xu XM, Carlson BA, Mix H, Zhang Y, Saira K, Glass RS, Berry MJ, Gladyshev VN, and Hatfield DL, Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes. *PLoS Biol*, 2007. 5(1): p. e4.
 81. Labunskyy VM, Hatfield DL, and Gladyshev VN, Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiol Rev*, 2014. 94(3): p. 739-77.
 82. Vindry C, Ohlmann T, and Chavatte L, Translation regulation of mammalian selenoproteins. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2018. 1862(11): p. 2480-92.
 83. Berry MJ, Banu L, Chen YY, Mandel SJ, Kieffer JD, Harney JW, and Larsen PR, Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature*, 1991. 353(6341): p. 273-6.

84. Korotkov KV, Novoselov SV, Hatfield DL, and Gladyshev VN, Mammalian selenoprotein in which selenocysteine (Sec) incorporation is supported by a new form of Sec insertion sequence element. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(5): p. 1402-11.
85. Copeland PR, Fletcher JE, Carlson BA, Hatfield DL, and Driscoll DM, A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. *EMBO J*, 2000. 19(2): p. 306-14.
86. Copeland PR, Stepanik VA, and Driscoll DM, Insight into mammalian selenocysteine insertion: domain structure and ribosome binding properties of Sec insertion sequence binding protein 2. *Mol Cell Biol*, 2001. 21(5): p. 1491-8.
87. Fagegaltier D, Hubert N, Yamada K, Mizutani T, Carbon P, and Krol A, Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. *EMBO J*, 2000. 19(17): p. 4796-805.
88. Tujebajeva RM, Copeland PR, Xu XM, Carlson BA, Harney JW, Driscoll DM, Hatfield DL, and Berry MJ, Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion. *EMBO Rep*, 2000. 1(2): p. 158-63.
89. Chavatte L, Brown BA, and Driscoll DM, Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes. *Nat Struct Mol Biol*, 2005. 12(5): p. 408-16.
90. Ding F and Grabowski PJ, Identification of a protein component of a mammalian tRNA(Sec) complex implicated in the decoding of UGA as selenocysteine. *RNA*, 1999. 5(12): p. 1561-9.
91. Xu X-M, Mix H, Carlson BA, Grabowski PJ, Gladyshev VN, Berry MJ, and Hatfield DL, Evidence for direct roles of two additional factors, SECp43 and soluble liver antigen, in the selenoprotein synthesis machinery. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. 280(50): p. 41568-75.
92. Shen Q, Fan L, and Newburger PE, Nuclease sensitive element binding protein 1 associates with the selenocysteine insertion sequence and functions in mammalian selenoprotein translation. *J Cell Physiol*, 2006. 207(3): p. 775-83.
93. Cockman EM, Narayan V, Willard B, Shetty SP, Copeland PR, and Driscoll DM, Identification of the Selenoprotein S Positive UGA Recoding (SPUR) element and its position-dependent activity. *RNA Biol*, 2019. 16(12): p. 1682-96.
94. Howard MT, Aggarwal G, Anderson CB, Khatri S, Flanigan KM, and Atkins JF, Recoding elements located adjacent to a subset of eukaryal selenocysteine-specifying UGA codons. *EMBO J*, 2005. 24(8): p. 1596-607.
95. Howard MT, Moyle MW, Aggarwal G, Carlson BA, and Anderson CB, A recoding element that stimulates decoding of UGA codons by Sec tRNA[Ser]Sec. *RNA*, 2007. 13(6): p. 912-20.
96. Mariotti M, Shetty S, Baird L, Wu S, Loughran G, Copeland PR, Atkins JF, and Howard MT, Multiple RNA structures affect translation initiation and UGA redefinition efficiency during synthesis of selenoprotein P. *Nucleic Acids Res*, 2017. 45(22): p. 13004-15.
97. Schoenmakers E, Carlson B, Agostini M, Moran C, Rajanayagam O, Bochukova E, Tobe R, Peat R, Gevers E, Muntoni F, Guicheney P, Schoenmakers N, Farooqi S, Lyons G, Hatfield D, and Chatterjee K, Mutation in human selenocysteine transfer RNA selectively disrupts selenoprotein synthesis. *J Clin Invest*, 2016. 126(3): p. 992-6.
98. Dumitrescu AM, Liao XH, Abdullah MS, Lado-Abel J, Majed FA, Moeller LC, Boran G, Schomburg L, Weiss RE, and Refetoff S, Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism. *Nat Genet*, 2005. 37(11): p. 1247-52.
99. Fu J, Korwutthikulrangsri M, Gönc EN, Sillers L, Liao X-H, Alikaşifoğlu A, Kandemir N, Menucci MB, Burman KD, and Weiss RE, Clinical and Molecular Analysis in 2 Families With Novel Compound Heterozygous SBP2 (SECISBP2) Mutations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2020. 105(3): p. e6-e11.
100. Schoenmakers E, Agostini M, Mitchell C, Schoenmakers N, Papp L, Rajanayagam O, Padidela R, Ceron-Gutierrez L, Doffinger R, Prevosto C, Luan J, Montano S, Lu J, Castanet M, Clemons N, Groeneveld M, Castets P, Karbaschi M, Aitken S, Dixon A, Williams J, Campi I, Blount M, Burton H, Muntoni F, O'Donovan D, Dean A, Warren A, Brierley C, Baguley D, Guicheney P, Fitzgerald R, Coles A, Gaston H, Todd P, Holmgren A, Khanna KK, Cooke M, Semple R, Halsall D, Wareham

- N, Schwabe J, Grasso L, Beck-Peccoz P, Ogunko A, Dattani M, Gurnell M, and Chatterjee K, Mutations in the selenocysteine insertion sequence-binding protein 2 gene lead to a multisystem selenoprotein deficiency disorder in humans. *J Clin Invest*, 2010. 120(12): p. 4220-35.
101. Agamy O, Ben Zeev B, Lev D, Marcus B, Fine D, Su D, Narkis G, Ofir R, Hoffmann C, Leshinsky-Silver E, Flusser H, Sivan S, Soll D, Lerman-Sagie T, and Birk OS, Mutations disrupting selenocysteine formation cause progressive cerebello-cerebral atrophy. *Am J Hum Genet*, 2010. 87(4): p. 538-44.
102. Anttonen A-K, Hilander T, Linnankivi T, Isohanni P, French RL, Liu Y, Simonović M, Söll D, Somer M, and Muth-Pawlak D, Selenoprotein biosynthesis defect causes progressive encephalopathy with elevated lactate. *Neurology*, 2015. 85(4): p. 306-15.
103. Behne D, Hilmert H, Scheid S, Gessner H, and Elger W, Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins. *Biochim Biophys Acta*, 1988. 966(1): p. 12-21.
104. Hill KE, Lyons PR, and Burk RF, Differential regulation of rat liver selenoprotein mRNAs in selenium deficiency. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. 185(1): p. 260-3.
105. Sunde RA and Raines AM, Selenium regulation of the selenoprotein and nonselenoprotein transcriptomes in rodents. *Adv Nutr*, 2011. 2(2): p. 138-50.
106. Cao L, Zhang L, Zeng H, Wu RT, Wu TL, and Cheng WH, Analyses of Selenotranscriptomes and Selenium Concentrations in Response to Dietary Selenium Deficiency and Age Reveal Common and Distinct Patterns by Tissue and Sex in Telomere-Dysfunctional Mice. *J Nutr*, 2017. 147(10): p. 1858-66.
107. Nakayama A, Hill KE, Austin LM, Motley AK, and Burk RF, All regions of mouse brain are dependent on selenoprotein P for maintenance of selenium. *J Nutr*, 2007. 137(3): p. 690-3.
108. Bermano G, Nicol F, Dyer JA, Sunde RA, Beckett GJ, Arthur JR, and Hesketh JE, Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. *Biochem J*, 1995. 311 (Pt 2): p. 425-30.
109. Baker RD, Baker SS, LaRosa K, Whitney C, and Newburger PE, Selenium regulation of glutathione peroxidase in human hepatoma cell line Hep3B. *Arch Biochem Biophys*, 1993. 304(1): p. 53-7.
110. Sunde RA, Raines AM, Barnes KM, and Evenson JK, Selenium status highly regulates selenoprotein mRNA levels for only a subset of the selenoproteins in the selenoproteome. *Biosci Rep*, 2009. 29(5): p. 329-38.
111. Howard MT, Carlson BA, Anderson CB, and Hatfield DL, Translational redefinition of UGA codons is regulated by selenium availability. *J Biol Chem*, 2013. 288(27): p. 19401-13.
112. Amberg R, Urban C, Reuner B, Scharff P, Pomerantz SC, McCloskey JA, and Gross HJ, Editing does not exist for mammalian selenocysteine tRNAs. *Nucleic Acids Res*, 1993. 21(24): p. 5583-8.
113. Kim LK, Matsufuji T, Matsufuji S, Carlson BA, Kim SS, Hatfield DL, and Lee BJ, Methylation of the ribosyl moiety at position 34 of selenocysteine tRNA[Ser]Sec is governed by both primary and tertiary structure. *RNA*, 2000. 6(9): p. 1306-15.
114. Songe-Møller L, van den Born E, Leihne V, Vagbo CB, Kristoffersen T, Krokan HE, Kirpekar F, Falnes PO, and Klungland A, Mammalian ALKBH8 possesses tRNA methyltransferase activity required for the biogenesis of multiple wobble uridine modifications implicated in translational decoding. *Mol Cell Biol*, 2010. 30(7): p. 1814-27.
115. Hatfield DL and Gladyshev VN, How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(11): p. 3565-76.
116. Diamond AM, Choi IS, Crain PF, Hashizume T, Pomerantz SC, Cruz R, Steer CJ, Hill KE, Burk RF, McCloskey JA, and Hatfield DL, Dietary selenium affects methylation of the wobble nucleoside in the anticodon of selenocysteine tRNA([Ser]Sec). *J Biol Chem*, 1993. 268(19): p. 14215-23.

117. Chittum HS, Hill KE, Carlson BA, Lee BJ, Burk RF, and Hatfield DL, Replenishment of selenium deficient rats with selenium results in redistribution of the selenocysteine tRNA population in a tissue specific manner. *Biochim Biophys Acta*, 1997. 1359(1): p. 25-34.
118. Carlson BA, Xu XM, Gladyshev VN, and Hatfield DL, Selective rescue of selenoprotein expression in mice lacking a highly specialized methyl group in selenocysteine tRNA. *J Biol Chem*, 2005. 280(7): p. 5542-8.
119. Carlson BA, Moustafa ME, Sengupta A, Schweizer U, Shrimali R, Rao M, Zhong N, Wang S, Feigenbaum L, Lee BJ, Gladyshev VN, and Hatfield DL, Selective restoration of the selenoprotein population in a mouse hepatocyte selenoproteinless background with different mutant selenocysteine tRNAs lacking Um34. *J Biol Chem*, 2007. 282(45): p. 32591-602.
120. Moriarty PM, Reddy CC, and Maquat LE, Selenium deficiency reduces the abundance of mRNA for Se-dependent glutathione peroxidase 1 by a UGA-dependent mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA. *Mol Cell Biol*, 1998. 18(5): p. 2932-9.
121. Weiss Sachdev S and Sunde RA, Selenium regulation of transcript abundance and translational efficiency of glutathione peroxidase-1 and- 4 in rat liver. *Biochemical Journal*, 2001. 357(3): p. 851-8.
122. Low SC, Grundner-Culemann E, Harney JW, and Berry MJ, SECIS-SBP2 interactions dictate selenocysteine incorporation efficiency and selenoprotein hierarchy. *EMBO J*, 2000. 19(24): p. 6882-90.
123. Squires JE, Stoytchev I, Forry EP, and Berry MJ, SBP2 binding affinity is a major determinant in differential selenoprotein mRNA translation and sensitivity to nonsense-mediated decay. *Mol Cell Biol*, 2007. 27(22): p. 7848-55.
124. Miniard AC, Middleton LM, Budiman ME, Gerber CA, and Driscoll DM, Nucleolin binds to a subset of selenoprotein mRNAs and regulates their expression. *Nucleic Acids Res*, 2010. 38(14): p. 4807-20.
125. Ginisty H, Sicard H, Roger B, and Bouvet P, Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci*, 1999. 112 (Pt 6): p. 761-72.
126. Budiman ME, Bubenik JL, Miniard AC, Middleton LM, Gerber CA, Cash A, and Driscoll DM, Eukaryotic initiation factor 4a3 is a selenium-regulated RNA-binding protein that selectively inhibits selenocysteine incorporation. *Mol Cell*, 2009. 35(4): p. 479-89.
127. Budiman ME, Bubenik JL, and Driscoll DM, Identification of a signature motif for the eIF4a3-SECIS interaction. *Nucleic Acids Res*, 2011. 39(17): p. 7730-9.
128. Xu XM, Turanov AA, Carlson BA, Yoo MH, Everley RA, Nandakumar R, Sorokina I, Gygi SP, Gladyshev VN, and Hatfield DL, Targeted insertion of cysteine by decoding UGA codons with mammalian selenocysteine machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(50): p. 21430-4.
129. Turanov AA, Everley RA, Hybsier S, Renko K, Schomburg L, Gygi SP, Hatfield DL, and Gladyshev VN, Regulation of Selenocysteine Content of Human Selenoprotein P by Dietary Selenium and Insertion of Cysteine in Place of Selenocysteine. *PLoS One*, 2015. 10(10): p. e0140353.
130. Turanov AA, Xu XM, Carlson BA, Yoo MH, Gladyshev VN, and Hatfield DL, Biosynthesis of selenocysteine, the 21st amino acid in the genetic code, and a novel pathway for cysteine biosynthesis. *Adv Nutr*, 2011. 2(2): p. 122-8.
131. Lu J, Zhong L, Lonn ME, Burk RF, Hill KE, and Holmgren A, Penultimate selenocysteine residue replaced by cysteine in thioredoxin reductase from selenium-deficient rat liver. *FASEB J*, 2009. 23(8): p. 2394-402.
132. Banning A, Deubel S, Kluth D, Zhou Z, and Brigelius-Flohé R, The GI-GPx gene is a target for Nrf2. *Molecular and cellular biology*, 2005. 25(12): p. 4914-23.
133. Sakurai A, Nishimoto M, Himeno S, Imura N, Tsujimoto M, Kunimoto M, and Hara S, Transcriptional regulation of thioredoxin reductase 1 expression by cadmium in vascular endothelial cells: role of NF-E2-related factor-2. *J Cell Physiol*, 2005. 203(3): p. 529-37.
134. Müller M, Banning A, Brigelius-Flohé R, and Kipp A, Nrf2 target genes are induced under marginal selenium-deficiency. *Genes Nutr*, 2010. 5(4): p. 297-307.

135. Burk RF, Hill KE, Nakayama A, Mostert V, Levander XA, Motley AK, Johnson DA, Johnson JA, Freeman ML, and Austin LM, Selenium deficiency activates mouse liver Nrf2-ARE but vitamin E deficiency does not. *Free Radic Biol Med*, 2008. 44(8): p. 1617-23.
136. Touat-Hamici Z, Legrain Y, Bulteau AL, and Chavatte L, Selective up-regulation of human selenoproteins in response to oxidative stress. *J Biol Chem*, 2014. 289(21): p. 14750-61.
137. Brigelius-Flohé R and Flohé L, Selenium and redox signaling. *Arch Biochem Biophys*, 2017. 617: p. 48-59.
138. Visser TJ, Does-Tobe I, Docter R, and Hennemann G, Subcellular localization of a rat liver enzyme converting thyroxine into tri-iodothyronine and possible involvement of essential thiol groups. *Biochem J*, 1976. 157(2): p. 479-82.
139. Germain DLS and Galton VA, The deiodinase family of selenoproteins. *Thyroid*, 1997. 7(4): p. 655-68.
140. Touat-Hamici Z, Bulteau AL, Bianga J, Jean-Jacques H, Szpunar J, Lobinski R, and Chavatte L, Selenium-regulated hierarchy of human selenoproteome in cancerous and immortalized cells lines. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2018. 1862(11): p. 2493-505.
141. Brigelius-Flohé R and Maiorino M, Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1830(5): p. 3289-303.
142. Mills GC, Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem*, 1957. 229(1): p. 189-97.
143. Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohé R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, and Flohé L, Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol*, 1995. 252: p. 38-53.
144. Flohé L, Structure and catalytic mechanism of glutathione peroxidase. *Glutathione centennial: molecular perspectives and clinical implications*, 1989: p. 103-14.
145. Marinho HS, Antunes F, and Pinto RE, Role of glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the reduction of lysophospholipid hydroperoxides. *Free Radic Biol Med*, 1997. 22(5): p. 871-83.
146. Thomas JP, Maiorino M, Ursini F, and Girotti AW, Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *J Biol Chem*, 1990. 265(1): p. 454-61.
147. Wingler K, Bocher M, Flohé L, Kollmus H, and Brigelius-Flohé R, mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins. *Eur J Biochem*, 1999. 259(1-2): p. 149-57.
148. Brigelius-Flohé R, Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*, 1999. 27(9-10): p. 951-65.
149. Ho Y-S, Magnenat J-L, Bronson RT, Cao J, Gargano M, Sugawara M, and Funk CD, Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. 272(26): p. 16644-51.
150. de Haan JB, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea RD, Cheung NS, Bronson RT, Silvestro MJ, Wild S, and Zheng SS, Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. 273(35): p. 22528-36.
151. Esworthy RS, Mann JR, Sam M, and Chu F-F, Low glutathione peroxidase activity in Gpx1 knockout mice protects jejunum crypts from γ -irradiation damage. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2000. 279(2): p. G426-G36.
152. Florian S, Krehl S, Loewinger M, Kipp A, Banning A, Esworthy S, Chu F-F, and Brigelius-Flohé R, Loss of GPx2 increases apoptosis, mitosis, and GPx1 expression in the intestine of mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 2010. 49(11): p. 1694-702.
153. Olson GE, Whitin JC, Hill KE, Winfrey VP, Motley AK, Austin LM, Deal J, Cohen HJ, and Burk RF, Extracellular glutathione peroxidase (Gpx3) binds specifically to basement membranes of

- mouse renal cortex tubule cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2010. 298(5): p. F1244-F53.
154. Jin RC, Mahoney CE, Anderson L, Ottaviano F, Croce K, Leopold JA, Zhang Y-Y, Tang S-S, Handy DE, and Loscalzo J, Glutathione peroxidase-3 deficiency promotes platelet-dependent thrombosis *in vivo*. *Circulation*, 2011. 123(18): p. 1963-73.
155. Imai H, Hirao F, Sakamoto T, Sekine K, Mizukura Y, Saito M, Kitamoto T, Hayasaka M, Hanaoka K, and Nakagawa Y, Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 305(2): p. 278-86.
156. Liang H, Yoo SE, Na R, Walter CA, Richardson A, and Ran Q, Short form glutathione peroxidase 4 is the essential isoform required for survival and somatic mitochondrial functions. *J Biol Chem*, 2009. 284(45): p. 30836-44.
157. Yant LJ, Ran Q, Rao L, Van Remmen H, Shibatani T, Belter JG, Motta L, Richardson A, and Prolla TA, The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic Biol Med*, 2003. 34(4): p. 496-502.
158. Schneider M, Forster H, Boersma A, Seiler A, Wehnes H, Sinowatz F, Neumüller C, Deutsch MJ, Walch A, Hrabe de Angelis M, Wurst W, Ursini F, Roveri A, Maleszewski M, Maiorino M, and Conrad M, Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *FASEB J*, 2009. 23(9): p. 3233-42.
159. Holmgren A, Thioredoxin. *Annu Rev Biochem*, 1985. 54: p. 237-71.
160. Arnér ES, Zhong L, and Holmgren A, Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol*, 1999. 300: p. 226-39.
161. Jakupoglu C, Przemeczek GK, Schneider M, Moreno SG, Mayr N, Hatzopoulos AK, de Angelis MH, Wurst W, Bornkamm GW, Brielmeier M, and Conrad M, Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(5): p. 1980-8.
162. Conrad M, Jakupoglu C, Moreno SG, Lippl S, Banjac A, Schneider M, Beck H, Hatzopoulos AK, Just U, Sinowatz F, Schmahl W, Chien KR, Wurst W, Bornkamm GW, and Brielmeier M, Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(21): p. 9414-23.
163. Du Y, Zhang H, Lu J, and Holmgren A, Glutathione and glutaredoxin act as a backup of human thioredoxin reductase 1 to reduce thioredoxin 1 preventing cell death by aurothioglucose. *J Biol Chem*, 2012. 287(45): p. 38210-9.
164. Tan SX, Greetham D, Raeth S, Grant CM, Dawes IW, and Perrone GG, The thioredoxin-thioredoxin reductase system can function *in vivo* as an alternative system to reduce oxidized glutathione in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2010. 285(9): p. 6118-26.
165. Nalvarte I, Damdimopoulos AE, Nystom C, Nordman T, Miranda-Vizuete A, Olsson JM, Eriksson L, Bjornstedt M, Arnér ES, and Spyrou G, Overexpression of enzymatically active human cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductase in HEK-293 cells. Effect on cell growth and differentiation. *J Biol Chem*, 2004. 279(52): p. 54510-7.
166. Karlenius TC and Tonissen KF, Thioredoxin and Cancer: A Role for Thioredoxin in all States of Tumor Oxygenation. *Cancers (Basel)*, 2010. 2(2): p. 209-32.
167. Cebula M, Schmidt EE, and Arnér ES, TrxR1 as a potent regulator of the Nrf2-Keap1 response system. *Antioxid Redox Signal*, 2015. 23(10): p. 823-53.
168. Burk RF and Hill KE, Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annu Rev Nutr*, 2005. 25: p. 215-35.
169. Read R, Bellew T, Yang JG, Hill KE, Palmer IS, and Burk RF, Selenium and amino acid composition of selenoprotein P, the major selenoprotein in rat serum. *J Biol Chem*, 1990. 265(29): p. 17899-905.
170. Carlson BA, Novoselov SV, Kumaraswamy E, Lee BJ, Anver MR, Gladyshev VN, and Hatfield DL, Specific excision of the selenocysteine tRNA[Ser]Sec (Trsp) gene in mouse liver demonstrates an essential role of selenoproteins in liver function. *J Biol Chem*, 2004. 279(9): p. 8011-7.

171. Burk RF and Hill KE, Selenoprotein P. A selenium-rich extracellular glycoprotein. *J Nutr*, 1994. 124(10): p. 1891-7.
172. Burk RF and Gregory PE, Some characteristics of 75Se-P, a selenoprotein found in rat liver and plasma, and comparison of it with selenogluthathione peroxidase. *Arch Biochem Biophys*, 1982. 213(1): p. 73-80.
173. Motsenbocker MA and Tappel A, A selenocysteine-containing selenium-transport protein in rat plasma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1982. 719(1): p. 147-53.
174. Olson GE, Winfrey VP, Nagdas SK, Hill KE, and Burk RF, Apolipoprotein E receptor-2 (ApoER2) mediates selenium uptake from selenoprotein P by the mouse testis. *J Biol Chem*, 2007. 282(16): p. 12290-7.
175. Burk RF, Hill KE, Olson GE, Weeber EJ, Motley AK, Winfrey VP, and Austin LM, Deletion of apolipoprotein E receptor-2 in mice lowers brain selenium and causes severe neurological dysfunction and death when a low-selenium diet is fed. *J Neurosci*, 2007. 27(23): p. 6207-11.
176. Olson GE, Winfrey VP, Hill KE, and Burk RF, Megalin mediates selenoprotein P uptake by kidney proximal tubule epithelial cells. *J Biol Chem*, 2008. 283(11): p. 6854-60.
177. Schomburg L, Schweizer U, Holtmann B, Flohé L, Sendtner M, and Kohrle J, Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem J*, 2003. 370(Pt 2): p. 397-402.
178. Hill KE, Zhou J, McMahan WJ, Motley AK, Atkins JF, Gesteland RF, and Burk RF, Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse. *J Biol Chem*, 2003. 278(16): p. 13640-6.
179. Chu FF, Doroshov JH, and Esworthy RS, Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem*, 1993. 268(4): p. 2571-6.
180. Takahashi K, Avissar N, Whittin J, and Cohen H, Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1987. 256(2): p. 677-86.
181. Ursini F, Maiorino M, and Gregolin C, The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1985. 839(1): p. 62-70.
182. Oblong JE, Gasdaska PY, Sherrill K, and Powis G, Purification of human thioredoxin reductase: properties and characterization by absorption and circular dichroism spectroscopy. *Biochemistry*, 1993. 32(28): p. 7271-7.
183. Lee S-R, Kim J-R, Kwon K-S, Yoon HW, Levine RL, Ginsburg A, and Rhee SG, Molecular cloning and characterization of a mitochondrial selenocysteine-containing thioredoxin reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. 274(8): p. 4722-34.
184. Gasdaska PY, Berggren MM, Berry MJ, and Powis G, Cloning, sequencing and functional expression of a novel human thioredoxin reductase. *FEBS letters*, 1999. 442(1): p. 105-11.
185. Sun Q-A, Wu Y, Zappacosta F, Jeang K-T, Lee BJ, Hatfield DL, and Gladyshev VN, Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. 274(35): p. 24522-30.
186. Behne D, Kyriakopoulos A, Meinhold H, and Köhrle J, Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochemical and biophysical research communications*, 1990. 173(3): p. 1143-9.
187. Davey JC, Becker KB, Schneider MJ, Germain DLS, and Galton VA, Cloning of a cDNA for the type II iodothyronine deiodinase. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. 270(45): p. 26786-9.
188. Croteau W, Whittemore SL, Schneider MJ, and Germain DLS, Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. 270(28): p. 16569-75.
189. Panee J, Stoytcheva ZR, Liu W, and Berry MJ, Selenoprotein H is a redox-sensing high mobility group family DNA-binding protein that up-regulates genes involved in glutathione synthesis and phase II detoxification. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. 282(33): p. 23759-65.

190. Novoselov SV, Kryukov GV, Xu X-M, Carlson BA, Hatfield DL, and Gladyshev VN, Selenoprotein H is a nucleolar thioredoxin-like protein with a unique expression pattern. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. 282(16): p. 11960-8.
191. Reeves MA, Bellinger FP, and Berry MJ, The neuroprotective functions of selenoprotein M and its role in cytosolic calcium regulation. *Antioxidants & redox signaling*, 2010. 12(7): p. 809-18.
192. Han S-J, Lee BC, Yim SH, Gladyshev VN, and Lee S-R, Characterization of mammalian selenoprotein o: a redox-active mitochondrial protein. *PLoS One*, 2014. 9(4): p. e95518.
193. Kryukov GV, Kryukov VM, and Gladyshev VN, New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. *J Biol Chem*, 1999. 274(48): p. 33888-97.
194. Vendeland SC, Beilstein MA, Chen C, Jensen ON, Barofsky E, and Whanger P, Purification and properties of selenoprotein W from rat muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 1993. 268(23): p. 17103-7.
195. Gladyshev VN, Jeang KT, Wootton JC, and Hatfield DL, A new human selenium-containing protein. Purification, characterization, and cDNA sequence. *J Biol Chem*, 1998. 273(15): p. 8910-5.
196. Horibata Y and Hirabayashi Y, Identification and characterization of human ethanolaminephosphotransferase1. *Journal of lipid research*, 2007. 48(3): p. 503-8.
197. Lu C, Qiu F, Zhou H, Peng Y, Hao W, Xu J, Yuan J, Wang S, Qiang B, and Xu C, Identification and characterization of selenoprotein K: an antioxidant in cardiomyocytes. *FEBS letters*, 2006. 580(22): p. 5189-97.
198. Curran JE, Jowett JB, Elliott KS, Gao Y, Gluschenko K, Wang J, Azim DMA, Cai G, Mahaney MC, and Comuzzie AG, Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response. *Nature genetics*, 2005. 37(11): p. 1234-41.
199. Lescure A, Gautheret D, Carbon P, and Krol A, Novel selenoproteins identified *in silico* and *in vivo* by using a conserved RNA structural motif. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. 274(53): p. 38147-54.
200. Herrman JL, The properties of a rat serum protein labelled by the injection of sodium selenite. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1977. 500(1): p. 61-70.
201. Kim HY and Gladyshev VN, Methionine sulfoxide reduction in mammals: characterization of methionine-R-sulfoxide reductases. *Mol Biol Cell*, 2004. 15(3): p. 1055-64.
202. Xu XM, Carlson BA, Irons R, Mix H, Zhong N, Gladyshev VN, and Hatfield DL, Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein biosynthesis. *Biochem J*, 2007. 404(1): p. 115-20.
203. Hart E, Steenbock H, Waddell J, Elvehjem C, Van Donk E, and Riising BM, Iron in nutrition: VII. Copper as a supplement to iron for hemoglobin building in the rat. *Journal of Biological Chemistry*, 1928. 77(2): p. 797-812.
204. McHargue J, Healy D, and Hill E, The Relation of Copper to the Hemoglobin Content of Rat Blood: Preliminary Report. *Journal of Biological Chemistry*, 1928. 78(3): p. 637-41.
205. Blockhuys S, Celauro E, Hildesjo C, Feizi A, Stal O, Fierro-Gonzalez JC, and Wittung-Stafshede P, Defining the human copper proteome and analysis of its expression variation in cancers. *Metallomics*, 2017. 9(2): p. 112-23.
206. Fukai T, Ushio-Fukai M, and Kaplan JH, Copper transporters and copper chaperones: roles in cardiovascular physiology and disease. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018. 315(2): p. C186-C201.
207. Halliwell B and Gutteridge J, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 1984. 219(1): p. 1.
208. Pham AN, Xing G, Miller CJ, and Waite TD, Fenton-like copper redox chemistry revisited: Hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed oxidant production. *Journal of catalysis*, 2013. 301: p. 54-64.
209. Sies H, *Biochemistry of oxidative stress*. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1986. 25(12): p. 1058-71.

210. Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, and O'Halloran TV, Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*, 1999. 284(5415): p. 805-8.
211. Doguer C, Ha JH, and Collins JF, Intersection of Iron and Copper Metabolism in the Mammalian Intestine and Liver. *Compr Physiol*, 2018. 8(4): p. 1433-61.
212. van Den Berghe PV and Klomp LW, New developments in the regulation of intestinal copper absorption. *Nutrition reviews*, 2009. 67(11): p. 658-72.
213. Zhou B and Gitschier J, hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(14): p. 7481-6.
214. Lee J, Pena MM, Nose Y, and Thiele DJ, Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *J Biol Chem*, 2002. 277(6): p. 4380-7.
215. Bertinato J, Swist E, Plouffe LJ, Brooks SP, and L'Abbe M R, Ctr2 is partially localized to the plasma membrane and stimulates copper uptake in COS-7 cells. *Biochem J*, 2008. 409(3): p. 731-40.
216. van den Berghe PV, Folmer DE, Malingre HE, van Beurden E, Klomp AE, van de Sluis B, Merckx M, Berger R, and Klomp LW, Human copper transporter 2 is localized in late endosomes and lysosomes and facilitates cellular copper uptake. *Biochem J*, 2007. 407(1): p. 49-59.
217. Kuo YM, Zhou B, Cosco D, and Gitschier J, The copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(12): p. 6836-41.
218. Lee J, Prohaska JR, and Thiele DJ, Essential role for mammalian copper transporter Ctr1 in copper homeostasis and embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(12): p. 6842-7.
219. Nose Y, Kim BE, and Thiele DJ, Ctr1 drives intestinal copper absorption and is essential for growth, iron metabolism, and neonatal cardiac function. *Cell Metab*, 2006. 4(3): p. 235-44.
220. Kim H, Son HY, Bailey SM, and Lee J, Deletion of hepatic Ctr1 reveals its function in copper acquisition and compensatory mechanisms for copper homeostasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009. 296(2): p. G356-64.
221. Arredondo M, Munoz P, Mura CV, and Nunez MT, DMT1, a physiologically relevant apical Cu¹⁺ transporter of intestinal cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003. 284(6): p. C1525-30.
222. Jiang L, Garrick MD, Garrick LM, Zhao L, and Collins JF, Divalent metal transporter 1 (Dmt1) mediates copper transport in the duodenum of iron-deficient rats and when overexpressed in iron-deprived HEK-293 cells. *J Nutr*, 2013. 143(12): p. 1927-33.
223. Illing AC, Shawki A, Cunningham CL, and Mackenzie B, Substrate profile and metal-ion selectivity of human divalent metal-ion transporter-1. *J Biol Chem*, 2012. 287(36): p. 30485-96.
224. Shawki A, Anthony SR, Nose Y, Engevik MA, Niespodzany EJ, Barrientos T, Ohrvik H, Worrell RT, Thiele DJ, and Mackenzie B, Intestinal DMT1 is critical for iron absorption in the mouse but is not required for the absorption of copper or manganese. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015. 309(8): p. G635-47.
225. Freedman JH, Ciriolo MR, and Peisach J, The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J Biol Chem*, 1989. 264(10): p. 5598-605.
226. Maryon EB, Molloy SA, and Kaplan JH, Cellular glutathione plays a key role in copper uptake mediated by human copper transporter 1. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013. 304(8): p. C768-79.
227. Ferreira ADC, Ciriolo MR, Marcocci L, and Rotilio G, Copper (I) transfer into metallothionein mediated by glutathione. *Biochemical Journal*, 1993. 292(3): p. 673-6.
228. Steinebach OM and Wolterbeek HT, Role of cytosolic copper, metallothionein and glutathione in copper toxicity in rat hepatoma tissue culture cells. *Toxicology*, 1994. 92(1-3): p. 75-90.
229. Freedman JH and Peisach J, Intracellular copper transport in cultured hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989. 164(1): p. 134-40.

230. Hanna PM and Mason RP, Direct evidence for inhibition of free radical formation from Cu(I) and hydrogen peroxide by glutathione and other potential ligands using the EPR spin-trapping technique. *Arch Biochem Biophys*, 1992. 295(1): p. 205-13.
231. Jiang J, St Croix CM, Sussman N, Zhao Q, Pitt BR, and Kagan VE, Contribution of glutathione and metallothioneins to protection against copper toxicity and redox cycling: quantitative analysis using MT+/+ and MT-/- mouse lung fibroblast cells. *Chem Res Toxicol*, 2002. 15(8): p. 1080-7.
232. Kawai K, Liu SX, Tyurin VA, Tyurina YY, Borisenko GG, Jiang JF, St Croix CM, Fabisiak JP, Pitt BR, and Kagan VE, Antioxidant and antiapoptotic function of metallothioneins in HL-60 cells challenged with copper nitrilotriacetate. *Chem Res Toxicol*, 2000. 13(12): p. 1275-86.
233. Tapiero H, Townsend DM, and Tew KD, Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomed Pharmacother*, 2003. 57(9): p. 386-98.
234. Field LS, Luk E, and Culotta VC, Copper chaperones: personal escorts for metal ions. *J Bioenerg Biomembr*, 2002. 34(5): p. 373-9.
235. Culotta VC, Klomp LW, Strain J, Casareno RL, Krems B, and Gitlin JD, The copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 1997. 272(38): p. 23469-72.
236. Glerum DM, Shtanko A, and Tzagoloff A, Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem*, 1996. 271(24): p. 14504-9.
237. Takahashi Y, Kako K, Kashiwabara S, Takehara A, Inada Y, Arai H, Nakada K, Kodama H, Hayashi J, Baba T, and Munekata E, Mammalian copper chaperone Cox17p has an essential role in activation of cytochrome C oxidase and embryonic development. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(21): p. 7614-21.
238. Lin SJ, Pufahl RA, Dancis A, O'Halloran TV, and Culotta VC, A role for the *Saccharomyces cerevisiae* ATX1 gene in copper trafficking and iron transport. *J Biol Chem*, 1997. 272(14): p. 9215-20.
239. Klomp LW, Lin SJ, Yuan DS, Klausner RD, Culotta VC, and Gitlin JD, Identification and functional expression of HAH1, a novel human gene involved in copper homeostasis. *J Biol Chem*, 1997. 272(14): p. 9221-6.
240. Prohaska JR, Broderius M, and Brokate B, Metallochaperone for Cu,Zn-superoxide dismutase (CCS) protein but not mRNA is higher in organs from copper-deficient mice and rats. *Arch Biochem Biophys*, 2003. 417(2): p. 227-34.
241. Bertinato J, Iskandar M, and L'Abbe MR, Copper deficiency induces the upregulation of the copper chaperone for Cu/Zn superoxide dismutase in weanling male rats. *J Nutr*, 2003. 133(1): p. 28-31.
242. West EC and Prohaska JR, Cu,Zn-superoxide dismutase is lower and copper chaperone CCS is higher in erythrocytes of copper-deficient rats and mice. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2004. 229(8): p. 756-64.
243. Prohaska JR, Geissler J, Brokate B, and Broderius M, Copper, zinc-superoxide dismutase protein but not mRNA is lower in copper-deficient mice and mice lacking the copper chaperone for superoxide dismutase. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2003. 228(8): p. 959-66.
244. Wong PC, Waggoner D, Subramaniam JR, Tessarollo L, Bartnikas TB, Culotta VC, Price DL, Rothstein J, and Gitlin JD, Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(6): p. 2886-91.
245. Bompiani KM, Tsai CY, Achatz FP, Liebig JK, and Howell SB, Copper transporters and chaperones CTR1, CTR2, ATOX1, and CCS as determinants of cisplatin sensitivity. *Metallomics*, 2016. 8(9): p. 951-62.
246. Hamza I, Faisst A, Prohaska J, Chen J, Gruss P, and Gitlin JD, The metallochaperone Atox1 plays a critical role in perinatal copper homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(12): p. 6848-52.

247. Vulpe C, Levinson B, Whitney S, Packman S, and Gitschier J, Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nat Genet*, 1993. 3(1): p. 7-13.
248. Mercer JF, Livingston J, Hall B, Paynter JA, Begy C, Chandrasekharappa S, Lockhart P, Grimes A, Bhavé M, Siemieniak D, and et al., Isolation of a partial candidate gene for Menkes disease by positional cloning. *Nat Genet*, 1993. 3(1): p. 20-5.
249. Chelly J, Tumer Z, Tonnesen T, Petterson A, Ishikawa-Brush Y, Tommerup N, Horn N, and Monaco AP, Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein. *Nat Genet*, 1993. 3(1): p. 14-9.
250. Petris MJ, Mercer JF, Culvenor JG, Lockhart P, Gleeson PA, and Camakaris J, Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPase efflux pump from the Golgi apparatus to the plasma membrane: a novel mechanism of regulated trafficking. *EMBO J*, 1996. 15(22): p. 6084-95.
251. Shanbhag V, Jasmer-McDonald K, Zhu S, Martin AL, Gudekar N, Khan A, Ladomersky E, Singh K, Weisman GA, and Petris MJ, ATP7A delivers copper to the lysyl oxidase family of enzymes and promotes tumorigenesis and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019. 116(14): p. 6836-41.
252. Petris MJ, Strausak D, and Mercer JF, The Menkes copper transporter is required for the activation of tyrosinase. *Hum Mol Genet*, 2000. 9(19): p. 2845-51.
253. Harris ED, Cellular copper transport and metabolism. *Annu Rev Nutr*, 2000. 20: p. 291-310.
254. Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, and Cox DW, The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet*, 1993. 5(4): p. 327-37.
255. Yamaguchi Y, Heiny ME, and Gitlin JD, Isolation and characterization of a human liver cDNA as a candidate gene for Wilson disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. 197(1): p. 271-7.
256. Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, Romano DM, Parano E, Pavone L, Brzustowicz LM, and et al., The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet*, 1993. 5(4): p. 344-50.
257. Nagano K, Nakamura K, Urakami KI, Umeyama K, Uchiyama H, Koiwai K, Hattori S, Yamamoto T, Matsuda I, and Endo F, Intracellular distribution of the Wilson's disease gene product (ATPase7B) after *in vitro* and *in vivo* exogenous expression in hepatocytes from the LEC rat, an animal model of Wilson's disease. *Hepatology*, 1998. 27(3): p. 799-807.
258. Hung IH, Suzuki M, Yamaguchi Y, Yuan DS, Klausner RD, and Gitlin JD, Biochemical characterization of the Wilson disease protein and functional expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 1997. 272(34): p. 21461-6.
259. Roelofs H, Wolters H, Van Luyn MJ, Miura N, Kuipers F, and Vonk RJ, Copper-induced apical trafficking of ATP7B in polarized hepatoma cells provides a mechanism for biliary copper excretion. *Gastroenterology*, 2000. 119(3): p. 782-93.
260. Schaefer M, Hopkins RG, Failla ML, and Gitlin JD, Hepatocyte-specific localization and copper-dependent trafficking of the Wilson's disease protein in the liver. *Am J Physiol*, 1999. 276(3): p. G639-46.
261. Miyayama T, Hiraoka D, Kawaji F, Nakamura E, Suzuki N, and Ogra Y, Roles of COMM-domain-containing 1 in stability and recruitment of the copper-transporting ATPase in a mouse hepatoma cell line. *Biochem J*, 2010. 429(1): p. 53-61.
262. Materia S, Cater MA, Klomp LW, Mercer JF, and La Fontaine S, Clusterin and COMMD1 independently regulate degradation of the mammalian copper ATPases ATP7A and ATP7B. *J Biol Chem*, 2012. 287(4): p. 2485-99.
263. Tao TY, Liu F, Klomp L, Wijmenga C, and Gitlin JD, The copper toxicosis gene product Murr1 directly interacts with the Wilson disease protein. *J Biol Chem*, 2003. 278(43): p. 41593-6.
264. de Bie P, van de Sluis B, Burstein E, van de Berghe PV, Muller P, Berger R, Gitlin JD, Wijmenga C, and Klomp LW, Distinct Wilson's disease mutations in ATP7B are associated with enhanced

- binding to COMMD1 and reduced stability of ATP7B. *Gastroenterology*, 2007. 133(4): p. 1316-26.
265. van De Sluis B, Rothuizen J, Pearson PL, van Oost BA, and Wijmenga C, Identification of a new copper metabolism gene by positional cloning in a purebred dog population. *Hum Mol Genet*, 2002. 11(2): p. 165-73.
266. Twedt DC, Sternlieb I, and Gilbertson SR, Clinical, morphologic, and chemical studies on copper toxicosis of Bedlington Terriers. *J Am Vet Med Assoc*, 1979. 175(3): p. 269-75.
267. Singleton WCJ, McInnes KT, Cater MA, Winnall WR, McKirdy R, Yu Y, Taylor PE, Ke BX, Richardson DR, Mercer JFB, and La Fontaine S, Role of glutaredoxin1 and glutathione in regulating the activity of the copper-transporting P-type ATPases, ATP7A and ATP7B. *J Biol Chem*, 2010. 285(35): p. 27111-21.
268. Hatori Y, Clasen S, Hasan NM, Barry AN, and Lutsenko S, Functional partnership of the copper export machinery and glutathione balance in human cells. *J Biol Chem*, 2012. 287(32): p. 26678-87.
269. Lim CM, Cater MA, Mercer JF, and La Fontaine S, Copper-dependent interaction of glutaredoxin with the N termini of the copper-ATPases (ATP7A and ATP7B) defective in Menkes and Wilson diseases. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 348(2): p. 428-36.
270. Linder MC and Hazegh-Azam M, Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr*, 1996. 63(5): p. 797S-811S.
271. Turnlund JR, Human whole-body copper metabolism. *Am J Clin Nutr*, 1998. 67(5 Suppl): p. 960S-4S.
272. Turnlund JR, Keyes WR, Anderson HL, and Acord LL, Copper absorption and retention in young men at three levels of dietary copper by use of the stable isotope ⁶⁵Cu. *Am J Clin Nutr*, 1989. 49(5): p. 870-8.
273. Turnlund JR, Keyes WR, Peiffer GL, and Scott KC, Copper absorption, excretion, and retention by young men consuming low dietary copper determined by using the stable isotope ⁶⁵Cu. *Am J Clin Nutr*, 1998. 67(6): p. 1219-25.
274. Turnlund JR, King JC, Gong B, Keyes WR, and Michel MC, A stable isotope study of copper absorption in young men: effect of phytate and alpha-cellulose. *Am J Clin Nutr*, 1985. 42(1): p. 18-23.
275. Sarkar B, Lingertat-Walsh K, and Clarke JT, Copper-histidine therapy for Menkes disease. *J Pediatr*, 1993. 123(5): p. 828-30.
276. Wilson SK, Progressive lenticular degeneration. *British Medical Journal*, 1912. 2(2710): p. 1645.
277. Buiakova OI, Xu J, Lutsenko S, Zeitlin S, Das K, Das S, Ross BM, Mekios C, Scheinberg IH, and Gilliam TC, Null mutation of the murine ATP7B (Wilson disease) gene results in intracellular copper accumulation and late-onset hepatic nodular transformation. *Hum Mol Genet*, 1999. 8(9): p. 1665-71.
278. Walshe JM, Penicillamine, a new oral therapy for Wilson's disease. *Am J Med*, 1956. 21(4): p. 487-95.
279. Walshe JM, Treatment of Wilson's disease with trientine (triethylene tetramine) dihydrochloride. *Lancet*, 1982. 1(8273): p. 643-7.
280. Bruha R, Marecek Z, Pospisilova L, Nevsimalova S, Vitek L, Martasek P, Nevoral J, Petrtyl J, Urbanek P, Jiraskova A, and Ferenci P, Long-term follow-up of Wilson disease: natural history, treatment, mutations analysis and phenotypic correlation. *Liver Int*, 2011. 31(1): p. 83-91.
281. Czlonkowska A, Litwin T, Karlinski M, Dziezyc K, Chabik G, and Czerska M, D-penicillamine versus zinc sulfate as first-line therapy for Wilson's disease. *Eur J Neurol*, 2014. 21(4): p. 599-606.
282. Theophilos MB, Cox DW, and Mercer JF, The toxic milk mouse is a murine model of Wilson disease. *Hum Mol Genet*, 1996. 5(10): p. 1619-24.
283. Li Y, Togashi Y, Sato S, Emoto T, Kang JH, Takeichi N, Kobayashi H, Kojima Y, Une Y, and Uchino J, Spontaneous hepatic copper accumulation in Long-Evans Cinnamon rats with hereditary hepatitis. A model of Wilson's disease. *J Clin Invest*, 1991. 87(5): p. 1858-61.

284. Wu J, Forbes JR, Chen HS, and Cox DW, The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene. *Nat Genet*, 1994. 7(4): p. 541-5.
285. Vonk WI, Bartuzi P, de Bie P, Kloosterhuis N, Wichers CG, Berger R, Haywood S, Klomp LW, Wijmenga C, and van de Sluis B, Liver-specific *Commd1* knockout mice are susceptible to hepatic copper accumulation. *PLoS One*, 2011. 6(12): p. e29183.
286. Blanus M, Varnai VM, Piasek M, and Kostial K, Chelators as antidotes of metal toxicity: therapeutic and experimental aspects. *Curr Med Chem*, 2005. 12(23): p. 2771-94.
287. Chun H, Catterton T, Kim H, Lee J, and Kim BE, Organ-specific regulation of ATP7A abundance is coordinated with systemic copper homeostasis. *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 12001.
288. Mufti AR, Burstein E, Csomos RA, Graf PC, Wilkinson JC, Dick RD, Challa M, Son JK, Bratton SB, Su GL, Brewer GJ, Jakob U, and Duckett CS, XIAP Is a copper binding protein deregulated in Wilson's disease and other copper toxicosis disorders. *Mol Cell*, 2006. 21(6): p. 775-85.
289. Bulcke F, Santofimia-Castano P, Gonzalez-Mateos A, and Dringen R, Modulation of copper accumulation and copper-induced toxicity by antioxidants and copper chelators in cultured primary brain astrocytes. *J Trace Elem Med Biol*, 2015. 32: p. 168-76.
290. Todd W, Elvehjem C, and Hart E, Zinc in the nutrition of the rat. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 1933. 107(1): p. 146-56.
291. Andreini C, Banci L, Bertini I, and Rosato A, Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res*, 2006. 5(1): p. 196-201.
292. King JC, Zinc: an essential but elusive nutrient. *Am J Clin Nutr*, 2011. 94(2): p. 679S-84S.
293. Maret W and Sandstead HH, Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *J Trace Elem Med Biol*, 2006. 20(1): p. 3-18.
294. Fukada T, Yamasaki S, Nishida K, Murakami M, and Hirano T, Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. *J Biol Inorg Chem*, 2011. 16(7): p. 1123-34.
295. Hübner C and Haase H, Interactions of zinc- and redox-signaling pathways. *Redox Biol*, 2021. 41: p. 101916.
296. Maret W, The redox biology of redox-inert zinc ions. *Free Radic Biol Med*, 2019. 134: p. 311-26.
297. Krezel A and Maret W, The biological inorganic chemistry of zinc ions. *Arch Biochem Biophys*, 2016. 611: p. 3-19.
298. Maret W, Analyzing free zinc(II) ion concentrations in cell biology with fluorescent chelating molecules. *Metallomics*, 2015. 7(2): p. 202-11.
299. Bozym RA, Chimienti F, Giblin LJ, Gross GW, Korichneva I, Li Y, Libert S, Maret W, Parviz M, Frederickson CJ, and Thompson RB, Free zinc ions outside a narrow concentration range are toxic to a variety of cells *in vitro*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2010. 235(6): p. 741-50.
300. Krezel A and Maret W, Zinc-buffering capacity of a eukaryotic cell at physiological pZn. *J Biol Inorg Chem*, 2006. 11(8): p. 1049-62.
301. Rink L and Gabriel P, Zinc and the immune system. *Proc Nutr Soc*, 2000. 59(4): p. 541-52.
302. Kimura T and Kambe T, The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters: An Overview and Perspective. *Int J Mol Sci*, 2016. 17(3): p. 336.
303. Hara T, Takeda TA, Takagishi T, Fukue K, Kambe T, and Fukada T, Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *J Physiol Sci*, 2017. 67(2): p. 283-301.
304. Lee HH, Prasad AS, Brewer GJ, and Owyang C, Zinc absorption in human small intestine. *Am J Physiol*, 1989. 256(1 Pt 1): p. G87-91.
305. Scott BJ and Bradwell AR, Identification of the serum binding proteins for iron, zinc, cadmium, nickel, and calcium. *Clin Chem*, 1983. 29(4): p. 629-33.
306. Maret W and Li Y, Coordination dynamics of zinc in proteins. *Chem Rev*, 2009. 109(10): p. 4682-707.
307. Colvin RA, Holmes WR, Fontaine CP, and Maret W, Cytosolic zinc buffering and muffling: their role in intracellular zinc homeostasis. *Metallomics*, 2010. 2(5): p. 306-17.

308. Andrews GK, Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol*, 2000. 59(1): p. 95-104.
309. Radtke F, Heuchel R, Georgiev O, Hergersberg M, Gariglio M, Dembic Z, and Schaffner W, Cloned transcription factor MTF-1 activates the mouse metallothionein I promoter. *EMBO J*, 1993. 12(4): p. 1355-62.
310. Laity JH and Andrews GK, Understanding the mechanisms of zinc-sensing by metal-response element binding transcription factor-1 (MTF-1). *Arch Biochem Biophys*, 2007. 463(2): p. 201-10.
311. Heuchel R, Radtke F, Georgiev O, Stark G, Aguet M, and Schaffner W, The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *EMBO J*, 1994. 13(12): p. 2870-5.
312. Menard MP, McCormick CC, and Cousins RJ, Regulation of intestinal metallothionein biosynthesis in rats by dietary zinc. *J Nutr*, 1981. 111(8): p. 1353-61.
313. Reeves PG, Adaptation responses in rats to long-term feeding of high-zinc diets: emphasis on intestinal metallothionein. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 1995. 6(1): p. 48-54.
314. Guo L, Lichten LA, Ryu MS, Liuzzi JP, Wang F, and Cousins RJ, STAT5-glucocorticoid receptor interaction and MTF-1 regulate the expression of ZnT2 (Slc30a2) in pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(7): p. 2818-23.
315. Langmade SJ, Ravindra R, Daniels PJ, and Andrews GK, The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J Biol Chem*, 2000. 275(44): p. 34803-9.
316. Wimmer U, Wang Y, Georgiev O, and Schaffner W, Two major branches of anti-cadmium defense in the mouse: MTF-1/metallothioneins and glutathione. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(18): p. 5715-27.
317. Lichten LA, Ryu MS, Guo L, Embury J, and Cousins RJ, MTF-1-mediated repression of the zinc transporter Zip10 is alleviated by zinc restriction. *PLoS One*, 2011. 6(6): p. e21526.
318. King JC, Shames DM, Lowe NM, Woodhouse LR, Sutherland B, Abrams SA, Turnlund JR, and Jackson MJ, Effect of acute zinc depletion on zinc homeostasis and plasma zinc kinetics in men. *Am J Clin Nutr*, 2001. 74(1): p. 116-24.
319. Ziegler EE, Serfass RE, Nelson SE, Figueroa-Colon R, Edwards BB, Houk RS, and Thompson JJ, Effect of low zinc intake on absorption and excretion of zinc by infants studied with ⁷⁰Zn as extrinsic tag. *J Nutr*, 1989. 119(11): p. 1647-53.
320. Baer MT and King JC, Tissue zinc levels and zinc excretion during experimental zinc depletion in young men. *Am J Clin Nutr*, 1984. 39(4): p. 556-70.
321. Günther V, Lindert U, and Schaffner W, The taste of heavy metals: gene regulation by MTF-1. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1823(9): p. 1416-25.
322. Schrauzer GN, The discovery of the essential trace elements: An outline of the history of biological trace element research, in *Biochemistry of the essential ultratrace elements*. 1984, Springer. p. 17-31.
323. Andrews NC, Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nat Rev Genet*, 2000. 1(3): p. 208-17.
324. Gulec S, Anderson GJ, and Collins JF, Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014. 307(4): p. G397-409.
325. Björn-Rasmussen E, Hallberg L, Isaksson B, and Arvidsson B, Food iron absorption in man applications of the two-pool extrinsic tag method to measure heme and nonheme iron absorption from the whole diet. *The Journal of clinical investigation*, 1974. 53(1): p. 247-55.
326. Wheby MS, Site of iron absorption in man. *Scand J Haematol*, 1970. 7(1): p. 56-62.
327. Raffin SB, Woo CH, Roost KT, Price DC, and Schmid R, Intestinal absorption of hemoglobin iron-heme cleavage by mucosal heme oxygenase. *J Clin Invest*, 1974. 54(6): p. 1344-52.
328. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC, Frazer DM, Anderson GJ, Vulpe CD, Simpson RJ, and McKie AT, Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*, 2005. 122(5): p. 789-801.

329. Latunde-Dada GO, Takeuchi K, Simpson RJ, and McKie AT, Haem carrier protein 1 (HCP1): Expression and functional studies in cultured cells. *FEBS Lett*, 2006. 580(30): p. 6865-70.
330. Le Blanc S, Garrick MD, and Arredondo M, Heme carrier protein 1 transports heme and is involved in heme-Fe metabolism. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2012. 302(12): p. C1780-C5.
331. Gunshin H, Fujiwara Y, Custodio AO, Drenzo C, Robine S, and Andrews NC, Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver. *J Clin Invest*, 2005. 115(5): p. 1258-66.
332. Fleming MD, Trenor CC, 3rd, Su MA, Foerzler D, Beier DR, Dietrich WF, and Andrews NC, Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet*, 1997. 16(4): p. 383-6.
333. Luo X, Hill M, Johnson A, and Latunde-Dada GO, Modulation of Dcytb (Cybrd 1) expression and function by iron, dehydroascorbate and Hif-2alpha in cultured cells. *Biochim Biophys Acta*, 2014. 1840(1): p. 106-12.
334. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, Mudaly M, Richardson C, Barlow D, Bomford A, Peters TJ, Raja KB, Shirali S, Hediger MA, Farzaneh F, and Simpson RJ, An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science*, 2001. 291(5509): p. 1755-9.
335. Granick S and Michaelis L, Ferritin and Apoferritin. *Science*, 1942. 95(2469): p. 439-40.
336. Hahn PF, Bale WF, Ross JF, Balfour WM, and Whipple GH, Radioactive Iron Absorption by Gastro-Intestinal Tract : Influence of Anemia, Anoxia, and Antecedent Feeding Distribution in Growing Dogs. *J Exp Med*, 1943. 78(3): p. 169-88.
337. Harrison PM and Arosio P, The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1996. 1275(3): p. 161-203.
338. McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Hediger MA, Hentze MW, and Simpson RJ, A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell*, 2000. 5(2): p. 299-309.
339. Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J, and Anderson GJ, Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet*, 1999. 21(2): p. 195-9.
340. Osaki S and Johnson DA, Mobilization of liver iron by ferroxidase (ceruloplasmin). *J Biol Chem*, 1969. 244(20): p. 5757-8.
341. Osaki S, Johnson DA, and Frieden E, The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum. *J Biol Chem*, 1966. 241(12): p. 2746-51.
342. Cheng Y, Zak O, Aisen P, Harrison SC, and Walz T, Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell*, 2004. 116(4): p. 565-76.
343. Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H, Knutson MD, and Cousins RJ, Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(37): p. 13612-7.
344. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, and Vaulont S, Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(15): p. 8780-5.
345. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, and Loreal O, A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem*, 2001. 276(11): p. 7811-9.
346. Sies H, Berndt C, and Jones DP, Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem*, 2017. 86: p. 715-48.
347. Zhang L, Wang X, Cueto R, Effic C, Zhang Y, Tan H, Qin X, Ji Y, Yang X, and Wang H, Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. *Redox Biol*, 2019. 26: p. 101284.
348. Sies H, Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*, 1993. 215(2): p. 213-9.
349. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, and Kan YW, Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(21): p. 9926-30.

350. Motohashi H and Yamamoto M, Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med*, 2004. 10(11): p. 549-57.
351. Hayes JD, Chanas SA, Henderson CJ, McMahon M, Sun C, Moffat GJ, Wolf CR, and Yamamoto M, The Nrf2 transcription factor contributes both to the basal expression of glutathione S-transferases in mouse liver and to their induction by the chemopreventive synthetic antioxidants, butylated hydroxyanisole and ethoxyquin. *Biochem Soc Trans*, 2000. 28(2): p. 33-41.
352. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, and Yamamoto M, Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev*, 1999. 13(1): p. 76-86.
353. Zipper LM and Mulcahy RT, The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm. *J Biol Chem*, 2002. 277(39): p. 36544-52.
354. Tong KI, Katoh Y, Kusunoki H, Itoh K, Tanaka T, and Yamamoto M, Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol Cell Biol*, 2006. 26(8): p. 2887-900.
355. Cullinan SB, Gordan JD, Jin J, Harper JW, and Diehl JA, The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(19): p. 8477-86.
356. Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K, and Yamamoto M, Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(16): p. 7130-9.
357. Stewart D, Killeen E, Naquin R, Alam S, and Alam J, Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J Biol Chem*, 2003. 278(4): p. 2396-402.
358. Nguyen T, Sherratt PJ, Huang HC, Yang CS, and Pickett CB, Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *J Biol Chem*, 2003. 278(7): p. 4536-41.
359. Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Yamamoto M, and Talalay P, Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(18): p. 11908-13.
360. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T, and Yamamoto M, Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells*, 2003. 8(4): p. 379-91.
361. Kobayashi A, Kang MI, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K, and Yamamoto M, Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol*, 2006. 26(1): p. 221-9.
362. Itoh K, Igarashi K, Hayashi N, Nishizawa M, and Yamamoto M, Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived CNC family transcription factor heterodimerizing with the small Maf family proteins. *Mol Cell Biol*, 1995. 15(8): p. 4184-93.
363. Rushmore TH, Morton MR, and Pickett CB, The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem*, 1991. 266(18): p. 11632-9.
364. Friling RS, Bensimon A, Tichauer Y, and Daniel V, Xenobiotic-inducible expression of murine glutathione S-transferase Ya subunit gene is controlled by an electrophile-responsive element. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. 87(16): p. 6258-62.
365. Jain AK and Jaiswal AK, GSK-3beta acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. *J Biol Chem*, 2007. 282(22): p. 16502-10.
366. Kaspar JW and Jaiswal AK, Tyrosine phosphorylation controls nuclear export of Fyn, allowing Nrf2 activation of cytoprotective gene expression. *FASEB J*, 2011. 25(3): p. 1076-87.

367. Higgins LG, Kelleher MO, Eggleston IM, Itoh K, Yamamoto M, and Hayes JD, Transcription factor Nrf2 mediates an adaptive response to sulforaphane that protects fibroblasts *in vitro* against the cytotoxic effects of electrophiles, peroxides and redox-cycling agents. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009. 237(3): p. 267-80.
368. Chowdhry S, Nazmy MH, Meakin PJ, Dinkova-Kostova AT, Walsh SV, Tsujita T, Dillon JF, Ashford ML, and Hayes JD, Loss of Nrf2 markedly exacerbates nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med*, 2010. 48(2): p. 357-71.
369. Zhang YK, Wu KC, and Klaassen CD, Genetic activation of Nrf2 protects against fasting-induced oxidative stress in livers of mice. *PLoS One*, 2013. 8(3): p. e59122.
370. Chan K, Lu R, Chang JC, and Kan YW, NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(24): p. 13943-8.
371. Enomoto A, Itoh K, Nagayoshi E, Haruta J, Kimura T, O'Connor T, Harada T, and Yamamoto M, High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol Sci*, 2001. 59(1): p. 169-77.
372. Chan K, Han XD, and Kan YW, An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(8): p. 4611-6.
373. Singh A, Rangasamy T, Thimmulappa RK, Lee H, Osburn WO, Brigelius-Flohé R, Kensler TW, Yamamoto M, and Biswal S, Glutathione peroxidase 2, the major cigarette smoke-inducible isoform of GPX in lungs, is regulated by Nrf2. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006. 35(6): p. 639-50.
374. Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, Zhen L, Srisuma SS, Kensler TW, Yamamoto M, Petrache I, Tuder RM, and Biswal S, Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Clin Invest*, 2004. 114(9): p. 1248-59.
375. Wakabayashi N, Itoh K, Wakabayashi J, Motohashi H, Noda S, Takahashi S, Imakado S, Kotsuji T, Otsuka F, Roop DR, Harada T, Engel JD, and Yamamoto M, Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat Genet*, 2003. 35(3): p. 238-45.
376. Devling TW, Lindsay CD, McLellan LI, McMahan M, and Hayes JD, Utility of siRNA against Keap1 as a strategy to stimulate a cancer chemopreventive phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(20): p. 7280-5A.
377. Favreau LV and Pickett CB, Transcriptional regulation of the rat NAD(P)H:quinone reductase gene. Identification of regulatory elements controlling basal level expression and inducible expression by planar aromatic compounds and phenolic antioxidants. *J Biol Chem*, 1991. 266(7): p. 4556-61.
378. Rushmore TH and Pickett CB, Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J Biol Chem*, 1990. 265(24): p. 14648-53.
379. Zhang Y, Talalay P, Cho CG, and Posner GH, A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(6): p. 2399-403.
380. Tebay LE, Robertson H, Durant ST, Vitale SR, Penning TM, Dinkova-Kostova AT, and Hayes JD, Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. *Free Radic Biol Med*, 2015. 88(Pt B): p. 108-46.
381. Tonelli C, Chio IIC, and Tuveson DA, Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal*, 2018. 29(17): p. 1727-45.
382. Dong J, Sulik KK, and Chen SY, Nrf2-mediated transcriptional induction of antioxidant response in mouse embryos exposed to ethanol *in vivo*: implications for the prevention of fetal alcohol spectrum disorders. *Antioxid Redox Signal*, 2008. 10(12): p. 2023-33.
383. Song MO, Mattie MD, Lee CH, and Freedman JH, The role of Nrf1 and Nrf2 in the regulation of copper-responsive transcription. *Exp Cell Res*, 2014. 322(1): p. 39-50.

384. Suzuki T, Kelly VP, Motohashi H, Nakajima O, Takahashi S, Nishimura S, and Yamamoto M, Deletion of the selenocysteine tRNA gene in macrophages and liver results in compensatory gene induction of cytoprotective enzymes by Nrf2. *J Biol Chem*, 2008. 283(4): p. 2021-30.
385. Seeher S, Atassi T, Mahdi Y, Carlson BA, Braun D, Wirth EK, Klein MO, Reix N, Miniard AC, Schomburg L, Hatfield DL, Driscoll DM, and Schweizer U, Secisbp2 is essential for embryonic development and enhances selenoprotein expression. *Antioxid Redox Signal*, 2014. 21(6): p. 835-49.
386. Suvorova ES, Lucas O, Weisend CM, Rollins MF, Merrill GF, Capecchi MR, and Schmidt EE, Cytoprotective Nrf2 pathway is induced in chronically txnrd 1-deficient hepatocytes. *PLoS One*, 2009. 4(7): p. e6158.
387. Carlson BA, Tobe R, Yefremova E, Tsuji PA, Hoffmann VJ, Schweizer U, Gladyshev VN, Hatfield DL, and Conrad M, Glutathione peroxidase 4 and vitamin E cooperatively prevent hepatocellular degeneration. *Redox Biol*, 2016. 9: p. 22-31.
388. Oteiza PI, Clegg MS, Zago MP, and Keen CL, Zinc deficiency induces oxidative stress and AP-1 activation in 3T3 cells. *Free Radic Biol Med*, 2000. 28(7): p. 1091-9.
389. Johnson WT and Thomas AC, Copper deprivation potentiates oxidative stress in HL-60 cell mitochondria. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1999. 221(2): p. 147-52.
390. Kurtoglu E, Ugur A, Baltaci AK, and Undar L, Effect of iron supplementation on oxidative stress and antioxidant status in iron-deficiency anemia. *Biol Trace Elem Res*, 2003. 96(1-3): p. 117-23.
391. Prohaska JR, Changes in Cu,Zn-superoxide dismutase, cytochrome c oxidase, glutathione peroxidase and glutathione transferase activities in copper-deficient mice and rats. *J Nutr*, 1991. 121(3): p. 355-63.
392. Shaheen AA and el-Fattah AA, Effect of dietary zinc on lipid peroxidation, glutathione, protein thiols levels and superoxide dismutase activity in rat tissues. *Int J Biochem Cell Biol*, 1995. 27(1): p. 89-95.
393. Schultze M and Kuiken K, The effect of deficiencies in copper and iron on the catalase activity of rat tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 1941. 137: p. 727-34.
394. Yan L and Spallholz JE, Generation of reactive oxygen species from the reaction of selenium compounds with thiols and mammary tumor cells. *Biochem Pharmacol*, 1993. 45(2): p. 429-37.
395. Shen HM, Yang CF, and Ong CN, Sodium selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Int J Cancer*, 1999. 81(5): p. 820-8.
396. Ha JH, Doguer C, and Collins JF, Consumption of a High-Iron Diet Disrupts Homeostatic Regulation of Intestinal Copper Absorption in Adolescent Mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2017. 313(4): p. G535-G360.
397. Ha JH, Doguer C, Wang X, Flores SR, and Collins JF, High-Iron Consumption Impairs Growth and Causes Copper-Deficiency Anemia in Weanling Sprague-Dawley Rats. *PLoS One*, 2016. 11(8): p. e0161033.
398. Klevay LM, Iron overload can induce mild copper deficiency. *J Trace Elem Med Biol*, 2001. 14(4): p. 237-40.
399. Owen CA, Jr., Effects of iron on copper metabolism and copper on iron metabolism in rats. *Am J Physiol*, 1973. 224(3): p. 514-8.
400. Ravia JJ, Stephen RM, Ghishan FK, and Collins JF, Menkes Copper ATPase (Atp7a) is a novel metal-responsive gene in rat duodenum, and immunoreactive protein is present on brush-border and basolateral membrane domains. *J Biol Chem*, 2005. 280(43): p. 36221-7.
401. Collins JF, Franck CA, Kowdley KV, and Ghishan FK, Identification of differentially expressed genes in response to dietary iron deprivation in rat duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005. 288(5): p. G964-71.
402. Arredondo M, Cambiazo V, Tapia L, Gonzalez-Aguero M, Nunez MT, Uauy R, and Gonzalez M, Copper overload affects copper and iron metabolism in Hep-G2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004. 287(1): p. G27-32.

403. Tapia L, Suazo M, Hodar C, Cambiazo V, and Gonzalez M, Copper exposure modifies the content and distribution of trace metals in mammalian cultured cells. *Biometals*, 2003. 16(1): p. 169-74.
404. Chung J, Prohaska JR, and Wessling-Resnick M, Ferroportin-1 is not upregulated in copper-deficient mice. *J Nutr*, 2004. 134(3): p. 517-21.
405. Mostad EJ and Prohaska JR, Glycosylphosphatidylinositol-linked ceruloplasmin is expressed in multiple rodent organs and is lower following dietary copper deficiency. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2011. 236(3): p. 298-308.
406. Prohaska JR and Broderius M, Copper deficiency has minimal impact on ferroportin expression or function. *Biometals*, 2012. 25(4): p. 633-42.
407. Videt-Gibou D, Belliard S, Bardou-Jacquet E, Troadec MB, Le Lan C, Jouanolle AM, Loreal O, Rivalan J, and Brissot P, Iron excess treatable by copper supplementation in acquired aceruloplasminemia: a new form of secondary human iron overload? *Blood*, 2009. 114(11): p. 2360-1.
408. Broderius M, Mostad E, Wendroth K, and Prohaska JR, Levels of plasma ceruloplasmin protein are markedly lower following dietary copper deficiency in rodents. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2010. 151(4): p. 473-9.
409. Jiang B, Liu G, Zheng J, Chen M, Maimaitiming Z, Chen M, Liu S, Jiang R, Fuqua BK, Dunaief JL, Vulpe CD, Anderson GJ, Wang H, and Chen H, Hephaestin and ceruloplasmin facilitate iron metabolism in the mouse kidney. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 39470.
410. Yamamoto K, Yoshida K, Miyagoe Y, Ishikawa A, Hanaoka K, Nomoto S, Kaneko K, Ikeda S, and Takeda S, Quantitative evaluation of expression of iron-metabolism genes in ceruloplasmin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta*, 2002. 1588(3): p. 195-202.
411. Brewer GJ, Dick RD, Johnson VD, Brunberg JA, Kluin KJ, and Fink JK, Treatment of Wilson's disease with zinc: XV long-term follow-up studies. *J Lab Clin Med*, 1998. 132(4): p. 264-78.
412. Irato P and Albergoni V, Interaction between copper and zinc in metal accumulation in rats with particular reference to the synthesis of induced-metallothionein. *Chem Biol Interact*, 2005. 155(3): p. 155-64.
413. Santon A, Irato P, Medici V, D'Inca R, Albergoni V, and Sturniolo GC, Effect and possible role of Zn treatment in LEC rats, an animal model of Wilson's disease. *Biochim Biophys Acta*, 2003. 1637(1): p. 91-7.
414. Waalkes MP, Harvey MJ, and Klaassen CD, Relative *in vitro* affinity of hepatic metallothionein for metals. *Toxicol Lett*, 1984. 20(1): p. 33-9.
415. Nielson KB and Winge DR, Preferential binding of copper to the beta domain of metallothionein. *J Biol Chem*, 1984. 259(8): p. 4941-6.
416. Reeves PG, Copper metabolism in metallothionein-null mice fed a high-zinc diet. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 1998. 9(10): p. 598-601.
417. Ogiso T, Moriyama K, Sasaki S, Ishimura Y, and Minato A, Inhibitory effect of high dietary zinc on copper absorption in rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1974. 22(1): p. 55-60.
418. Ogiso T, Ogawa N, and Miura T, Inhibitory effect of high dietary zinc on copper absorption in rats. II. Binding of copper and zinc to cytosol proteins in the intestinal mucosa. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1979. 27(2): p. 515-21.
419. Fischer PW, Giroux A, and L'Abbe MR, The effect of dietary zinc on intestinal copper absorption. *Am J Clin Nutr*, 1981. 34(9): p. 1670-5.
420. Oestreicher P and Cousins RJ, Copper and zinc absorption in the rat: mechanism of mutual antagonism. *J Nutr*, 1985. 115(2): p. 159-66.
421. Lee JM, Chan K, Kan YW, and Johnson JA, Targeted disruption of Nrf2 causes regenerative immune-mediated hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(26): p. 9751-6.
422. Yanagawa T, Itoh K, Uwayama J, Shibata Y, Yamaguchi A, Sano T, Ishii T, Yoshida H, and Yamamoto M, Nrf2 deficiency causes tooth decolorization due to iron transport disorder in enamel organ. *Genes Cells*, 2004. 9(7): p. 641-51.

423. Ishida T and Takechi S, Nrf2-ARE-Dependent Alterations in Zinc Transporter mRNA Expression in HepG2 Cells. *PLoS One*, 2016. 11(11): p. e0166100.
424. Raines AM and Sunde RA, Selenium toxicity but not deficient or super-nutritional selenium status vastly alters the transcriptome in rodents. *BMC Genomics*, 2011. 12: p. 26.
425. Speckmann B, Schulz S, Hiller F, Hesse D, Schumacher F, Kleuser B, Geisel J, Obeid R, Grune T, and Kipp AP, Selenium increases hepatic DNA methylation and modulates one-carbon metabolism in the liver of mice. *J Nutr Biochem*, 2017. 48: p. 112-9.
426. Xu J, Gong Y, Sun Y, Cai J, Liu Q, Bao J, Yang J, and Zhang Z, Impact of Selenium Deficiency on Inflammation, Oxidative Stress, and Phagocytosis in Mouse Macrophages. *Biol Trace Elem Res*, 2020. 194(1): p. 237-43.
427. Carlson BA, Yoo MH, Sano Y, Sengupta A, Kim JY, Irons R, Gladyshev VN, Hatfield DL, and Park JM, Selenoproteins regulate macrophage invasiveness and extracellular matrix-related gene expression. *BMC Immunol*, 2009. 10: p. 57.
428. Kawatani Y, Suzuki T, Shimizu R, Kelly VP, and Yamamoto M, Nrf2 and selenoproteins are essential for maintaining oxidative homeostasis in erythrocytes and protecting against hemolytic anemia. *Blood*, 2011. 117(3): p. 986-96.
429. Tindell R, Wall SB, Li Q, Li R, Dunigan K, Wood R, and Tipple TE, Selenium supplementation of lung epithelial cells enhances nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) activation following thioredoxin reductase inhibition. *Redox Biol*, 2018. 19: p. 331-8.
430. Santos LR, Duraes C, Ziros PG, Pestana A, Esteves C, Neves C, Carvalho D, Bongiovanni M, Renaud CO, Chartoumpekis DV, Habeos IG, Simoes MS, Soares P, and Sykiotis GP, Interaction of Genetic Variations in NFE2L2 and SELENOS Modulates the Risk of Hashimoto's Thyroiditis. *Thyroid*, 2019. 29(9): p. 1302-15.
431. Li Y and Jaiswal AK, Regulation of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene. Role of AP1 binding site contained within human antioxidant response element. *J Biol Chem*, 1992. 267(21): p. 15097-104.
432. Yim SH, Clish CB, and Gladyshev VN, Selenium Deficiency Is Associated with Pro-longevity Mechanisms. *Cell Rep*, 2019. 27(9): p. 2785-97 e3.
433. Dong R, Wang D, Wang X, Zhang K, Chen P, Yang CS, and Zhang J, Epigallocatechin-3-gallate enhances key enzymatic activities of hepatic thioredoxin and glutathione systems in selenium-optimal mice but activates hepatic Nrf2 responses in selenium-deficient mice. *Redox Biol*, 2016. 10: p. 221-32.
434. Mostert V, Hill KE, Ferris CD, and Burk RF, Selective induction of liver parenchymal cell heme oxygenase-1 in selenium-deficient rats. *Biol Chem*, 2003. 384(4): p. 681-7.
435. Weitzel F, Ursini F, and Wendel A, Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in various mouse organs during selenium deficiency and repletion. *Biochim Biophys Acta*, 1990. 1036(2): p. 88-94.
436. Lennicke C, Rahn J, Kipp AP, Dojcinovic BP, Müller AS, Wessjohann LA, Lichtenfels R, and Seliger B, Individual effects of different selenocompounds on the hepatic proteome and energy metabolism of mice. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2017. 1861(1 Pt A): p. 3323-34.
437. Burk RF, Production of selenium deficiency in the rat. *Methods Enzymol*, 1987. 143: p. 307-13.
438. Bierla K, Suzuki N, Ogra Y, Szpunar J, and Lobinski R, Identification and determination of selenohomolanthionine - The major selenium compound in *Torula* yeast. *Food Chem*, 2017. 237: p. 1196-201.
439. Kipp A, Banning A, van Schothorst EM, Meplan C, Schomburg L, Evelo C, Coort S, Gaj S, Keijer J, Hesketh J, and Brigelius-Flohé R, Four selenoproteins, protein biosynthesis, and Wnt signalling are particularly sensitive to limited selenium intake in mouse colon. *Mol Nutr Food Res*, 2009. 53(12): p. 1561-72.
440. Finke H, Winkelbeiner N, Lossow K, Hertel B, Wandt VK, Schwarz M, Pohl G, Kopp JF, Ebert F, Kipp AP, and Schwerdtle T, Effects of a Cumulative, Suboptimal Supply of Multiple Trace Elements in Mice: Trace Element Status, Genomic Stability, Inflammation, and Epigenetics. *Mol Nutr Food Res*, 2020. 64(16): p. e2000325.

441. Müller MF, Diploma Thesis: Auswirkungen von Selenmangel auf die Expression cytoprotektiver Enzyme, in German Institute of Human Nutrition. 2009, University of Potsdam. p. 1-95.
442. Blum NM, Mueller K, Lippmann D, Metges CC, Linn T, Pallauf J, and Mueller AS, Feeding of selenium alone or in combination with glucoraphanin differentially affects intestinal and hepatic antioxidant and phase II enzymes in growing rats. *Biol Trace Elem Res*, 2013. 151(3): p. 384-99.
443. Tauber S, Sieckmann MK, Eler K, Stahl W, Klotz LO, and Steinbrenner H, Activation of Nrf2 by Electrophiles Is Largely Independent of the Selenium Status of HepG2 Cells. *Antioxidants (Basel)*, 2021. 10(2).
444. De Spirt S, Eckers A, Wehrend C, Micoogullari M, Sies H, Stahl W, and Steinbrenner H, Interplay between the chalcone cardamonin and selenium in the biosynthesis of Nrf2-regulated antioxidant enzymes in intestinal Caco-2 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 2016. 91: p. 164-71.
445. Pagmantidis V, Bermano G, Villette S, Broom I, Arthur J, and Hesketh J, Effects of Se-depletion on glutathione peroxidase and selenoprotein W gene expression in the colon. *FEBS Lett*, 2005. 579(3): p. 792-6.
446. Uthus EO, Yokoi K, and Davis CD, Selenium deficiency in Fisher-344 rats decreases plasma and tissue homocysteine concentrations and alters plasma homocysteine and cysteine redox status. *J Nutr*, 2002. 132(6): p. 1122-8.
447. Wild AC, Moinova HR, and Mulcahy RT, Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem*, 1999. 274(47): p. 33627-36.
448. Hill KE and Burk RF, Effect of selenium deficiency and vitamin E deficiency on glutathione metabolism in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 1982. 257(18): p. 10668-72.
449. Song MO, Li J, and Freedman JH, Physiological and toxicological transcriptome changes in HepG2 cells exposed to copper. *Physiol Genomics*, 2009. 38(3): p. 386-401.
450. Muller P, van Bakel H, van de Sluis B, Holstege F, Wijmenga C, and Klomp LW, Gene expression profiling of liver cells after copper overload *in vivo* and *in vitro* reveals new copper-regulated genes. *J Biol Inorg Chem*, 2007. 12(4): p. 495-507.
451. Fujie T, Murakami M, Yoshida E, Tachinami T, Shinkai Y, Fujiwara Y, Yamamoto C, Kumagai Y, Naka H, and Kaji T, Copper diethyldithiocarbamate as an activator of Nrf2 in cultured vascular endothelial cells. *J Biol Inorg Chem*, 2016. 21(2): p. 263-73.
452. Wang XJ, Hayes JD, Higgins LG, Wolf CR, and Dinkova-Kostova AT, Activation of the NRF2 signaling pathway by copper-mediated redox cycling of para- and ortho-hydroquinones. *Chem Biol*, 2010. 17(1): p. 75-85.
453. Lin D, Dai F, Sun LD, and Zhou B, Toward an understanding of the role of a catechol moiety in cancer chemoprevention: The case of copper- and o-quinone-dependent Nrf2 activation by a catechol-type resveratrol analog. *Mol Nutr Food Res*, 2015. 59(12): p. 2395-406.
454. Oteiza PI, Olin KL, Fraga CG, and Keen CL, Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat testes. *J Nutr*, 1995. 125(4): p. 823-9.
455. Bagchi D, Vuchetich PJ, Bagchi M, Tran MX, Krohn RL, Ray SD, and Stohs SJ, Protective effects of zinc salts on TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation, glutathione depletion, DNA damage and peritoneal macrophage activation in mice. *Gen Pharmacol*, 1998. 30(1): p. 43-50.
456. Zhang C, Lu X, Tan Y, Li B, Miao X, Jin L, Shi X, Zhang X, Miao L, Li X, and Cai L, Diabetes-induced hepatic pathogenic damage, inflammation, oxidative stress, and insulin resistance was exacerbated in zinc deficient mouse model. *PLoS One*, 2012. 7(12): p. e49257.
457. Li B, Cui WP, Tan Y, Luo P, Chen Q, Zhang C, Qu W, Miao LN, and Cai L, Zinc is essential for the transcription function of Nrf2 in human renal tubule cells *in vitro* and mouse kidney *in vivo* under the diabetic condition. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2014. 18(5): p. 895-906.

458. Cortese MM, Suschek CV, Wetzel W, Kroncke KD, and Kolb-Bachofen V, Zinc protects endothelial cells from hydrogen peroxide via Nrf2-dependent stimulation of glutathione biosynthesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 2008. 44(12): p. 2002-12.
459. Ha KN, Chen Y, Cai JY, and Sternberg P, Increased glutathione synthesis through an ARE-Nrf2-dependent pathway by zinc in the RPE: Implication for protection against oxidative stress. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2006. 47(6): p. 2709-15.
460. Meister A and Anderson ME, Glutathione. *Annu Rev Biochem*, 1983. 52: p. 711-60.
461. Tang XH and Shay NF, Zinc has an insulin-like effect on glucose transport mediated by phosphoinositol-3-kinase and AKT in 3T3-L1 fibroblasts and adipocytes. *Journal of Nutrition*, 2001. 131(5): p. 1414-20.
462. Ilouz R, Kaidanovich O, Gurwitz D, and Eldar-Finkelman H, Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta by bivalent zinc ions: insight into the insulin-mimetic action of zinc. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 295(1): p. 102-6.
463. McMahon M, Swift SR, and Hayes JD, Zinc-binding triggers a conformational-switch in the cullin-3 substrate adaptor protein KEAP1 that controls transcription factor NRF2. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018. 360: p. 45-57.
464. Silva-Gomes S, Santos AG, Caldas C, Silva CM, Neves JV, Lopes J, Carneiro F, Rodrigues PN, and Duarte TL, Transcription factor NRF2 protects mice against dietary iron-induced liver injury by preventing hepatocytic cell death. *J Hepatol*, 2014. 60(2): p. 354-61.
465. Moon MS, McDevitt EI, Zhu J, Stanley B, Krzeminski J, Amin S, Aliaga C, Miller TG, and Isom HC, Elevated hepatic iron activates NF-E2-related factor 2-regulated pathway in a dietary iron overload mouse model. *Toxicol Sci*, 2012. 129(1): p. 74-85.
466. Cui Z, Zhong Z, Yang Y, Wang B, Sun Y, Sun Q, Yang GY, and Bian L, Ferrous Iron Induces Nrf2 Expression in Mouse Brain Astrocytes to Prevent Neurotoxicity. *J Biochem Mol Toxicol*, 2016. 30(8): p. 396-403.
467. Whanger PD and Weswig PH, Effect of Supplementary Zinc on Intracellular Distribution of Hepatic Copper in Rats. *Journal of Nutrition*, 1971. 101(8): p. 1093-&.
468. Hoogenraad TU, Van Hattum J, and Van den Hamer CJ, Management of Wilson's disease with zinc sulphate. Experience in a series of 27 patients. *J Neurol Sci*, 1987. 77(2-3): p. 137-46.
469. Reeves PG, Briske-Anderson M, and Johnson L, Physiologic concentrations of zinc affect the kinetics of copper uptake and transport in the human intestinal cell model, Caco-2. *J Nutr*, 1998. 128(10): p. 1794-801.
470. Arredondo M, Martinez R, Nunez MT, Ruz M, and Olivares M, Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc. *Biol Res*, 2006. 39(1): p. 95-102.
471. Alker W and Haase H, Zinc and Sepsis. *Nutrients*, 2018. 10(8).
472. Espinoza A, Le Blanc S, Olivares M, Pizarro F, Ruz M, and Arredondo M, Iron, copper, and zinc transport: inhibition of divalent metal transporter 1 (DMT1) and human copper transporter 1 (hCTR1) by shRNA. *Biol Trace Elem Res*, 2012. 146(2): p. 281-6.
473. Kagi JH and Kojima Y, Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experientia Suppl*, 1987. 52: p. 25-61.
474. Bittel D, Dalton T, Samson SL, Gedamu L, and Andrews GK, The DNA binding activity of metal response element-binding transcription factor-1 is activated *in vivo* and *in vitro* by zinc, but not by other transition metals. *J Biol Chem*, 1998. 273(12): p. 7127-33.
475. Irato P, Sturniolo GC, Giaccon G, Magro A, D'Inca R, Mestriner C, and Albergoni V, Effect of zinc supplementation on metallothionein, copper, and zinc concentration in various tissues of copper-loaded rats. *Biol Trace Elem Res*, 1996. 51(1): p. 87-96.
476. Simmons SO, Fan CY, Yeoman K, Wakefield J, and Ramabhadran R, NRF2 Oxidative Stress Induced by Heavy Metals is Cell Type Dependent. *Curr Chem Genomics*, 2011. 5: p. 1-12.
477. Chareonpongkawamoto N and Yasumoto K, Selenium Deficiency as a Cause of Overload of Iron and Unbalanced Distribution of Other Minerals. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1995. 59(2): p. 302-6.

478. Thomson GG and Lawson BM, Copper and selenium interaction in sheep. *N Z Vet J*, 1970. 18(5): p. 79-82.
479. Buckley WT, Huckin SN, Fisher LJ, and Eigendorf GK, Effect of Selenium Supplementation on Copper-Metabolism in Dairy-Cows. *Canadian Journal of Animal Science*, 1986. 66(4): p. 1009-18.
480. Fehrs MS, Miller WJ, Gentry RP, Neathery MW, Blackmon DM, and Heinmiller SR, Effect of High but Nontoxic Dietary-Intake of Copper and Selenium on Metabolism in Calves. *Journal of Dairy Science*, 1981. 64(8): p. 1700-6.
481. Darago A, Sapota A, Nasiadek M, Klimczak M, and Kilanowicz A, The Effect of Zinc and Selenium Supplementation Mode on Their Bioavailability in the Rat Prostate. Should Administration Be Joint or Separate? *Nutrients*, 2016. 8(10).
482. McDermott JR, Geng X, Jiang L, Galvez-Peralta M, Chen F, Nebert DW, and Liu Z, Zinc- and bicarbonate-dependent ZIP8 transporter mediates selenite uptake. *Oncotarget*, 2016. 7(23): p. 35327-40.
483. Liu L, Geng X, Cai Y, Copple B, Yoshinaga M, Shen J, Nebert DW, Wang H, and Liu Z, Hepatic ZIP8 deficiency is associated with disrupted selenium homeostasis, liver pathology, and tumor formation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2018. 315(4): p. G569-G79.
484. Gungor H and Kara H, Effects of selenium, zinc, insulin and metallothionein on cadmium-induced oxidative stress and metallothionein gene expression levels in diabetic rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2020. 31(2).
485. Banni M, Messaoudi I, Said L, El Heni J, Kerkeni A, and Said K, Metallothionein gene expression in liver of rats exposed to cadmium and supplemented with zinc and selenium. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2010. 59(3): p. 513-9.
486. van Ryssen J, van Malsen P, and Hartmann F, Contribution of dietary sulphur to the interaction between selenium and copper in sheep. *The Journal of Agricultural Science*, 1998. 130(1): p. 107-14.
487. Jenkinson SG, Lawrence RA, Burk RF, and Williams DM, Effects of copper deficiency on the activity of the selenoenzyme glutathione peroxidase and on excretion and tissue retention of $^{75}\text{SeO}_3(2-)$. *J Nutr*, 1982. 112(1): p. 197-204.
488. Olin KL, Walter RM, and Keen CL, Copper deficiency affects selenogluthathione peroxidase and selenodeiodinase activities and antioxidant defense in weanling rats. *Am J Clin Nutr*, 1994. 59(3): p. 654-8.
489. Prohaska JR, Sunde RA, and Zinn KR, Livers from Copper-Deficient Rats Have Lower Glutathione-Peroxidase Activity and Messenger-Rna Levels but Normal Liver Selenium Levels. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 1992. 3(8): p. 429-36.
490. Ossola JO, Groppa MD, and Tomaro ML, Relationship between oxidative stress and heme oxygenase induction by copper sulfate. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1997. 337(2): p. 332-7.
491. Yamamoto H, Hirose K, Hayasaki Y, Masuda M, Kazusaka A, and Fujita S, Mechanism of enhanced lipid peroxidation in the liver of Long-Evans cinnamon (LEC) rats. *Arch Toxicol*, 1999. 73(8-9): p. 457-64.
492. Martitz J, Hofmann PJ, Johannes J, Kohrle J, Schomburg L, and Renko K, Factors impacting the aminoglycoside-induced UGA stop codon readthrough in selenoprotein translation. *J Trace Elem Med Biol*, 2016. 37: p. 104-10.
493. Renko K, Martitz J, Hybsier S, Heynisch B, Voss L, Everley RA, Gygi SP, Stoedter M, Wisniewska M, Kohrle J, Gladyshev VN, and Schomburg L, Aminoglycoside-driven biosynthesis of selenium-deficient Selenoprotein P. *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 4391.
494. Handy DE, Hang G, Scolaro J, Metes N, Razaq N, Yang Y, and Loscalzo J, Aminoglycosides decrease glutathione peroxidase-1 activity by interfering with selenocysteine incorporation. *J Biol Chem*, 2006. 281(6): p. 3382-8.
495. Tobe R, Naranjo-Suarez S, Everley RA, Carlson BA, Turanov AA, Tsuji PA, Yoo MH, Gygi SP, Gladyshev VN, and Hatfield DL, High error rates in selenocysteine insertion in mammalian cells

- treated with the antibiotic doxycycline, chloramphenicol, or geneticin. *J Biol Chem*, 2013. 288(21): p. 14709-15.
496. Nagasaka H, Inoue I, Inui A, Komatsu H, Sogo T, Murayama K, Murakami T, Yorifuji T, Asayama K, Katayama S, Uemoto S, Kobayashi K, Takayanagi M, Fujisawa T, and Tsukahara H, Relationship between oxidative stress and antioxidant systems in the liver of patients with Wilson disease: hepatic manifestation in Wilson disease as a consequence of augmented oxidative stress. *Pediatr Res*, 2006. 60(4): p. 472-7.
497. Stoytcheva ZR and Berry MJ, Transcriptional regulation of mammalian selenoprotein expression. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1790(11): p. 1429-40.
498. Stoytcheva ZR, Vladimirov V, Douet V, Stoychev I, and Berry MJ, Metal transcription factor-1 regulation via MREs in the transcribed regions of selenoprotein H and other metal-responsive genes. *Biochim Biophys Acta*, 2010. 1800(3): p. 416-24.
499. Amantana A, Vorachek WR, Butler JA, Costa ND, and Whanger PD, Effect of copper, zinc and cadmium on the promoter of selenoprotein W in glial and myoblast cells. *J Inorg Biochem*, 2002. 91(2): p. 356-62.
500. Tan M, Li S, Swaroop M, Guan K, Oberley LW, and Sun Y, Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53. *J Biol Chem*, 1999. 274(17): p. 12061-6.
501. Hussain SP, Amstad P, He P, Robles A, Lupold S, Kaneko I, Ichimiya M, Sengupta S, Mechanic L, Okamura S, Hofseth LJ, Moake M, Nagashima M, Forrester KS, and Harris CC, p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer Res*, 2004. 64(7): p. 2350-6.
502. Jen KY and Cheung VG, Identification of novel p53 target genes in ionizing radiation response. *Cancer Res*, 2005. 65(17): p. 7666-73.
503. Krieg AJ, Hammond EM, and Giaccia AJ, Functional analysis of p53 binding under differential stresses. *Mol Cell Biol*, 2006. 26(19): p. 7030-45.
504. Levine AJ, Hu W, and Feng Z, The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ*, 2006. 13(6): p. 1027-36.
505. Brigelius-Flohé R and Flohé L, Regulatory Phenomena in the Glutathione Peroxidase Superfamily. *Antioxid Redox Signal*, 2020. 33(7): p. 498-516.
506. Tassabehji NM, VanLandingham JW, and Levenson CW, Copper alters the conformation and transcriptional activity of the tumor suppressor protein p53 in human Hep G2 cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2005. 230(10): p. 699-708.
507. Vanlandingham JW, Tassabehji NM, Somers RC, and Levenson CW, Expression profiling of p53-target genes in copper-mediated neuronal apoptosis. *Neuromolecular Med*, 2005. 7(4): p. 311-24.
508. Narayanan VS, Fitch CA, and Levenson CW, Tumor suppressor protein p53 mRNA and subcellular localization are altered by changes in cellular copper in human Hep G2 cells. *J Nutr*, 2001. 131(5): p. 1427-32.
509. Millau JF, Bastien N, and Drouin R, P53 transcriptional activities: a general overview and some thoughts. *Mutat Res*, 2009. 681(2-3): p. 118-33.
510. Rundlöf AK, Carlsten M, and Arnér ES, The core promoter of human thioredoxin reductase 1: cloning, transcriptional activity, and Oct-1, Sp1, and Sp3 binding reveal a housekeeping-type promoter for the AU-rich element-regulated gene. *J Biol Chem*, 2001. 276(32): p. 30542-51.
511. Song IS, Chen HH, Aiba I, Hossain A, Liang ZD, Klomp LW, and Kuo MT, Transcription factor Sp1 plays an important role in the regulation of copper homeostasis in mammalian cells. *Mol Pharmacol*, 2008. 74(3): p. 705-13.
512. Yuan S, Chen S, Xi Z, and Liu Y, Copper-finger protein of Sp1: the molecular basis of copper sensing. *Metallomics*, 2017. 9(8): p. 1169-75.
513. Kurokawa S, Hill KE, McDonald WH, and Burk RF, Long isoform mouse selenoprotein P (Sepp1) supplies rat myoblast L8 cells with selenium via endocytosis mediated by heparin binding properties and apolipoprotein E receptor-2 (ApoER2). *J Biol Chem*, 2012. 287(34): p. 28717-26.

Anhang

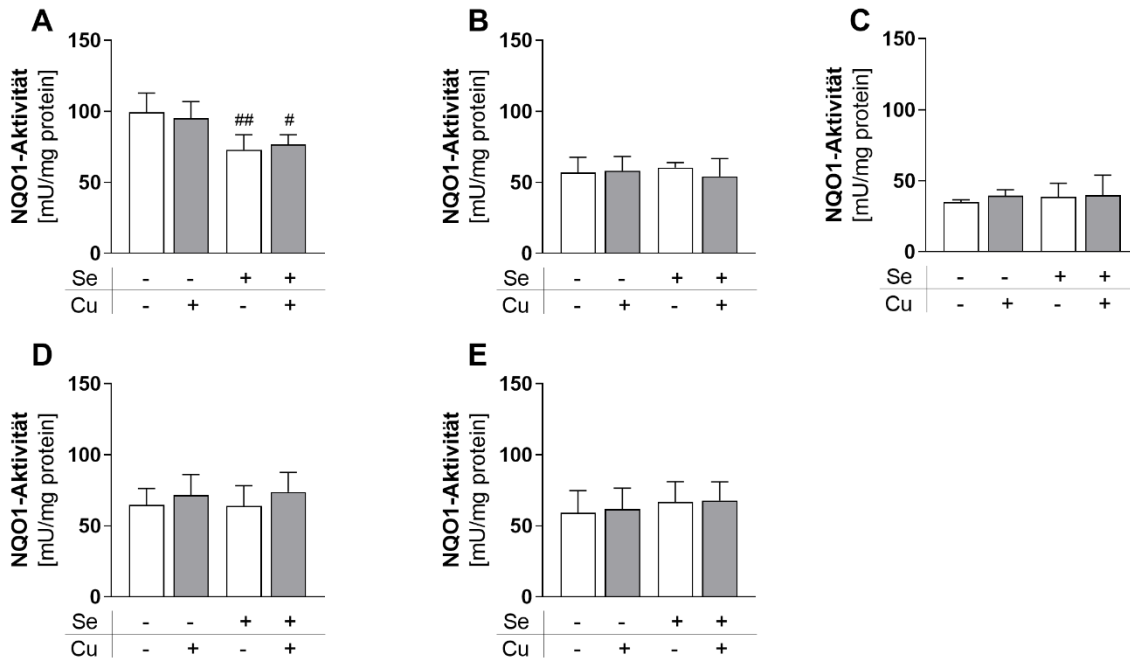


Abbildung 13. NQO1-Aktivität in verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes. Die NQO1-Aktivität im Duodenum (A), Jejunum (B), Ileum (C), Caecum (D) und Colon (E) von männlichen Mäusen, die entweder defizient (0,02/1,6 ppm) oder adäquat (0,15/6 ppm) mit Selen und Kupfer über acht Wochen gefüttert wurden, wurde photometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung (n=5-6). #p < 0.05; ##p < 0.01 vs. –Selen basierend auf einer *two-Way*-ANOVA mit Bonferroni's Post-Test.

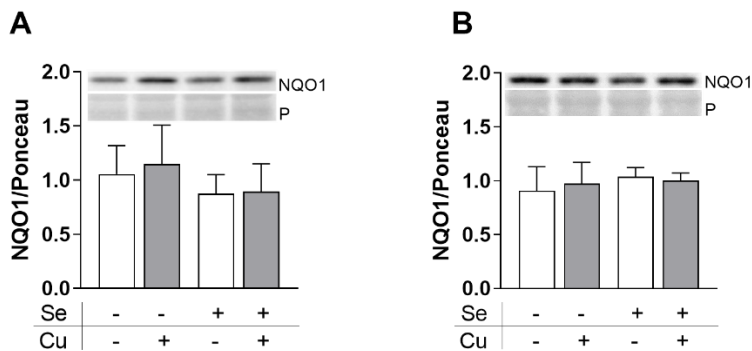


Abbildung 14. Hepatische und intestinale NQO1-Expression. Die NQO1-Expression in der Leber (A) und im Colon (B) von männlichen Mäusen, die entweder defizient (0,02/1,6 ppm) oder adäquat (0,15/6 ppm) mit Selen und Kupfer über acht Wochen gefüttert wurden, wurde photometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung (n=5-6). Die statistische Auswertung erfolgte basierend auf einer *two-Way*-ANOVA mit Bonferroni's Post-Test.

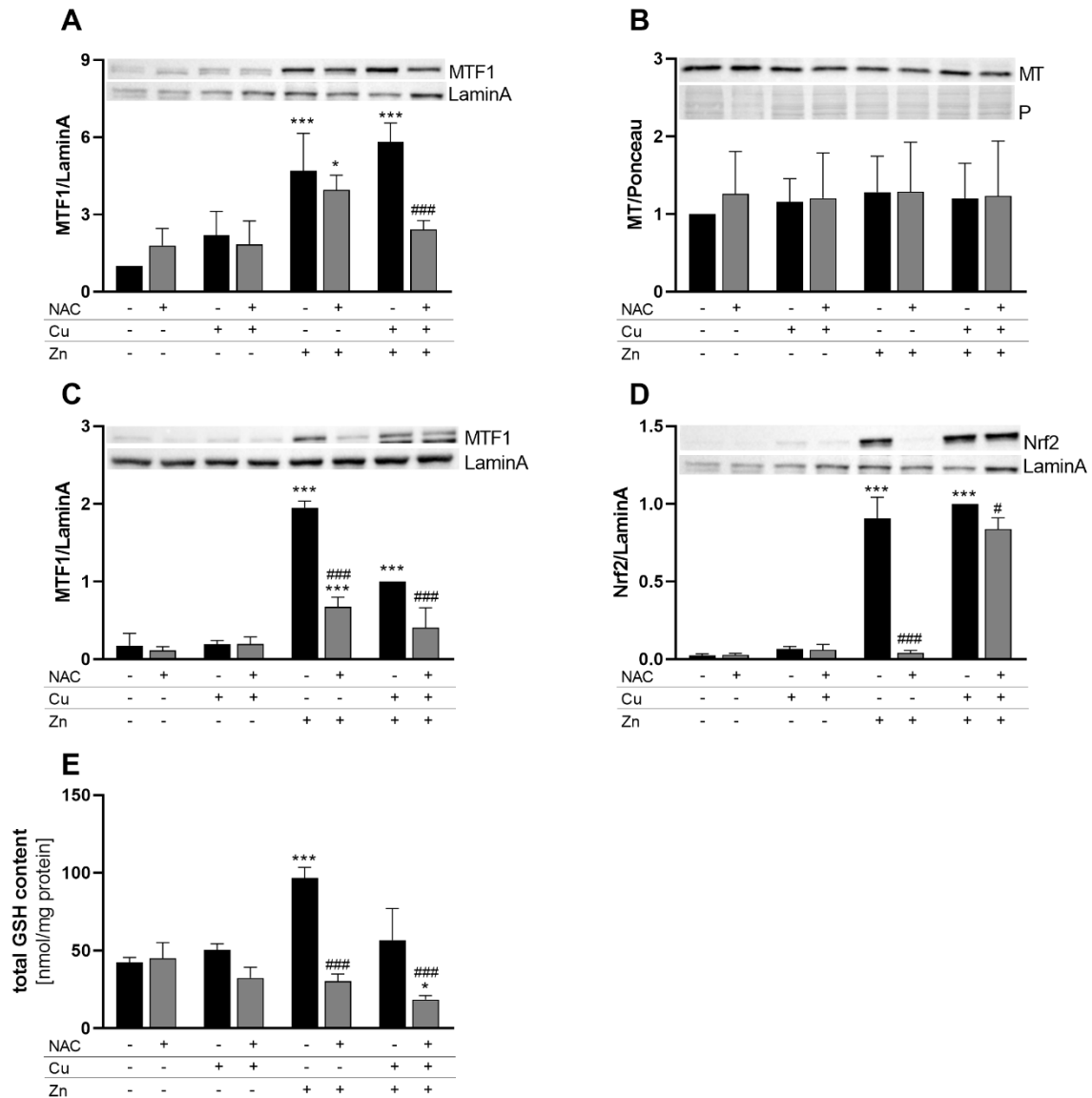


Abbildung 15. Die nukleäre Expression der Transkriptionsfaktoren MTF1 und Nrf2 sowie die Expression von Metallothionein und der intrazelluläre GSH-Gehalt nach Kurzzeitinkubation mit Kupfer und Zink. HepG2-(A, B) und HT29-Zellen (C, D, E) wurden für 4 (A, C, D) bzw. 6 h (B, E) mit 50 μ M CuSO₄ und/oder 50 μ M ZnSO₄ in Kombination mit 1 mM N-Acetylcystein (NAC) inkubiert. Die nukleäre Translokation von MTF1 (A, C) und Nrf2 (D) und die Expression von MT im Komplettlysate (B) wurde mittels Western Blot untersucht und entweder auf den nukleären Marker LaminA (A, C, D) oder auf die Ponceau-Färbung (B) bezogen. Die Normalisierung erfolgte in den HepG2-Zellen auf die unbehandelte Kontrolle und in den HT29-Zellen auf die mit Kupfer- und Zink-behandelten Zellen. Der GSH-Gehalt in HT29-Zellen (E) wurde photometrisch gemessen und auf den Proteingehalt normalisiert. Die statistische Auswertung erfolgte anhand einer two-way ANOVA mit Bonferroni's Post-Test. *p < 0.05; ***p < 0.001 vs. unbehandelte Proben; #p < 0.05; ###p < 0.001 vs. -NAC.

Angaben zu Eigenanteilen

1) Crosstalk of Nrf2 with the Trace Elements Selenium, Iron, Zinc, and Copper

Manuskript Nr. 1

Kurzreferenz [Schwarz et al (2019), Nutrients]

Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin

Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin zu Abbildungen, die experimentelle Daten wiedergeben (nur für Originalartikel):

Abbildung # 3*	<input checked="" type="checkbox"/>	100% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten entstammen vollständig experimentellen Arbeiten, die der Kandidat/die Kandidatin durchgeführt hat)
	<input type="checkbox"/>	0% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten basieren ausschließlich auf Arbeiten anderer Koautoren)
	<input type="checkbox"/>	Etwaiger Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin zur Abbildung: _____% Kurzbeschreibung des Beitrages:

Abbildung # 5*	<input type="checkbox"/>	100% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten entstammen vollständig experimentellen Arbeiten, die der Kandidat/die Kandidatin durchgeführt hat)
	<input type="checkbox"/>	0% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten basieren ausschließlich auf Arbeiten anderer Koautoren)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Etwaiger Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin zur Abbildung: <u>70</u> % Kurzbeschreibung des Beitrages: Proteinanalytik/ grafische Darstellung/ statistische Auswertung

Abbildung # 4*	<input type="checkbox"/>	100% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten entstammen vollständig experimentellen Arbeiten, die der Kandidat/die Kandidatin durchgeführt hat)
	<input type="checkbox"/>	0% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten basieren ausschließlich auf Arbeiten anderer Koautoren)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Etwaiger Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin zur Abbildung: <u>60</u> % Kurzbeschreibung des Beitrages: RNA-Daten/ grafische Darstellung/ statistische Auswertung

Abbildungen # 2, S1, S2*	<input type="checkbox"/>	100% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten entstammen vollständig experimentellen Arbeiten, die der Kandidat/die Kandidatin durchgeführt hat)
	<input type="checkbox"/>	0% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten basieren ausschließlich auf Arbeiten anderer Koautoren)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Etwaiger Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin zur Abbildung: <u>50</u> % Kurzbeschreibung des Beitrages: Grafische Darstellung, Statistik, Messung Enzymaktivitäten

Abbildung # 1	<input type="checkbox"/>	100% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten entstammen vollständig experimentellen Arbeiten, die der Kandidat/die Kandidatin durchgeführt hat)
	<input type="checkbox"/>	0% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten basieren ausschließlich auf Arbeiten anderer Koautoren)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Etwaiger Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin zur Abbildung: <u>20</u> % Kurzbeschreibung des Beitrages: Grafische Darstellung/ Statistik

2) Copper interferes with selenoprotein synthesis and activity

Manuskript Nr. 2

Kurzreferenz [Schwarz et al (2020), Redox Biol.]

Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin

Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin zu Abbildungen, die experimentelle Daten wiedergeben (nur für Originalartikel):

Abbildung(en) # 2, 3, 5, 8, S2, S4, S5	<input checked="" type="checkbox"/>	100% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten entstammen vollständig experimentellen Arbeiten, die der Kandidat/die Kandidatin durchgeführt hat)
	<input type="checkbox"/>	0% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten basieren ausschließlich auf Arbeiten anderer Koautoren)
	<input type="checkbox"/>	Etwaiger Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin zur Abbildung: _____% Kurzbeschreibung des Beitrages:
Abbildung(en) # 4,7, S3	<input type="checkbox"/>	100% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten entstammen vollständig experimentellen Arbeiten, die der Kandidat/die Kandidatin durchgeführt hat)
	<input type="checkbox"/>	0% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten basieren ausschließlich auf Arbeiten anderer Koautoren)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Etwaiger Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin zur Abbildung: <u>80</u> % Kurzbeschreibung des Beitrages: Abbildungsteile 4A, B, C; 7A-F, 7I, J; S3B-D/ grafische Darstellung/ statistische Auswertung

Abbildung(en) # 1,S1	<input type="checkbox"/>	100% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten entstammen vollständig experimentellen Arbeiten, die der Kandidat/die Kandidatin durchgeführt hat)
	<input type="checkbox"/>	0% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten basieren ausschließlich auf Arbeiten anderer Koautoren)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Etwaiger Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin zur Abbildung: <u>70</u> % Kurzbeschreibung des Beitrages: Abbildungsteile 1B-D; S1A, E, G, K, L, M/ grafische Darstellung/ statistische Auswertung

Abbildung(en) # 6, S6	<input type="checkbox"/>	100% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten entstammen vollständig experimentellen Arbeiten, die der Kandidat/die Kandidatin durchgeführt hat)
	<input type="checkbox"/>	0% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten basieren ausschließlich auf Arbeiten anderer Koautoren)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Etwaiger Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin zur Abbildung: <u>50</u> % Kurzbeschreibung des Beitrages: Abbildungsteile 6E, F; S6D, E, K/ grafische Darstellung/ statistische Auswertung

3) N-Acetylcysteine as Modulator of the Essential Trace Elements Copper and Zinc

Manuskript Nr. 3

Kurzreferenz [Wolfram et al (2020), Antioxidants]

Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin

Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin zu Abbildungen, die experimentelle Daten wiedergeben (nur für Originalartikel):

Abbildung(en) # 1	<input type="checkbox"/>	100% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten entstammen vollständig experimentellen Arbeiten, die der Kandidat/die Kandidatin durchgeführt hat)
	<input type="checkbox"/>	0% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten basieren ausschließlich auf Arbeiten anderer Koautoren)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Etwaiger Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin zur Abbildung: <u>30</u> % Kurzbeschreibung des Beitrages: Probenbereitstellung für –vorbereitung für 1E, F

Abbildung(en) # 2	<input type="checkbox"/>	100% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten entstammen vollständig experimentellen Arbeiten, die der Kandidat/die Kandidatin durchgeführt hat)
	<input type="checkbox"/>	0% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten basieren ausschließlich auf Arbeiten anderer Koautoren)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Etwaiger Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin zur Abbildung: <u>50</u> % Kurzbeschreibung des Beitrages: Probenbereitstellung für –vorbereitung

Abbildung(en) # 4	<input type="checkbox"/>	100% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten entstammen vollständig experimentellen Arbeiten, die der Kandidat/die Kandidatin durchgeführt hat)
	<input type="checkbox"/>	0% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten basieren ausschließlich auf Arbeiten anderer Koautoren)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Etwaiger Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin zur Abbildung: <u>80</u> % Kurzbeschreibung des Beitrages: Probengenerierung, Datenauswertung, Vermessung

Abbildung(en) # Tabelle 1	<input type="checkbox"/>	100% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten entstammen vollständig experimentellen Arbeiten, die der Kandidat/die Kandidatin durchgeführt hat)
	<input type="checkbox"/>	0% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten basieren ausschließlich auf Arbeiten anderer Koautoren)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Etwaiger Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin zur Abbildung: <u>35</u> % Kurzbeschreibung des Beitrages: GSH-Messung

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich in den letzten dreieinhalb Jahren während meiner Promotion begleitet und unterstützt haben. Es war eine wahnsinnig interessante vor allem großartige Zeit.

Mein größter Dank geht an Frau Prof. Dr. Anna Kipp, die mir die Möglichkeit gegeben hat meine Promotion in ihrer Arbeitsgruppe und innerhalb des damals frisch bewilligten TraceAge-Projektes anzufertigen. Liebe Anna, vielen Dank für das Vertrauen in den letzten Jahren und dafür, dass deine Tür immer offenstand, um weitere Ideen und Projektpläne zu besprechen. Ich konnte mich in den vergangenen drei Jahren stark weiterentwickeln, viel Verantwortung übernehmen und viele neue Erfahrungen sammeln, wofür ich dir sehr dankbar bin.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. Hajo Haase für die Übernahme des Zweitgutachtens und die stets konstruktive Diskussion im Rahmen des TraceAge-Projekts. Bei Prof. Dr. Anika Wagner bedanke ich mich ebenfalls für die Übernahme des externen Gutachtens.

Bei Dr. Kristina Loßow möchte ich mich ebenfalls ganz besonders bedanken, die mir trotz der räumlichen Distanz nach Potsdam immer weitergeholfen hat und sich meine Sorgen und Probleme angehört hat. Außerdem möchte ich mich bei dir für die Organisation aller Tierversuche und -OPs bedanken, die ohne dein Organisationstalent wohl kaum so möglich geworden wären.

Ein weiterer, großer Dank gilt der weltbesten Sekretärin und mittlerweile zum Glück auch tollen Freundin Mandy Schalowski. Ich konnte stets auf deine Unterstützung zählen, mit dir lachen, weinen, jammern, aufregen... Danke, für die, die du bist!

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. René Thierbach, mit dem ich bei dem ein oder anderem Kaffee viele gute Gespräche führen konnte.

Bei Anna und Felix möchte ich mich für die gemeinsamen drei Jahre bedanken, die wir zusammen gegangen sind und uns dabei gegenseitig unterstützt haben. Caro und Theresa danke ich für die Zeit im Labor, die ohne euch sicher nur halb so lustig gewesen wäre. Bei Doreen Ziegenhardt, Alrun Schumann und Annett Müller möchte ich mich für die tolle technische Unterstützung bedanken. Weiterhin möchte ich mich bei allen Bachelor- und Masterstudierenden, die ich in den letzten Jahren betreuen durfte, bedanken. Bei allen weiteren ehemaligen Mitarbeitern der Ernährungsphysiologie und Humanernährung möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Ein weiterer Dank gilt dem TraceAge-OP-Team, vor allem unserem Kernteam (Kristina, Nici, Viki, Jessi), mit denen jeder noch so lange OP-Tag wie im Flug vergangen ist. Danke, dass ihr mich in Potsdam immer so herzlich empfangen habt.

Bei allen Co-Autoren möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit und konstruktive Kritik bedanken.

Bei meinen Eltern und Großeltern möchte ich mich für die Unterstützung während des Studiums und natürlich der Promotion bedanken. Ganz besonders bei Opi möchte ich mich zusätzlich bedanken, der mich immer motiviert hat und stets mitgefiebert hat, wann ich denn nun „endlich“ abgebe. Ich freue mich schon darauf, wenn du dein eigenes Exemplar bekommst.

Last but not least möchte ich mich bei meinem liebsten Ehemann Daniel bedanken. Danke, dass du immer für mich da bist, mich und jede meiner Launen erträgst, mich immer unterstützt und mir den Rücken frei hält. Danke, dass ich immer auf dich zählen kann und du mir bei allen Problemen technischer Natur immer gerne hilfst. Außerdem danke ich dir für deine ständige Motivation und die tolle Zeit im Home-Office und die vielen Wanderungen, um mal den Kopf freizubekommen.

Publikationsliste

1. Publikationen

Schwarz M, Lossow K, Kopp JF, Schwerdtle T, Kipp AP (2019). Crosstalk of Nrf2 with the trace elements selenium, iron, zinc, and copper, *Nutrients*, Sep 5;11(9); <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31491970/>

Hauffe R, Stein V, Chudoba C, Flore T, Rath M, Ritter K, Schell M, Wardelmann K, Deubel S, Kopp JF, **Schwarz M**, Kappert K, Blüher M, Schwerdtle T, Kipp AP, Kleinridders A (2020). GPx3 dysregulation impacts adipose tissue insulin receptor expression and sensitivity, *JCI insight*, 5 (11):e136283. doi: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.136283>

Lossow K, Kopp J, **Schwarz M**, Finke H, Winkelbeiner NL, Renko K, Meci X, Ott C, Alker W, Hackler J, Grune T, Schomburg L, Haase H, Schwerdtle T, Kipp AP (2020). Ageing affects sex- and organ-specific trace element profiles in mice, *Aging US*, 12: 13762-13790; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32620712/>

Finke H, Winkelbeiner N, Lossow K, Hertel B, Wandt VK, **Schwarz M**, Pohl G, Kopp JF, Ebert F, Kipp AP, Schwerdtle T (2020). Effects of a cumulative, suboptimal supply of multiple trace elements in mice: trace element status, genomic stability, inflammation and epigenetics, *Mol. Nutr. Food Res.*, 1:e2000325. doi: 10.1002/mnfr.202000325

Schwarz M, Lossow K, Schirl K, Hackler J, Kopp JF, Renko K, Schwerdtle T, Schomburg L, Kipp AP (2020). Copper interferes with selenoprotein synthesis and activity, *Redox Biol.*, 37: DOI: 10.1016/j.redox.2020.101746

Wolfram T, **Schwarz M**, Reuß M, Lossow K, Ost M, Klaus S, Schwerdtle T, Kipp AP (2020). N-acetylcysteine as modulator of the essential trace elements copper and zinc, *Antioxidants*, 9: DOI: 10.3390/antiox9111117

Lossow K, **Schwarz M**, Kipp AP (2021). Are trace element concentrations suitable biomarkers for the diagnosis of cancer?, *Redox Biol.*, 42: DOI: 10.1016/j.redox.2021.101900

Manuskript in Vorbereitung:

Schwarz M, Lossow K, Hackler J, Renko K, Zischka H, Schwerdtle T, Schomburg L, Kipp AP. *In preparation.*

2. Vorträge

- *Baltic redox workshop; 14th-16th September 2020; Greifswald, Germany/online conference; Schwarz M, Lossow K, Kipp AP; Copper modulates the cellular redox tone via inhibiting selenoprotein enzyme activities.*
- *20th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International; 15th-18th March 2021; online conference; Schwarz M, Lossow K, Hackler J, Kopp JF, Schomburg L, Schwerdtle T, Kipp AP; Copper-mediated changes in cellular selenium metabolism.*

3. Posterbeiträge

- *34th Annual Meeting of the German Society for Minerals and Trace Elements (GMS); 7th-9th June 2018; Jena, Germany;*
 - **Wildgrube M**, Demmler M, Lossow K, Kipp AP; *Interaction of Selenium and Copper in regulating the cellular redox status.*
- *4th meeting of the study group redox biology of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology (GBM) and International meeting of the SPP1710; 26th-28th September 2018; Berlin, Germany;*
 - **Wildgrube M**, Weber R, Demmler M, Lossow K, Kipp AP; *Interaction of Selenium with Copper or Zinc in regulating the cellular redox status.*
- *7th International Symposium of the Federation of European Societies on Trace Elements and Minerals (FESTEM) and 35th Annual GMS Meeting; 2nd-4th April 2019; Potsdam, Germany.*
 - **Schwarz M**, Lossow K, Haase H, Kipp AP; *Copper-mediated changes in selenoprotein synthesis.*
 - Wolf L, **Schwarz M**, Lossow K, Kipp AP; *Combination of trace elements copper, zinc and selenium modulate redox-sensitive transcription factor Nrf-2 in HepG2 cells.*
 - Reuss M, **Schwarz M**, Kipp AP; *Optimization of the single-element-analysis for copper by Total Reflection X-ray Fluorescence (TXRF) in cell lysates.*
- *57. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e. V. (DGE); 11.-13. März 2020; Jena, Deutschland (abgesagt, Abstractband veröffentlicht)*
 - Lossow K, **Schwarz M**, Kopp JF, Schwerdtle T, Kipp AP; *Age- and sex-dependent changes of trace elements and functional biomarkers in mice.*
 - **Schwarz M**, Lossow K, Hackler J, Schomburg L, Kipp AP; *Interactions of copper and selenium metabolism in vitro.*

- Schirl K, **Schwarz M**, Lossow K, Kopp JF, Schwerdtle T, Kipp AP; *Interactions of selenium and copper in a mouse feeding study.*
- 58. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e. V. (DGE); 17.-19. Februar 2021; digital
 - Wolfram T, Weidenbach L, **Schwarz M**, Reuss M, Ost M, Klaus S, Kipp AP; *Interplay of N-acetylcysteine with copper and zinc homeostasis.*
 - Löser A, **Schwarz M**, Kipp AP; *Specific effects of the essential trace elements copper and zinc on selenoprotein activity.*
 - Klein L, Lossow K, **Schwarz M**, Müller H, Puta C, Kipp AP; *Exercise-induced changes in serum trace element concentrations and antioxidant enzyme activities in well-trained soccer players.*

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Maria Schwarz, dass:

- mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät für Biowissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist;
- ich die vorliegende Dissertation selbst angefertigt habe und weder Textabschnitte von Dritten noch eigener Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen wurden;
- alle von mir verwendeten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen als solche kenntlich gemacht wurden;
- alle Personen, welche bei der Erstellung der Publikationen unterstützend tätig waren, als Co-Autoren aufgeführt sind;
- ich keine Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen habe und dass Dritte weder unmittelbare noch mittelbare Geldwerte oder Leistungen von mir für Arbeiten im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation erhalten haben;
- diese Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht wurde,

und dass ich weder die gleiche noch eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Universität, weder im In- noch im Ausland als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 29.04.2021