

# 1 Einleitung

## 1.1 Das chemische Element Selen

Das Element Selen wurde 1817 von *J.J. Berzelius* im Bleikammerschlamm einer Schwefelsäurefabrik (Gripsholm, Schweden) entdeckt und nach der griechischen Mondgöttin *Selene* benannt. Es kommt in Spuren neben Tellur in Kupfer-, Blei-, Zink-, Silber- und Golderzen vor. Im Periodensystem der Elemente findet man Selen in der 3. Periode der VI. Hauptgruppe, seine Ordnungszahl ist 34 und die relative Atommasse beträgt 78,96 g/mol. In seinen Verbindungen kann Selen die Oxidationszahlen -2, 0, +4, +6 annehmen. Selen ist dem Schwefel in seinen chemischen und physikalischen Eigenschaften sehr ähnlich. Es kommt ebenfalls in mehreren Modifikationen vor: einer roten, einer schwarzen und einer grauen, metallischen Form. Gegenüber dem Schwefel zeichnet sich Selen durch seine größere Atomhülle und der daraus resultierenden höheren Nukleophilie aus. Selen wird hauptsächlich aus Anodenschlämmen der Kupferraffination gewonnen. Als Halbleiter findet es in der Elektroindustrie bei der Herstellung von Gleichrichtern und Photoelementen Verwendung. In der chemischen Industrie wird es als hitze- und lichtbeständiger roter Farbstoff verwendet [1].

## 1.2 Selen in seiner Bedeutung als Spurenelement

Selen tritt über Pflanzen in die Nahrungskette ein. Da der Selengehalt im Boden regional stark variiert [2], treten Schwankungen in der Selenversorgung auf. Gebiete in Nord- und Ostasien sowie in skandinavischen Regionen sind als Selenmangelgebiete anzusehen. Dagegen gibt es in verschiedenen Gebieten Amerikas, z.B. in den Rocky Mountains, sehr selenreiche Böden. Eine tägliche Selenaufnahme von weniger als 10  $\mu\text{g}$  kann zu Mangelerscheinungen führen auf der anderen Seite sollte sie jedoch 450–500  $\mu\text{g}$  nicht überschreiten. Die *Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.* schätzt den Selenbedarf eines erwachsenen Menschen auf 30 – 70  $\mu\text{g}$  Selen pro Tag [3].

Der erste authentische Bericht über die toxische Wirkung von Selen wurde 1856 von Madison, einem amerikanischen Sanitätsoffizier, verfasst. Er berichtete von einer fatalen Erkrankung des Viehbestandes auf Weideflächen des heutigen Nebraska, der

sogenannten *Alkali Disease*. In den Jahren 1933 und 1934 konnte diese toxische Wirkung auf das Element Selen zurückgeführt werden [4, 5]. Andererseits wurden in den fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts auch Mangelerkrankungen beschrieben, die bei Viehbeständen auf selenarmen Böden auftraten (*White-Muscle Disease*). Die Tiere litten an Haarausfall, vermindertem Wachstum und Störungen der Fertilität.

Zwei endemisch auftretende Erkrankungen des Menschen, die im Nordosten Chinas auftreten und in Zusammenhang mit Selenmangel gebracht werden sind bekannt [6]. Von der Keshan-Erkrankung waren besonders junge Frauen und Kinder dieser Region betroffen. Bei mangelhafter und einseitiger Ernährung und einer zusätzlichen Infektion mit dem Cocksackie-Virus B3 (CVB3) traten gehäuft Herzmuskelentzündungen (Myokarditis) auf. Diese Myokarditis unterscheidet sich durch ihre charakteristische Histopathologie von anderen Formen [7]. In Versuchsreihen mit Mäusen wurde aus mit CVB3 infizierten, selen-defizienten Mäusen das Virus isoliert und auf selen-adäquate Mäuse übertragen. Daraufhin entwickelten diese Mäuse ebenfalls eine Myokarditis. Im viralen Genom wurden sechs Punktmutationen gefunden, die anscheinend durch den niedrigen Selenstatus des ersten Wirtes induziert worden waren [8].

Bei der Kashin-Beck Erkrankung handelt es sich um eine degenerative Gelenkentzündung (multi-fokale Chondronekrose), die im Norden Chinas, in Nordkorea sowie im östlichen Sibirien auftritt [6]. Betroffen sind Kinder im vorpubertären und pubertären Alter. Sie leiden anfänglich unter symmetrisch auftretender Steifheit, Schwellungen und Schmerzen in den Fingerknöcheln. Später weitet sich die Erkrankung auf Knie- und Ellbogengelenke sowie Fußknöchel aus [6]. Durch Selensupplementierung in einem frühen Stadium der Erkrankung konnte das Krankheitsbild deutlich gemildert werden. Ein Selenmangel wird auch durch parenterale Ernährung über längere Zeiträume erzeugt. Dies kann durch Selenzusatz vermieden werden [9].

In Studien an der amerikanischen Bevölkerung wurde durch langjähriger Versorgung mit erhöhten Dosen von Selenomethionin ein deutlichen Rückgang der Krebserkrankungen an Lunge, Dickdarm und Protata belegt [10]<sup>1</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass Se-Methylcystein und Selenbetain die potentesten Selenkomponenten zur Reduktion der Krebserkrankungen sind [10].

---

<sup>1</sup>Selenomethionin wird im Organismus schneller aufgenommen als anorganisches Selen [11], ds wird jedoch zum Teil unspezifisch an Stelle von Methionin zur Proteinsynthese genutzt [12] und erst nach dem Katabolismus des selenomethionin-haltigem Protein zur Synthese von Selenocystein und Selenoproteinen verwendet.

Im Jahr 2001 wurde die SELECT-Studie (Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial) gestartet. An 32 400 Männer über 55 Jahre soll die Auswirkung von Selen und Vitamin E auf das Risiko für Prostata-Krebserkrankungen geprüft werden. Die Teilnehmer erhalten während der folgenden 12 Jahre täglich entweder Selen, Vitamin E, eine Kombination aus beiden oder nur Placebos [13].

## 1.3 Selenocystein – die 21. Aminosäure

Seit Mitte der 60er Jahre herrschte in der Molekularbiologie die Vorstellung, dass von 64 möglichen Basen-Tripletts 61 Kombinationen für insgesamt 20 Aminosäuren codieren (Sinn-Codon) und 3 Basen-Tripletts die Termination der Translation bewirken (Stop-Codon). Die Aufklärung der genetischen Codierung von Selenocystein durch das Stop-Codon TGA [14] und die Identifizierung der spezifischen tRNA<sup>[ser]<sup>sec</sup></sup> [15, 16], führten zur Erweiterung des bis dahin geltenden genetischen Codes. Selenocystein wird als 21. proteinogene Aminosäure<sup>2</sup> bezeichnet [19, 20]. Im Vergleich zur Thiolgruppe des Cysteins weist die Selenolgruppe des Selenocysteins einen geringeren pKa-Wert (pKa 5.2) auf und hat damit eine höhere Reaktivität [21].

Im Jahr 1957 zeigten Schwarz und Foltz, dass ein Selenzusatz zum Vitamin E-Mangelfutter bei Ratten die Entstehung von Leber-Nekrosen verhindern kann [22]. Weitere Hinweise auf die grundlegende metabolische Bedeutung von Selen gaben Erkenntnisse aus der Kultivierung von Zellen. Ein optimales Wachstum von fötalen, humanen Fibroblasten wurde bei einem Zusatz von 5 % (v/v) FCS oder von 30 nM Natriumselenit beobachtet [23]. Die Essentialität des Selenocysteins wird auch durch den homozygoten Knock-out des Gens für die tRNA<sup>[ser]<sup>sec</sup></sup> unterstrichen, der schon während der Einnistung der Blastozyste zum Tod des Embryos führte [24].

Von zwei verschiedenen Gruppen wurde 1973 gezeigt, dass Selen integraler Bestandteil des antioxidativ wirkenden Enzyms Glutathion-Peroxidase ist [25, 26]. Durch Sequenz-Vergleiche der Aminosäuren mit der Nukleotidfolge der cDNA von GPx konnten Chambers und Mitarbeiter 1986 die genetische Codierung von Selenocystein durch das Codon TGA belegen [14]. In dem selben Jahr wurde auch für *E. coli* die genetische Codierung durch das Codon TGA gezeigt [27]. Von Böck und Mitarbeitern wurde 1987 der co-translationale Einbau von Selenocystein für *E. coli* eindeutig bewiesen [28]. In den folgenden Jahren bis 1991 konnte von dieser Gruppe der gesamte

---

<sup>2</sup>Seit 1998 ist auch die 22. proteinogene Aminosäure Pyrrolysin (Derivat des Lysins) bekannt, die in Methyltransferasen der Archaeobakterien gefunden wurde und durch TAG codiert wird [17, 18].

Weg des Selenocystein–Einbaus einschließlich der Identität der benötigten Faktoren aufgeklärt werden [20]. Sie identifizierten vier Genprodukte SELA [29], SELB [30,31], SELC [32] und SELD [33], die für den Einbau der Aminosäure Selenocystein essentiell sind. Außerdem wurden von dieser Gruppe 1990 erste Hinweise auf eine Sekundärstruktur geliefert. Sie fanden im Gen der Formiat–Dehydrogenase aus *E. coli* durch computergestützte Analyse einen 40 Nukleotide langen Sequenzabschnitt, der unmittelbar *downstream* vom UGA lag und sich zu einer Haarnadelstruktur falten kann [34]. In Eukaryoten fand erstmals Berry und Mitarbeiter 1991 eine ähnliche Sequenz in der mRNA der Deiodase–Typ I [35]. Anders als in Prokaryoten, bei denen das SECIS–Element im offenen Leserahmen (ORF) des Selenoproteins liegt, befindet es sich in Eukaryoten 500 bis 2 000 Nukleotide entfernt *downstream*, in der 3′-untranslatierten Region (3′-UTR) der mRNA [35]. Da dieses Sequenzmotiv in der mRNA von Selenoproteinen anscheinend notwendig für die Decodierung von UGA in Selenocystein war, wurde es als SECIS–Element (Selenocysteine Insertion Sequence–Element) bezeichnet [35].

### 1.3.1 Biosynthese und Einbau von Selenocystein

In Prokaryoten wird die spezifische  $tRNA^{[ser]sec}$  (SELC) unter Katalyse der Seryl-tRNA-Synthetase zunächst mit einem Serylrest beladen. Unter der katalytischen Wirkung von Selenocystein–Synthase (SELA) wird anschließend vom Serylrest ein Molekül Wasser abgespalten. Das erhaltene Aminoacrylyl-Intermediat reagiert mit aktiviertem Selen (Selenophosphat) zum Selenocysteyl. Das dazu erforderliche Selenophosphat wird von der Selenophosphat–Synthetase (SELD) aus Selenid unter ATP–Verbrauch synthetisiert [20]. Der Selenocystein-spezifische Elogationsfaktor (SELB) bindet dann an die Selenocysteyl-tRNA<sup>[ser]sec</sup> und dirigiert sie an das SECIS–Element. Die mit Selenocystein beladene  $tRNA^{[ser]sec}$  tritt in die ribosomale A-Seite und Selenocystein kann in die wachsende Polypeptidkette eingebaut werden. Interessanterweise ist die Selenophosphat–Synthetase selbst ein Selenoprotein, daher wird an dieser Stelle der Biosynthese eine autokatalytische Regulation vermutet [36].

Die Identifizierung und Charakterisierung der beteiligten Komponenten bei der Biosynthese von Selenoproteinen in Eukaryoten erforderte eine längere Zeitspanne der Forschung, die letzte Komponente die Phosphoseryl-tRNA<sup>[ser]sec</sup>–Kinase (PSTK) wurde erst 2004 publiziert. Neben einem selenocysteinspezifischen Elongationsfaktor (eEFsec), der die Selenocysteyl-tRNA<sup>[ser]sec</sup> erkennt, wurde ein SECIS-bindendes Protein (SBP2) gefunden. Dieses Protein bindet mit unterscheidbaren N-terminalen

Domainen an die 28S rRNA des Ribosoms, an eEFsec und an konservierte Nukleotide des SECIS-Elements [37–39]. Diskutiert wird auch eine direkte Beteiligung des SBP2 an der Auswahl des Ribosoms zur Translation der Selenoprotein-mRNA [40]. Die Phosphoseryl-tRNA<sup>[ser]sec</sup>-Kinase (PSTK) konnte durch kombinierte Datenbanksuche, Klonierung und Expression in Gegenwart von <sup>75</sup>Se gefunden werden [41]. Auch erst kürzlich eindeutig belegt wurde die Unterteilung der Selenophosphat-Synthetasen (SPS) in zwei Gruppen, die Selenophosphat aus verschiedenen Quellen synthetisieren. Die SPS 2 synthetisiert Selenocystein mit anorganischem Selen und die SPS 1 verwendet Selen aus organischen Selenquellen (Selenocystein, Selenomethionin u.ä.) [42]. Mit dieser Erkenntnis erscheint auch die schon länger bekannte Funktion der Selenocystein- $\beta$ -Lyase [43, 44] als unmittelbarer Zuarbeiter für die enzymatische Reaktion der SPS1 wahrscheinlich.

Die eukaryotischen SECIS-Elemente bestehen aus zwei Helices, die durch einen inneren Loop getrennt sind. Der Helix 2 sitzt ein apikaler Loop auf [45]. Durch die Mutagenese einzelner Nukleotide innerhalb des SECIS konnten die wenigen konservierten Nukleotide identifiziert werden [46, 47]. Als konservierte Bereiche wurden zum einen zwei aufeinanderfolgende Adenosylreste im apikalen Loop sowie das sogenannte Quartett am Fuß der zweiten Helix 5'-U-G-A-...-A-G-3' erkannt [48]. Im letzteren sind die nicht-Watson-Crick gepaarten Basen 5'-G-A-...-A-G-3' mit ihren sterischen Eigenheiten essentiell für die Bindung des SBP2 [45].

An dieser Stelle sollen auch die Besonderheiten der spezifischen tRNA<sup>[ser]sec</sup> in Säugern genannt werden. Sie ist mit 90 Nukleotiden länger als andere tRNAs. Ihr Akzeptor-Arm ist um ein Nukleotid länger und sie hat eine untypisch große variable Schleife. Die tRNA<sup>[ser]sec</sup> enthält nur vier modifizierte Nukleotide: 6-N-Isopentenyladenosin (Nt 37), Pseudouridin (Nt 55), 1-Methyladenosin (Nt 58) und 5-Methylcarboxymethyluridin (Nt 34) [15, 49]. Das Nukleotid in Position 37 ist häufig in tRNAs, deren Anticodon in Gegenposition zum Nt 34 ein Uracylrest aufweisen, durch eine hydrophobe Gruppe (hier Isopenten) modifiziert. Durch diese Modifizierung werden die Codon-Anticodon Wechselwirkungen stabilisiert [50, 51]. Die Notwendigkeit dieser und der anderen drei Modifikationen für die Funktion der tRNA<sup>[ser]sec</sup> wurde durch experimentelle Mutagenesen belegt [50, 52]. Innerhalb der tRNA<sup>[ser]sec</sup>-Population können zwei Isoformen unterschieden werden, die sich durch eine zusätzliche Methylgruppe (2'-O-Methylierung der Ribose) an dem schon modifizierten Nt 34 unterscheiden. Diese Methylierung scheint der letzte Schritt in der Reifung der tRNA<sup>[ser]sec</sup> zu sein [53]. Ihr Anteil an der Gesamtpopulation wird durch Selenzusatz erhöht [54].

## 1 Einleitung

Dieser Zusammenhang wird durch aktuelle Ergebnisse unterstrichen, in denen die Inhibition der Methylierung an Nt 34 der tRNA<sup>[ser]<sup>sec</sup></sup> erniedrigte Expressionsraten derjenigen Selenoproteine zur Folge hatte, die auch bei Selenmangel betroffen waren [55]. Nach der gegenwärtigen Vorstellung der Biosynthese von Selenoproteinen in Säugern wird nach der Beladung der tRNA<sup>[ser]<sup>sec</sup></sup> mit einem Serylrest dieser unter der katalytischen Wirkung von PSTK mit aktiviertem Selen (Selenophosphat) zu Selenocysteyl-tRNA<sup>[ser]<sup>sec</sup></sup> umgewandelt. Die so beladene tRNA wird vom Elongationsfaktor eEFsec erkannt und tritt mit dem SBP/SECIS-Komplex zum quarternären Komplex zusammen [40, 49]. In der folgenden Abbildung 1.1 ist der vermutete Mechanismus des eukaryotischen Einbaus vom Selenocystein schematisch dargestellt.

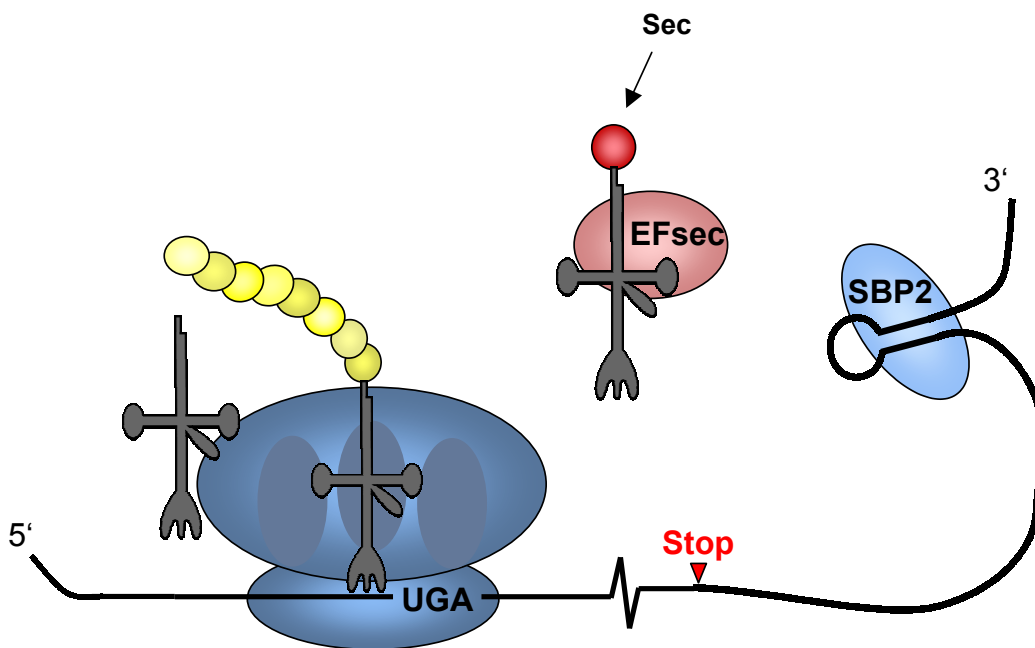


ABBILDUNG 1.1: Schematische Darstellung des Mechanismus des Selenocysteineinbaus in Eukaryoten. Die Selenocysteyl-tRNA<sup>[ser]<sup>sec</sup></sup> wird vom spezifischen Elongationsfaktor eEFsec erkannt und gebunden. Die beladene tRNA<sup>[ser]<sup>sec</sup></sup> tritt in die ribosomale A-Site und Selenocystein (Sec) kann in die wachsende Polypeptidkette eingebaut werden.

Die Translation von Selenoproteinen ist ein uneffektiver Prozess, d.h. die Elongation konkurriert mit ihrer Termination [56, 57]. Diese Ineffizienz der Selenoproteintranslation wurde erstmals 1992 durch vergleichenden Untersuchungen an Cysteinmutanten nachgewiesen [58], die mit einer bis zu zwei Größenordnungen höheren Effizienz Cystein einbauen. Bisher deuten Untersuchungen darauf hin, dass es beim Eintritt des UGA(Sec) in die ribosomale A-Site eine Verzögerung in der Elongation gibt, die zur Termination führen kann [40, 56, 57, 59]. Die unterschiedlichen SECIS-Elemente

der Selenoproteine bewirken unterschiedliche Effizienzen der Translation [35, 60], die sich zusätzlich in verschiedenen Gewebe-Zellen unterscheiden [58, 60, 61]. Noch sind die molekularen Ursachen der unterschiedlichen Effizienzen unklar. Nach eventuellen Faktoren, die die Translationseffizienzen eines Selenoproteins bestimmen, wird intensiv gesucht.

## 1.4 Selenoproteine

Als Selenoproteine werden nur solche selenhaltigen Proteine bezeichnet, die infolge eines UGA-Codons co-translational Selenocystein einbauen. Proteine, die unspezifisch Selen in Form von Selenocystein oder Selenomethionin enthalten, werden dagegen als selenhaltige Proteine bezeichnet [62]. Fast alle bisher identifizierten Selenoproteine enthalten pro Polypeptidkette einen Selenocysteinrest. Die einzige Ausnahme bildet das Selenoprotein P, das beim Menschen 10 [63], beim Rind 12 [64] und beim Zebrafisch 17 Selenocysteinreste pro Polypeptidkette aufweist [65, 66].

An dieser Stelle soll ein Überblick zu der Entdeckung der verschiedenen Selenoproteine sowie der neueren Entwicklung auf diesem Forschungsgebiet gegeben werden. Der Entdeckung des kovalent gebundenen Selens in der Glutathion-Peroxidase gingen viele Hinweise voraus, die auf einen Zusammenhang der Oxidation von Hämoglobin, der reduzierenden Wirkung von Glutathion (GSH) und der Notwendigkeit von Selen während dieses Prozesses hindeuteten. Im Jahr 1973 konnte durch zwei unterschiedliche experimentelle Methoden belegt werden, dass Glutathion-Peroxidase kovalent gebundenes Selen enthält und dabei ein stöchiometrischen Verhältnis eingehalten wird [25, 26]. Nach der Sequenzierung eines 16 Aminosäuren langen Peptidfragments der Glutathion-Peroxidase (GPx) aus Ratten-Leber 1982 [67], gelang 1984 die erste vollständige Sequenzierung der GPx aus Rinder-Erythrocyten [68]. Heute sind vier Isoformen der GPx (GPx1 - GPx4) bekannt [69]. Gemeinsamkeit aller GPx sind ihre katalytischen Triaden aus Selenocystein, Glutamin und Tryptophan [70]. Unter der katalytischen Wirkung der GPx werden Peroxide mit Hilfe von Glutathion zu entsprechenden Alkoholen umgesetzt. Das dabei oxidierte Glutathion wird in einer nachfolgenden enzymatischen Reaktion durch Glutathion-Reduktase regeneriert. Die mRNA-Menge der cytosolischen GPx (GPx1) wird durch Selenmangel am stärksten von allen Selenoproteinen reduziert [60, 71]. Wegen der Position des UGA-Codons im ersten Exon der GPx1 wird eine Regulation durch eine Form des nonsense-mediated-decay (NMD) diskutiert [71, 72].

Die GPx2 wird in der Ratte und dem Menschen im gastrointestinalen Trakt exprimiert [73], daher wird eine Schutzfunktion der GPx2 vor oxidativ induzierten Darm-erkrankungen vermutet. Interessante Ergebnisse lieferten Experimente an HepG2- und Caco-2-Zellen, in denen die Stabilität der mRNA und die Expressionen von GPx1, GPx2 und GPx4 in Abhängigkeit von den Selenkonzentrationen untersucht wurden [61]. Demnach scheint die GPx2 die stabilere mRNA und auch stabilere Translationsraten als GPx1 und GPx3 zu haben. Die im Plasma enthaltene GPx3 wird hauptsächlich in den Epithelzellen der proximalen Tubuli der Niere exprimiert und in das Plasma sezerniert [74, 75]. Bisher konnte nicht eindeutig geklärt werden, welcher Elektronendonator GPx3 mit Reduktionsäquivalenten beliefert, da die Konzentration des reduzierten Glutathion im Plasma weit unter dem  $K_m$ -Wert des Enzyms liegt. Untersuchungen weisen darauf hin, dass im extrazellulären Raum Thioredoxin und Glutaredoxin die Reduktionsäquivalente liefern könnten [76]. Die monomere GPx4 wurde erstmals 1982 aus Schweineleber aufgereinigt [77] und 1994 vollständig sequenziert [78], sie kann als einzige GPx Phospholipid-Hydroperoxide und Cholesterole als Substrate verwenden. Dieses Selenoenzym wird in allen Geweben exprimiert, am stärksten jedoch im Hoden und zwar erst nach dem Einsetzen der Pubertät [79, 80]. Die in reifen Spermien gefundene cytosolische und mitochondriale GPx4 [81] sowie die nukleäre Form snGPx [82], sind Proteine von einem Gen, das zwei alternative Promotoren aufweist und wahrscheinlich durch Hormone angeschaltet wird [83–85]. Die Erkenntnis, dass die PHGPx während der Spermienreifung in ihrer enzymatischen Aktivität abnimmt, führte zu dem Schluss, dass sie im reifen Spermium ein wichtiges strukturgebendes Element ist [84].

Das extrazelluläre, glycosylierte Selenoprotein P wird hauptsächlich in der Leber exprimiert und über das Blut an alle Gewebe verteilt [86–89]. Vergleiche seiner cDNA mit der anderer Selenoproteine in der Ratte zeigten, dass sie 10 TGA-Codons enthält. Davon liegt ein TGA-Codon im N-terminalen und neun TGA-Codons im C-terminalen Bereich der Nukleotidsequenz [63]. In dem 3'-UTR des Selenoprotein P wurden zwei Haarnadelstrukturen gefunden [63, 90]. Der größere Teil des Selens im Plasma ist im Selenoprotein P gebunden (ca. 60%), die übrige Menge ist in GPx-3 enthalten oder an Albumin assoziiert [91]. Viele Arbeiten deuten auf eine Transportfunktion des Selenoproteins P hin [63, 86, 89, 92–94], gleichzeitig scheint es auch über eine Peroxidaseaktivität zu verfügen [92]. Außerdem weist es histidin- und lysin-reiche Domänen auf, die an Heparin binden [87, 93]. Interessante Ergebnisse von Takahashi und Mitarbeitern weisen auf eine mögliche proteolytische Spaltung durch Plasma-Kallikrein hin, die ein N-terminales Fragment mit einem Selenocystein-Rest und ein C-terminales Fragment mit neun Selenocystein-Resten sowie ein Hexapeptid freisetzt [95].



Im Jahr 1990 wurde von Behne und Mitarbeitern durch in vivo Markierung mit  $^{75}\text{Se}$  ein weiteres Selenoprotein identifiziert [96]. Es handelte sich hierbei um die schon bekannte Deiodase Typ I. Die Deiodase Typ I (D1) ist ein membran-assoziiertes Protein des endoplasmatischen Retikulums (ER) und der Plasmamembran [97, 98], ihr cytosolischer C-Terminus trägt die enzymatische Aktivität [99]. Sie benötigt für ihre Aktivität einen bisher noch nicht identifizierten thiolhaltigen Cofaktor [98, 100–102]. Der Hauptanteil des im Plasma zirkulierenden aktiven Schilddrüsenhormons T3 ist auf die enzymatische Aktivität von D1 zurückzuführen [103, 104]. Die Deiodase-Typ II (D2) ist ebenfalls ein membran-assoziiertes Protein, das wahrscheinlich nur im ER enthalten ist [97, 104]. Sie wird in den Zielgeweben des Prohormons T4 exprimiert und ist für die lokale Umwandlung in T3 und nur in geringem Umfang für die Erzeugung des zirkulierenden T3 verantwortlich [104]. Die Deiodase Typ III (D3) schützt das Gewebe vor einem Überschuss an T4 bzw. T3 indem sie die Schilddrüsenhormone inaktiviert [102]. Die Expressionen der D2 und D3 haben entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung des Gehirns [105, 106]. Ein starker Mangel an Schilddrüsenhormonen während der perinatalen Entwicklung führt zur Ausbildung des Kretinismus [106].

Die Thioredoxin-Reduktasen (TrxR) kommen in drei Isoformen (TrxR1–TrxR3) vor. Sie gehören zur Familie der FAD-haltigen Pyridin-Nukleotid-Oxidoreduktasen [107]. Das Enzym war schon seit den sechziger Jahren bekannt [108, 109], als es 1996 als Selenoprotein erkannt wurde, dessen vorletzte Aminosäure ein Selenocystein ist [110, 111]. Sein flexibler C-Terminus, der in allen Säugern die konservierte Sequenz Gly-Cys-Sec-Gly aufweist, überträgt die von NADPH erhaltenen Reduktionsäquivalente auf die redox-aktiven Disulfidreste der Substrate [107, 112]. Durch die Reduktion von Thioredoxin (Trx), das eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung des intrazellulären Redox-Gleichgewichtes einnimmt [113], hat TrxR einen entscheidenden Einfluss auf die Synthese von Desoxyribonukleotiden und auf wichtige redoxregulierte Prozesse, z.B. die Genexpression und die Signaltransduktion [107, 114]. Bisher wurden drei verschiedene TrxR1-Genprodukte gefunden, die durch alternatives Spleißen aus einer prä-mRNA hervorgehen (TrxR1 I-III), und alle cytosolisch lokalisiert sind [115]. Auch von TrxR3 gibt es drei Spleißformen. Eine davon trägt eine Leader-Sequenz für Mitochondrien [115]. Eine dritte Isoform der TrxR wird als Thioredoxin-Glutaredoxin-Reduktase (TGR) bezeichnet. Sie wird stark in den Hoden und den Spermien exprimiert [116].

## 1 Einleitung

Die Selenophosphat-Synthetase 2 (SPS2) katalysiert die Reaktion von Selen und dem  $\gamma$ -Phosphat aus ATP und könnte daher eine Schaltstelle zur Regulation der Selenoprotein-Synthese sein [33]. Das Selenoprotein W verursacht die als “White-Muscle Disease” (Verkalkung der Muskulatur) bekannte Erkrankung von Weidetieren auf selenarmen Böden [117, 118]. Interessant ist, dass die Expressionsrate dieses Proteins linear mit der Selenaufnahme ansteigt [118]. Ein Selenoprotein von 15 kDa wurde im Prostataepithel gefunden, es weist einen IP-Wert von ca. 4.5 auf [119] und hat eine native Molekularmasse von 200 – 240 kDa [120]. Von diesem Protein ist bisher bekannt, dass es in vielen Geweben einschließlich des Gehirns exprimiert wird [121]. Das 18 kDa-Selenoprotein wurde in Markierungsversuchen mit  $^{75}\text{Se}$  als Membranprotein der Mitochondrienmembranen gefunden [122]. Zu den in neuerer Zeit identifizierten Selenoproteinen zählt die Methionin-Sulfoxid-Reduktase B (MsrB = Selenoprotein R), die ebenfalls Trx als Cofaktor verwendet [123–125]. Sie reduziert die R-Stereoisomere der freien und der proteingebundenen oxidierten Methioninreste. Dieses Enzym und die MsrA, welches die S-Stereoisomere der oxidierten Methioninreste reduziert, sind an der Wiederherstellung der durch Oxidation inaktivierten Proteine beteiligt [126]. Das Selenoprotein N ist das einzige bisher bekannte Selenoprotein, dessen Mutationen eine Form der Muskel-Dystrophie auslösen [127, 128].

Im Jahr 1999 wurden von zwei Gruppen erstmalig Algorithmen publiziert, die Selenoproteine aus Datenbanken herausfiltern können (in silico-Identifizierung). Dabei wird nach konservierten Nukleotiden der SECIS-Elemente gesucht [128, 129]. Die Erweiterung des Algorithmus durch eine zweite Form von SECIS-Elementen in SelM (CC statt AA im apikalen Loop) [130] führte zu Identifizierungen von weiteren Selenoproteinen [65]. Insgesamt wurden 25 humane bzw. 24 murine Gene, die für Selenoproteine codieren, gefunden<sup>3</sup>. Neben den bereits bekannten Selenoproteinen konnten in silico die folgenden identifiziert werden: Selenoprotein M, Selenoprotein T, Selenoprotein V, Selenoprotein H, Selenoprotein K, Selenoprotein S, Selenoprotein I und Selenoprotein O [65].

In der nachfolgenden Tabelle 1.1 sind die bekannten Selenoproteine, ihre Molekularmassen, ihr Expressionsorte und ihre Funktionen aufgelistet.

---

<sup>3</sup>Im murinen Organismus ist Glutathion-Peroxidase 6 (GPx6) kein Selenoprotein

**Glutathion-Peroxidasen (GPx)**

Cytosolische GPx (GPx1)	Tetramer aus identischen 22 – 23 kDa-UE	ubiquitär exprimiert	katalysiert Reduktion von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und org. Peroxiden (außer Phospholipidperoxiden)
Gastrointestinale GPx (GPx2)	Tetramer aus identischen 23 kDa-UE	in Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes	katalysiert Reduktion von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und org. Peroxiden
Plasma GPx (GPx3)	Tetramer aus identischen 23 – 25 kDa-UE, glykosyliert, extrazellulär	ubiquitär, hoch exprimiert in Epithelzellen der Niere	katalysiert Reduktion von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und org. Peroxiden (außer Phospholipidperoxiden)
Phospholipid-Hydroperoxid GPx (GPx4)	monomeres 20 kDa Protein, membrangebunden und auch cytosolisch lokalisiert	ubiquitär exprimiert	katalysiert bevorzugt Reduktion von Phospholipidperoxide u.a. Peroxiden
spermienspezifische GPx (snGPx)	34 kDa	in Spermienkernen	katalysiert Reduktion von Peroxiden

**Deiodasen**

Typ I Deiodase (D1)	27 kDa	in Leber, Niere, Schilddrüse, Hypophyse, Herz	katalysiert die 5'-Deiodierung des T4 sowie die 5-Deiodierung von T4 (Inaktivierung) und rT3
Typ II Deiodase (D2)	29 kDa	in Hypophyse, ZNS, Haut, Brauem Fettgewebe, Plazenta	katalysiert die 5'-Deiodierung des Hormons T4 zu T3
Typ III Deiodase (D3)	32 kDa	in Plazenta, Haut, ZNS	katalysiert die 5-Deiodierung des T4 und T3 (Inaktivierung)

**Thioredoxin-Reduktase (TrxR)**

Cytosolische TrxR (TrxR1)	Dimer aus identischen 55 kDa-UE, enthält ein FAD-Molekül pro UE	ubiquitär exprimiert	breite Substratspezifität, liefert Thioredoxin für Ribonukleotid-Reduktase, Komponente des Thioredoxin-Systems
Mitochondriale TrxR (TrxR3)	Dimer aus identischen 53 kDa-UE, enthält ein FAD-Molekül pro UE	in Niere, Leber, Herz, Nebenniere	liefert Thioredoxin für Ribonukleotid-Reduktase, Komponente des Thioredoxin Systems
spermienspezifische TrxR (TGR)	64 kDa-UE	hoch exprimiert in Hoden	breite Substratspezifität liefert Thioredoxin für Ribonukleotid-Reduktase, Komponente des Thioredoxin Systems, an Chromatinkondensation beteiligt
<b>Methionin-Sulfoxid Reduktase B1 (SelR/SelX oder MsrB1)</b>	12 kDa-UE, cytosolisch und nucleär lokalisiert	ubiquitär exprimiert	katalysiert Reduktion des R-Stereoisomers von freien und protein gebundenen Methioninsulfoxiden
<b>Selenoprotein P (SelP)</b>	43 kDa, glykosyliert, enthält 10 Selenocysteine	ubiquitär, hoch exprimiert in Leber, die es ins Plasma sezerniert	Transportfunktion und/oder Redoxaktivität
<b>Selenophosphat-Synthase 2 (SPS2)</b>	50 kDa, homolog zu SPS 1 der Prokaryoten	ubiquitär, hoch exprimiert in Leber und Hoden	katalysiert Synthese von Selenophosphat
<b>Selenoprotein W (SelW)</b>	10 kDa	in Muskel und Gehirn	bindet Glutathion, genaue Funktion nicht geklärt

## 1 Einleitung

<b>18 kDa-Selenoprotein</b>	18 kDa, Membranprotein des Mitochondrium	ubiquitär exprimiert	unbekannte Funktion
<b>15 kDa-Selenoprotein</b>	15 kDa	in Prostata, Schilddrüse, Gehirn	unbekannte Funktion, Hinweise auf redoxkatalytische Aktivität
<b>neutrales 15 kDa-Selenoprotein</b>	15 kDa	in Gehirn	unbekannte Funktion
<b>Selenoprotein N (Sel N)</b>	70 kDa, Transmembranprotein des SR bzw.ER, glykosyliert	ubiquitär, hoch exprimiert in Skelettmuskel, Leber, Gehirn, Herz	Mutation im SelN1-Gen verursacht eine autosomal-rezessive Myopathie, genaue Funktion nicht geklärt
<b>Selenoprotein M (Sel M)</b>	16 kDa, trägt Signalsequenz, an perinucleären Membranen assoziiert	ubiquitär, hoch exprimiert im Gehirn	unbekannte Funktion
<b>Selenoprotein T (Sel T)</b>	19 kDa, Transmembranprotein	unbekannt	unbekannte Funktion
<b>Selenoprotein V (Sel V)</b>	34,6 kDa C-Terminus zeigt Homologien zu SelW	unbekannt	unbekannte Funktion
<b>Selenoprotein H (Sel H)</b>	13 kDa trägt Redox-Motiv Cys-Xxx-Xxx-Sec	unbekannt	unbekannte Funktion
<b>Selenoprotein K (Sel K)</b>	9 kDa Transmembranprotein	unbekannt	unbekannte Funktion
<b>Selenoprotein S (Sel S)</b>	21 kDa	unbekannt	unbekannte Funktion
<b>Selenoprotein I (Sel I)</b>	45 kDa Transmembranprotein	unbekannt	unbekannte Funktion
<b>Selenoprotein O (Sel O)</b>	73 kDa	unbekannt	unbekannte Funktion

TABELLE 1.1: Tabelle der bisher bekannten Selenoproteine und der in-silico identifizierten Selenoproteine

Schon 1984 wurde von Behne und Mitarbeitern durch elementanalytische Messungen bei den Selengehalten in Geweben der Ratten eine gewebespezifische Verteilung des Elements gefunden [131]. Die höchsten Selengehalte pro Trockenmasse wurden in Hoden, Niere und Plasma gemessen, dagegen war der Selengehalt in Muskel, Gehirn und Haaren relativ gering [132]. Beobachtet wurde auch, dass beim Einsetzen eines Selenmangels die Selengehalte am stärksten in Leber, Plasma und Erythrocyten [131] sanken, während in Gehirn, Hypophyse, Schilddrüse und Hoden das Selen anscheinend zurückgehalten wurde [63, 133].

## 1.5 Neuroanatomie

Das zentrale Nervensystem (ZNS) erfüllt die Funktion eines Koordinationsorgans, das die Funktionen untergeordneter Zentren steuert und aufeinander abstimmt. Es nimmt über Afferenzen Informationen aus der Umwelt auf, verrechnet und koordiniert sie und leitet sie anschließend über Efferenzen an die Erfolgsorgane. Die Kommunikation erfolgt dabei über nervöse (elektrochemische) sowie humorale (Neurosekretion) Bahnen. Das Gehirn ist Zentrum für Assoziation, Instinkt, Gedächtnis, Lernen, Intelligenz und Bewusstsein. Das ZNS der Wirbeltiere besteht aus dem Gehirn und dem Rückenmark. Beide gehen aus einer gemeinsamen embryonalen Anlage, dem Neuroektoderm, hervor und sind funktionell und anatomisch miteinander verbunden.

Das ZNS liegt, geschützt von den Knochen des Schädels (Kranium) und der Wirbelsäule, umhüllt von drei verschiedenen Hirn – und Rückenmarkshäuten (Meningen) in einem Flüssigkeitskissen aus Zerebrospinalflüssigkeit. Der Raum zwischen der dem Gehirn direkt aufliegenden weichen Hirnhaut (Pia mater) und der mittleren Hirnhaut (Arachnoidea) ist mit Zerebrospinalflüssigkeit gefüllt [134]. Dieser Subarachnoidalraum steht mit den vier untereinander verbundenen Hirnventrikeln und dem Zentralkanal des Rückenmarks in Verbindung. Die beiden weichen Hirnhäute Pia mater und Arachnoidea sind durch einen kapillären Spalt, den Subduralraum, von der äußeren harten Hirnhaut (Dura mater) getrennt. Die Zerebrospinalflüssigkeit wird von dem stark durchbluteten Adergeflecht (Choroid Plexus) ständig neu produziert und spiegelt im wesentlichen die Zusammensetzung der extrazellulären Flüssigkeit des Hirngewebes wider. Die Ventrikelwände sowie die Wandung des Zentralkanals sind von Ependymzellen ausgekleidet, die funktionell und morphologisch keine einheitliche Zellpopulation bilden. Das Gehirn wird von zwei jeweils paarig angelegten, extrakraniellen Arterien mit Blut versorgt: der Arterie caroties und der Arterie vertebralis. Die Versorgungsgebiete dieser insgesamt vier Arterien sind intrakraniell an der Schädelbasis durch einen großen Anastomosenkreis (Circulus arteriosus cerebri) miteinander verbunden. Dieser sichert bei Versorgungsknappheit die Durchblutung des Hirngewebes. Im Unterschied zu anderen inneren Organen verteilen sich die versorgenden Arterien sowie die Venen des Gehirns auf seiner Oberfläche einschließlich seiner Furchen, um dann zentripetal ins Gewebe einzudringen. Innerhalb des Hirngewebes ist das Kapillarnetz in der grauen Substanz extrem dicht und in der weißen Substanz weitmaschiger angelegt.

Makroskopisch läßt sich das Gehirn der Wirbeltiere in drei Strukturen unterteilen: das Großhirn, das Kleinhirn und der Hirnstamm. Diese sollen im Folgenden kurz beschrieben werden.

### 1.5.1 Großhirn

Das Großhirn (Telencephalon) wird über seine gesamte Länge von der großen Furche (Fissura longitudinalis cerebri) in zwei Hemisphären getrennt. Sie sind nur durch den Fasertrakt des Balkens (Corpus callosum) miteinander verbunden. Die Großhirnrinde (Cortex) besteht aus einer Schicht von grauer Substanz, sie enthält die Zellkörper der Nervenzellen, in der darunterliegenden weißen Substanz (Marklager) verlaufen zahlreiche Axone in andere Hirnbereiche. Die Einteilung der Großhirnrinde kann nach phylogenetischen, histologischen oder nach strukturellen Gesichtspunkten getroffen werden. An dieser Stelle soll nur die charakteristische Cytoarchitektur der Großhirnrinde beschrieben werden. Die Zellkörper kortikaler Neuronen sind parallel zur Oberfläche angeordnet, es können morphologisch sechs Schichten (I-VI) unterschieden werden. Nur in Schicht V, der Pyramidenzellschicht, finden sich große Pyramidenzellen, die ihre verzweigten apikalen Dendriten weit in die oberen Schichten schicken [135]. Ihre Axone bilden den Hauptteil der kortikalen Efferenzen (Pyramidenbahnen) und laufen zu tiefer gelegenen Zentren wie beispielsweise den Basalganglien, dem Hirnstamm und dem Rückenmark. Im Marklager des Großhirns liegen die Basalganglien, die dem motorischen Zentren zugerechnet werden. Als bogenförmige Struktur um den Balken liegt das sogenannte limbische System, hierzu werden die funktionell zusammengehörenden Strukturen Hippocampus, Gyrus cinguli, Amygdala und Mamillarkörper gezählt [135,136]. Sie beeinflussen emotionale und vegetative Funktionen und indirekt die kognitiven Leistungen. Bei der groben makroskopischen Gliederung des Gehirns in Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm wird auch das Zwischenhirn (Diencephalon) mit dem Thalamus und dem Hypothalamus zum Großhirn gerechnet. Die Kernkomplexe des Hypothalamus beeinflussen wichtige vegetative Vorgänge wie z.B. Körpertemperatur, neuroendokrine Funktionen und die zirkadianen Rhythmen [136].

### 1.5.2 Kleinhirn

Das Kleinhirn (Cerebellum) ist das wichtigste Integrationszentrum für das Erlernen, die Koordination und die Feinabstimmung von Bewegungsabläufen, die in enger Kooperation mit dem motorischen Cortex und den Kernen des Hirnstamms erarbeitet werden. Es ist über drei Kleinhirnstiele, in denen seine Afferenzen und Efferenzen verlaufen, mit dem Hirnstamm verbunden. Die Oberfläche des Kleinhirns von höheren Säugern zeigt regelmäßig querverlaufende, feine Falten. An seine Unterseite grenzt das Dach des VI Hirnventrikels an. Die graue Substanz des Kleinhirns befindet sich in der oberflächlich gelegenen Kleinhirnrinde und in den vier Kleinhirnkernen. Die Afferenzen und Efferenzen ziehen durch die Kleinhirnstiele. Die in der Kleinhirnrinde

vorkommenden Neuronen grenzen sich durch ihre Morphologie und Funktionsweise von denen des Großhirns ab, ihr Verschaltungsmuster folgt einer strengen Geometrie [136]. Drei Schichten können in der Kleinhirnrinde unterschieden werden: eine äußere Molekularschicht, eine Purkinjezellschicht und eine Körnerzellschicht. In der regelmäßigen Anordnung stellen die großen Purkinjezellen die Grundeinheit dar, ihre stark verzweigten Dendriten ragen in die Molekularschicht. Signale erhalten die Purkinjezellen von den Körnerzellen aus der inneren Schicht, deren axonale Fortsätze in die äußere Schicht ziehen, sich dort gabeln und parallel zu den Falten des Kleinhirns als Parallelfasern einige Millimeter weit verlaufen. Sie innervieren dabei mehrere hundert Dendritenbäume von Purkinjezellen und wirken erregend auf diese. Die eingehenden Signale von den Parallelfasern werden mit weiteren Signalen der Moosfasern aus Brücke, Rückenmark und den Kletterfasern aus dem Hirnstamm verrechnet. Hemmende Impulse erhalten die Purkinjezellen von lokalen Interneuronen. Die Axone der Purkinjezellen ziehen zu den Kleinhirnkernen und von dort zu anderen motorischen Zentren des Gehirns. Die Funktionsweise des Kleinhirns scheint in fein abgestimmten Signalen aus erregenden und hemmenden Impulsen zu bestehen [136]. Interessant erscheint in diesem Zusammenhang eine Theorie, nach der das Kleinhirn durch Flutwellen von Erregungen fließende Bewegungsabläufe ermöglicht [134].

### 1.5.3 Hirnstamm

Als Hirnstamm wird in der makroskopischen Anatomie die Fortsetzung des Rückenmarks bezeichnet, die unterhalb des Kleinhirns und des Großhirns verläuft. Sie umfasst das verlängerte Rückenmark (Medulla oblongata), die Brücke (Ponts) und das Mittelhirn (Mesencephalon) [135]. Die Oberseite der Brücke und des verlängerten Rückenmarks bilden die Unterseite des IV. Hirnventrikels. Der Hirnstamm wird von großen Faserbündeln der absteigenden Pyramidenbahnen und der hier entspringenden extrapyramidalen Bahnen durchzogen. Daneben sind auch wichtige motorische Kernkomplexe im Hirnstamm lokalisiert, die ihre Funktionen hauptsächlich zusammen mit dem Kleinhirn und dem motorischen Zentren des Großhirns ausführen. Die Hirnnervenkerne III bis XII liegen im gesamten Gebiet des Hirnstammes. Im verlängerten Rückenmark befinden sich die Olivenkernkomplex und die Hinterstrangkerne. In der Brücke sind die nach ihr benannten Brückenkerne enthalten. Im Mittelhirn liegen die Kernkomplexe der Vierhügelplatte, des Nuclei ruber, der Substantia nigra und der Formatio reticularis [136]. Schädigungen im Bereich des Hirnstammes haben sehr vielfältige Lähmungserscheinungen zur Folge.

### 1.5.4 Hippocampus

Der Hippocampus liegt als eingerollte Struktur teilweise in der medialen Wand beider Großhirnhemisphären und ist eine zentrale Schaltstelle des limbischen Systems. Zur Hippocampusformation werden nach ihrem histologischen Erscheinungsbild drei zellulär und funktionell verschiedene Strukturen gezählt: Gyrus dentatus, Cornu ammonis (Ammonshorn) und entorhinaler Cortex. Der Gyrus dentatus besteht aus einer schmalen Schicht von Körnerzellen, deren Dendriten in die umgebenden Molekularschicht laufen. Das Ammonshorn wird von enggepackten Pyramidenzellen gebildet, die ihre Impulse hauptsächlich von Axonen des entorhinalen Cortex erhalten. Umgeben wird diese Formation von einer dünnen Schicht weißer Substanz (Alveus). Als zelluläres Paradigma für den Prozess des Lernens wird die hippocampale Langzeitpotenzierung (LTP) angesehen, die zu einer Verstärkung der synaptischen Aktivität führt [136]. Dieses Phänomen ist im Hippocampus besonders stark ausgeprägt.

In dieser Arbeit wurde der Hippocampus aus dem Großhirn herauspräpariert und gesondert analysiert, weil diese Struktur nach dem derzeitigen Wissensstand bei der Gedächtnisbildung entscheidend und besonders anfällig für Neurodegeneration (Absterben von Nervenzellen) ist.

### 1.5.5 Hypophyse

Die Hypophyse, auch Hirnanhangdrüse genannt, ist das hormonelle Ausführorgan des Hypothalamus. Sie besteht aus zwei Teilen, der Neurohypophyse (Hypophysenhinterlappen) und der Adenohypophyse (Hypophysenvordenlappen). In dem Gewebe der Neurohypophyse enden die Fortsätze von zwei hypothalamischen Kernen. Sie sezernieren hier ihre Hormone in die systemischen Blutgefäße und in das hypophysäre Pfortadersystem (Eminentia mediana). Die Adenohypophyse besteht aus Drüsenepithel, das glandotropine Hormone sowie Effektorhormone produziert [134, 135]. Über Releasing-Hormone und Release-Inhibitor-Hormone, die vom Hypothalamus ins Pfortadersystem sezerniert werden, wird die Hormonproduktion der Adenohypophyse gesteuert. Die Hypophyse gehört zu den zirkumventrikulären Organen, d.h. sie verfügt über keine Blut-Hirnschranke und gewährleistet so die unverzögerte humorale Kommunikation. Damit stellt sie die Schnittstelle zwischen neuronaler und hormoneller Regulation dar [134, 136].



## 1.6 Zellulärer Aufbau des Gehirns

Das Gehirn der Wirbeltiere, das als Ansammlung von Nervenzellen betrachtet werden kann, besteht aus zwei grundsätzlich verschiedenen Zelltypen, den Neuronen und den Gliazellen. In höheren Säugern übersteigt die Anzahl der Gliazellen die der Neuronen um das zehnbis- bis fünfzigfache. Innerhalb der Gruppe der Gliazellen werden Astrocyten, Oligodendrocyten, Mikroglia und Ependymzellen unterschieden, im peripheren Nervensystem gibt es statt der Oligodendrocyten Schwannsche Zellen. Alle Hirnzellen mit Ausnahme der Mikroglia sind ektodermalen Ursprungs. Die Mikroglia wandern als Makrophagen mesodermalen Ursprungs ins Gehirn ein [134]. Hier soll ein kurzer Überblick über die Funktionen der verschiedenen Zelltypen gegeben werden, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

### 1.6.1 Die Neuronen

Die Aufgabe der Neuronen besteht in der Reizleitung und Reizverarbeitung. Dazu verfügen sie über eine spezialisierte Plasmamembran, mehrere Dendriten und einem Axon, an dessen Enden sich Kontaktstellen (Präsynapsen) zur Reizübertragung auf nachgeschaltete Neuronen befinden. Bei der Ausführung ihrer Funktion werden sie von den Gliazellen in vielerlei Hinsicht unterstützt [137–139]. Der neuronale Zellkörper enthält neben dem Zellkern und den übrigen Zellorganellen ein ungewöhnlich großflächiges raues endoplasmatisches Retikulum (Nissl-Schollen) sowie ein stark ausgeprägtes Cytoskelett. Am Axonhügel entspringt das Axon. Die in verschiedenen Bereichen des Zellkörpers empfangenen Reize werden am Axonhügel verrechnet und laufen dann als elektrischer Reiz entlang des Axons zur Präsynapse, wo sie über die Ausschüttung von Neurotransmittern als chemisches Signal auf die Kontaktstruktur (postsynaptische Membran) des nachfolgenden Neurons übertragen werden. Die postsynaptische Membran wandelt den empfangenen chemischen Reiz in einen elektrischen Reiz um und sendet ihn weiter zu ihrem Zellkörper. Zur schnelleren Reizleitung sind einige Axone von Myelinscheiden, die als Isolierschicht fungieren, umhüllt. Die ausgeschütteten Neurotransmitter führen zur Ausbildung von excitatorischen oder inhibitorischen postsynaptischen Potentialen. Neben den chemischen Synapsen können Neuronen auch durch elektrische Synapsen (Gap Junction) über Ionen Signale übertragen [134]. Eine große Neuronenklasse stellen die Pyramidenzellen im cerebralen Cortex und im Ammonshorn des Hippocampus dar. Ihrem annähernd pyramidenförmigen Zellkörper entspringt an der Zellspitze ein apikaler Dendrit und an seiner Basis mehrere Dendriten sowie das Axon.

## 1.6.2 Die Astrocyten

Die Astrocyten sind die zahlenmäßig häufigsten Gliazellen, sie können funktionell und morphologisch in weitere Gruppen eingeteilt werden. Die protoplasmatischen Astrocyten stehen in engem Kontakt mit den Zellkörpern sowie den Synapsen der Neuronen. Fibrilläre Astrocyten sind in der weißen Substanz zu finden. Die Astrocyten sind Gliazellen, die über zwei Kontaktseiten verfügen, und zwar zur neuronalen Membran und zu einem Blutgefäß oder den Ependymzellen der Ventrikelwand [140]. Astrocyten induzieren und erhalten die Morphologie und Funktion der Blut–Hirnschranke. Sie metabolisieren die aus dem Blut aufgenommene Glucose bis zum Laktat und geben es in den Extrazellularraum ab, so dass es von den benachbarten Neuronen aufgenommen werden kann [138, 139]. Sie verfügen als einzige Hirnzellen über geringe Glycogenspeicher. Im Bereich der Synapsen schirmen sie den Wirkort des Transmitters ab und sind an dessen Abtransport aus dem synaptischen Spalt beteiligt [138]. Sie können jeden dazu erforderlichen Rezeptor exprimieren. Die bisher am besten untersuchten spezifischen astrocytären Rezeptoren sind die Glutamat–Rezeptoren GLAST und GLT1. Sie nehmen zusammen mit Glutamat auch Natriumionen auf und leiten damit gleichzeitig das neuronale Signal für einen erhöhten Laktat–Bedarf an den Astrocyten [138, 141]. Nach Amidierung zu Glutamin wird dieses in den extrazellulären Raum abgegeben und kann von dort durch das Neuron aufgenommen und wieder zu Glutamat umgewandelt werden (Glutamat–Glutamin–Cyclus) [137–139]. Auch die durch die synaptische Aktivität stark angestiegene extrazelluläre Kaliumkonzentration wird durch Transporter und Kaliumkanäle der Astrocyten wieder auf den physiologischen Wert gebracht. Astrocyten haben einen maßgebenden Einfluß auf die neuronale Plastizität, sie erhöhen die Anzahl der Synapsen und fördern deren Stabilität [142]. Durch Calciumfreisetzung aus intrazellulären Calciumspeichern reagieren Astrocyten auf Transmitterausschüttung des benachbarten Neurons. Dieses Signal wird über Gap–Junctions auf benachbarte Astrocyten übertragen und breitet sich als Calcium–Welle aus, die wahrscheinlich zur Modulation der Synapse beiträgt [140, 141]. Eine weitere Funktion haben Astrocyten bei der Regulation der Immunantwort im zentralen Nervensystem. Durch ihre Fähigkeit, MHC II–Moleküle und B7 zu exprimieren, wirken sie als Antigen–präsentierende Zellen und beeinflussen inflammatorische Prozesse. Außerdem sekretieren sie verschiedene Cytokine und Chemokine [143–145]. Aktuell mehren sich die Hinweise auf einen vorwiegend anti–inflammatorischen Einfluss der Astrocyten, wodurch die T–Zellen in ihrer Aktivität und Proliferation abgeschwächt werden [145]. So könnten Astrocyten zum Teil das Immunprivileg des ZNS mitverursachen.

### 1.6.3 Die Oligodendrocyten

Die Oligodendrocyten sind die myelinbildenden Gliazellen des zentralen Nervensystems. Ausstülpungen ihrer Membranen umwickeln in mehreren Schichten die Axone von Neuronen und gewährleisten so eine schnellere Reizleitung, die sogenannte saltatorische Erregungsleitung (bis zu 150m/s schnell). Während der Ontogenese wandern O-2A-Vorläuferzellen aus der Ventrikelwandung ins entstehende Marklager und differenzieren sich dort zu Oligodendrocyten. Auch im adulten ZNS gibt es noch Oligodendrocyten-Vorläuferzellen, die degenerierte Oligodendrocyten ersetzen können. Das Myelin besteht im Gegensatz zu anderen Membranen überwiegend aus Lipiden und nur zu 20 – 30 % aus Proteinen. Im peripheren Nervensystem (PNS) übernehmen die Schwannschen Zellen die Funktion der Oligodendrocyten, sie enthalten zum Teil andere Myelinproteine als diese. Die Myelinproteine sind für die Stabilität und die Funktion der Myelinschichten notwendig, sie sind transmembran- oder membranassoziierte Proteine. Zu ihnen gehören das Proteolipid-Protein (PLP, im ZNS), das basische Myelinprotein (MBP, im ZNS und PNS), das myelin-assoziierte Glycoprotein (MAG, im ZNS und PNS), Connexin-32 (Cx32, im ZNS und PNS), das periphere Myelin-Protein-22 (PMP22, im PNS) und das Protein-Null (P0, im PNS). Das myelinisierte Axon und der Oligodendrocyt bzw. die Schwannsche Zelle bilden eine funktionelle Einheit. Oligodendrocyten exprimieren ein nervenwachstumhemmendes Protein NOGO, das für die geringe Regenerationsfähigkeit der Nerven des ZNS verantwortlich ist.

### 1.6.4 Die Mikroglia

Als die intrinsischen, immunkompetenten Zellen des ZNS werden die Mikroglia bezeichnet, sie gehören zu den antigen-präsentierenden Zellen des ZNS [146, 147]. So sind Mikroglia maßgebend an der Entstehung, dem Verlauf und auch dem Abklingen von neuroinflammatorischen Prozessen beteiligt. Sie wandern während der embryonalen und frühen postnatalen Phase als Makrophagen ins Gehirn ein und sind während der Entwicklung und Reifung des Gehirns phagozytotisch aktiv. Im adulten Gehirn liegen sie in einer ramifizierten Gestalt vor. Sie sind so phänotypisch an das Gewebe angepasst und ihre immunrelevanten Eigenschaften sind in diesem Zustand herunterreguliert [147]. Auf ihrer Oberfläche sind Rezeptoren für verschiedene Neurotransmitter, ATP, Neurotrophine und einwärts gerichtete Kalium-Kanäle exprimiert, mit denen sie die Mikroumgebung des Hirnparenchyms überwachen [141]. Bei neuronaler Schädigung des umgebenden Gewebes gehen sie in einen aktivierten Zustand über [146, 148]. Dieser Prozess der Mikroglia-Aktivierung folgt einer stereotypen Abfolge, an deren

Ende die amöboiden Mikroglia mit der Fähigkeit zur Phagozytose stehen [146–148]. Mit der Aktivierung ändert sich auch die Genexpression der Mikroglia stark, sie exprimieren dann auf ihrer Oberfläche MHCII-Proteine und setzen pro-inflammatorische Cytokine ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ), anti-inflammatorische Cytokine ( $\text{TGF}\beta$ ,  $\text{IL-10}$ ,  $\text{IL-1ra}$ ), trophische Faktoren und Chemokine ( $\text{MCP1}$ ,  $\text{MIP1}\alpha/\beta$ ,  $\text{RANTES}$ ) frei [148–150]. Weiterhin exprimieren sie auf ihrer Zelloberfläche den Opsonin-Rezeptor, der veränderte zelleigene sowie mikrobielle Strukturen erkennt und deren Phagozytierung einleitet [147, 148].

### 1.6.5 Die Blut-Hirnschranke

Der Gehirnstoffwechsel ist auf eine permanente Zufuhr von Glucose und Sauerstoff über das Blut angewiesen. Eine Unterbrechung der Blutversorgung führt innerhalb von Sekunden zur Bewusstlosigkeit und zum neuronalen Zelltod. Um die Versorgung sicherzustellen, ist das Hirngewebe von zahlreichen feinen Kapillaren durchzogen. Ihr mittlerer Abstand voneinander beträgt  $40\ \mu\text{m}$  und ihre aufaddierte Länge ca.  $7\ \text{km}$  [151]. Die zelluläre Struktur an der Grenzfläche Blutgefäß/Hirngewebe wird als Blut-Hirnschranke bezeichnet, sie schützt das Gewebe vor der schwankenden Zusammensetzung des Blutes und zirkulierenden neurotoxischen Molekülen [151, 152]. Die cerebralen Endothelzellen, die die Blutgefäße auskleiden, zeigen morphologische Besonderheiten, die sie gegenüber den Endothelzellen aller übrigen Organe auszeichnen [153]. Sie sind durch erheblich festere kontinuierliche Zonulae occludentes (tight junctions) mit ihren jeweils benachbarten Endothelzellen verbunden, wodurch der parazelluläre Fluss von Molekülen stark vermindert wird. Die zweite Besonderheit ist der stark eingeschränkte transzelluläre Fluss von Molekülen durch die Endothelzellen (Pinocytose). Nur Moleküle, die kleiner als  $400 - 500\ \text{Da}$  und hydrophob sind, wie Ethanol,  $\text{CO}_2$  oder Heroin, können durch Diffusion über die Endothelmembran die Blut-Hirnschranke überwinden [151]. Für den selektiven Transport sind in den luminalen und/oder in den abluminalen Membranen der Endothelzellen eine große Anzahl verschiedener Transporter (z.B. Glucosetransporter: GLUT-1, Aminosäuretransporter, P-Glycoprotein) und Rezeptoren (z.B. LDL-Rezeptor, Transferrin-Rezeptor) eingelagert. Auf der Seite des Hirngewebes werden die Blutgefäße zu  $99\ \%$  von Endfüßen der Astrocyten umschlossen [152], die den Phänotyp der cerebralen Endothelzellen aufrechterhalten. Durch Ergebnisse zahlreiche Versuche wurde belegt, dass die Astrocyten die spezifischen Schrankeneigenschaften der cerebralen Endothelzellen indirekt über Cytokine (z.B.  $\text{IL-6}$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ) und direkt durch den zellulären Kontakt induzieren [152, 153]. Die Tight junctions bilden ein verzweigtes Netzwerk, das am lumina-

len Teil der lateralen Seite der Endothelzellen lokalisiert ist. Bisher sind drei Typen von Transmembranproteinen der Tight junctions bekannt, die die parazelluläre Permeabilität kontrollieren: Occludin, Claudin und das Junctional-Adhesion-Molecule (JAM) [154]. Ihre intrazellulären Domänen sind über Hilfsmoleküle wie z.B. ZO-1, ZO-2 und Cingulin mit den Actinfilamenten des Cytoskeletts verbunden. Sie sind Ausgangspunkte für mehrere Signaltransduktionswege [152, 154–156].

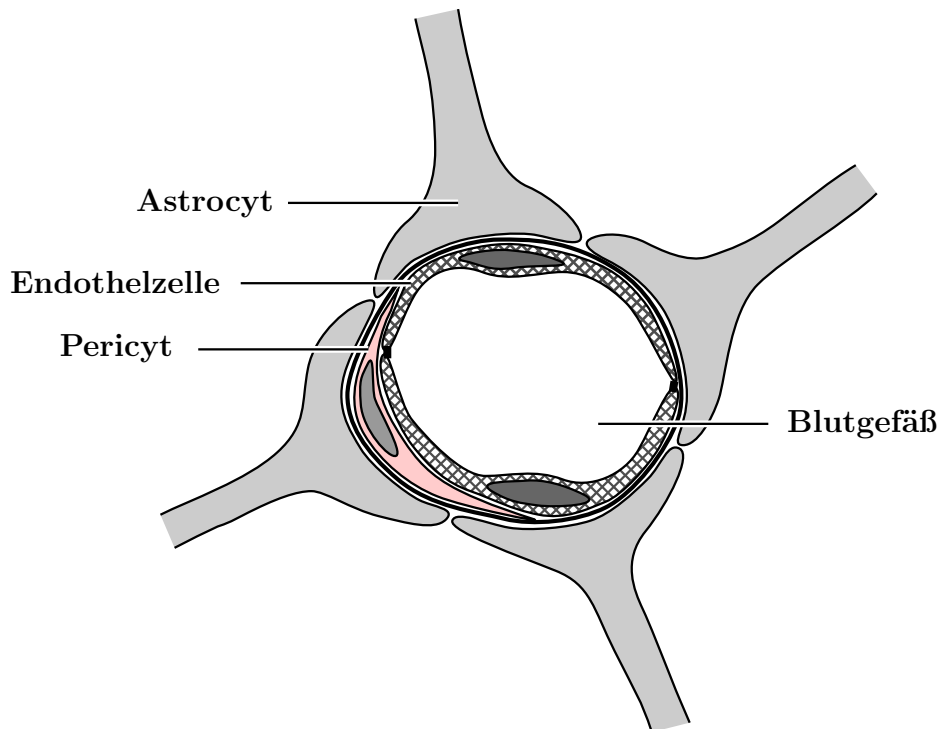


ABBILDUNG 1.2: Schematische Darstellung der Blut-Hirnschranke

## 1.7 Selenoproteine im Gehirn

Über die physiologischen Funktionen von Selen bzw. Selenoproteinen im Gehirn sowie ihre regionale und zelluläre Expression ist bisher nur wenig bekannt. Die verfügbaren Daten stammen zumeist aus in situ Hybridisierungen und immunhistochemischen Untersuchungen. Wegen ihrer Relevanz während der Gehirnentwicklung wurden die Deiodasen am meisten untersucht [106]. Das Schilddrüsenhormon T3 steuert über seinen nucleären Rezeptor die Expression vielfältiger für die Zellenmigration und Zelldifferenzierung kritischer Proteine wie z.B. BDNF, NT-3, Reelin, PLP, MBP, Tubulin $\alpha$  1 und Tubulin $\alpha$  2 [106]. Die Konzentration des T3 wird im zeitlichen Verlauf der Gehirnentwicklung von den drei verschiedenen Deiodasen in engen Grenzen reguliert [106]. So wurde gefunden, dass im Fötus die Expression von D3 mit sich näherndem Geburts-

termin sinkt und die Expression von D1 und D2 ansteigt [157, 158]. Hohe Mengen an D3-mRNA wurden in den Pyramidenzellen des Hippocampus und der Schichten II–VI des cerebralen Cortexes sowie in den Purkinjezellen und den Körnerzellen des Kleinhirns nachgewiesen [157]. Dagegen wird D2 hauptsächlich in Gliazellen, insbesondere den Astrocyten und den Tanycyten (Population der Ependymzellen) exprimiert [105, 106]. Interessant hierbei ist, dass die höchsten Mengen an D2-mRNA spezifisch in den Fortsätzen der protoplasmatischen Astrocyten, die die Synapsen umgeben, gefunden wurde. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Konzentration an T3 im Zusammenwirken von Astrocyten (Überführen von T4 zu T3 durch D2) und Neuronen (Inaktivieren von T3) kontrolliert werden könnte [105]. Die Expression von D1 im Gehirn wurde nachgewiesen, seine Aktivität scheint dort aber eine untergeordnete Rolle zu spielen [106, 158].

Hohe Expressionen von GPx1 und GPx3 wurden in den Schichten II–VI des cerebralen Cortex, der Hippocampusformation, dem Nuclei ruber im Mittelhirn, den Purkinjezellen und in den Thalamuskernen nachgewiesen [159]. Dabei wurde GPx1 in Neuronen sowie in Gliazellen gefunden [159], GPx4 wird dagegen nur in Neuronen exprimiert [160]. Die GPx1-Knock-out Mäuse zeigten keine augenfälligen neurologischen Störungen [161]. Es konnte jedoch eine erhöhte Anfälligkeit für den Inhibitor des mitochondrialen Komplexes I MPTP (1-Methyl-4-Phenoyl-1,2,5,6-Tetrahydropyridin) [162] sowie eine erhöhte neuronale Schädigung nach Ischämie (Störung der Durchblutung) [163] festgestellt werden. In humanen Hirngeweben nach tödlich verlaufenem Infarkt wurde in den Randgebieten des geschädigten Gehirns eine Ansammlung von Astrocyten mit erhöhter GPx-Expression gefunden [164]. In Hirngeweben verstorbener Parkinson-Patienten konnten im Umfeld der geschädigten dopaminergen Neuronen der Substantia nigra Ansammlungen von Astrocyten nachgewiesen werden [165]. In transgenen Mäusen, die GPx1 überexprimierten wurde eine experimentell mit 6-OHDA (6-Hydroxydopamin) erzeugte Neurodegeneration der dopaminergen Neuronen vermindert [166] und der neuronalen Zelltod nach induziertem Infarkt verringert [52, 167]. Mäuse, bei denen das für GPx4 codierende Gen homocytot zerstört wurde, waren bereits im embryonalen Stadium nicht lebensfähig. Nur die heterocytoten Tiere GPx4<sup>-/+</sup> waren lebensfähig, sie zeigten aber erhöhte Anfälligkeiten für oxidativen Stress [168].

Über die regionalen und zellulären Expressionen der TrxR-Isoformen gibt es noch keine Informationen. Bei Ratten, die mit einer Selenmangel-Nahrung ernährt wurden, wurde im Gehirn die gleiche Enzymaktivität von TrxR gemessen, wie in selenadäquat ernährten Kontrolltieren [169]. Im post-mortem Hirngewebe von Patienten, die an der Alzheimer'schen Krankheit litten, wurden erhöhte TrxR-Aktivitäten bei verringertem Thioredoxin-Gehalt gefunden [170].

Die Expression von Selenoprotein R (MsrB), das spezifisch das R-Isomer der oxidierten Methioninreste reduziert, wurde im Gehirn der Ratte und der Maus nachgewiesen [123, 171]. Starke Expressionen wurden in den Purkinjezellen, den Körnerzellen und den Kernkomplexen des Kleinhirns sowie in der CA1-Region des Hippocampus und im Bulbus olfactorius detektiert [171].

In Untersuchungen durch *in situ* Hybridisierungen wurde Selenoprotein P (SelP) im Gehirn der Maus nachgewiesen, besonders große Mengen wurden in Purkinjezellen gefunden [172]. Northern Blot-Analysen und *in situ*-Hybridisierungen an Geweben aus der Ratte und dem Rind zeigten Expressionen im Kleinhirn, Bulbus olfactorius, Hippocampus und im vorderen Teil des Cortexes [64]. SelP, das aus dem Plasma angereichert wurde, wurde als survival-promoting factor für Neuronen *in vitro* beschrieben [173], als Peroxinitrit-Fänger [174] und als Komplex-Bildner für Quecksilber [175]. SelP erfüllt die Funktion eines Transportproteins für Selen. Es wird in großen Mengen von der Leber synthetisiert und über das Plasma in die Organe transportiert. Es wurde mehrfach beschrieben, dass es an Endothelzellen bindet [95, 176]. Im Fall des Gehirns scheint eine Selenaufnahme über SelP aus der Leber nicht obligatorisch zu sein, darauf deuten Ergebnisse aus Knock-out Experimenten. Bei einem Knock-out des SelP konnte der beobachtete neurologische Phänotyp des Selenmangel-Gehirns (motorische Störungen, spontane Krämpfe) [177, 178] durch Supplementation von Selen als Natriumselenit rückgängig gemacht werden [178, 179]. Im Fall eines leberspezifischen SelP Knock-out treten keine neurologischen Störungen auf. Die SelP-mRNA ist im Gewebe des Gehirn nachweisbar [180]. Dies und die Ergebnisse aus den Knock out-Modellen führten zu den Vermutungen, dass i) SelP eine weitere, hirnspezifische Funktion hat und ii) das Gehirn seinen eigenen Selen-Stoffwechsel besitzt, mit eigenem Speicher [180, 181].

Das Selenoprotein W wird im Gehirn exprimiert [182] es ist anscheinend in den Prozess des axonalen Wachstums involviert. Über seine genaue Funktion in diesem Gewebe ist bisher nichts bekannt. Auch von Selenoprotein N, Selenoprotein M und dem 15kDa-Selenoprotein weiß man bisher nur, dass sie im Gehirn exprimiert werden [121, 130, 183].

Ergebnisse von Öztas und Mitarbeitern geben deutliche Hinweise auf einen Einfluss von Selen auf die Permeabilität der Blut-Hirnschranke während erhöhtem oxidativen Stress [184]. Sie fanden in Selen-supplementierten Ratten deutlich geringere Permeabilitäten für Albumin infolge eines PTZ-induzierten epileptischen Krampfes. Über die Mechanismen, die zu diesem Effekt führen, kann derzeit nur spekuliert werden.

