

# 3 Methoden

## 3.1 Chemikalien

|                                |                   |
|--------------------------------|-------------------|
| 2-Mercaptoethanol              | Merck             |
| 2-Propanol                     | Merck             |
| Acrylamid (99.9 %)             | Pharmacia Biotech |
| Agarose                        | Roth              |
| Amphotericin B                 | Biochrom          |
| APS                            | Sigma             |
| Benzamidin                     | Sigma             |
| Benzamidinhydrochlorid         | Sigma             |
| Bisacrylamid                   | Pharmacia Biotech |
| Bromphenolblau                 | Sigma             |
| BSA                            | Biorad            |
| Cellophan                      | Pharmacia Biotech |
| Collagen Type I from rat tail  | Sigma             |
| Coomassie Brilliant Blue       | Serva             |
| Cover fluid                    | amersham          |
| Dinatriumcarbonat (reinst)     | Merck             |
| DTT (99 %)                     | Sigma             |
| DMEM                           | Life Technologies |
| EDTA                           | Merck             |
| endothelial cell growth factor | Sigma             |
| Essigsäure (100 %)             | Merck             |
| Ethanol (absolut)              | Merck             |
| Ethylendiamin                  | Merck             |
| Formaldehyd (37 %)             | Merck             |
| L-Glutamin                     | Sigma             |
| Glycin                         | Serva             |
| Glycerol                       | Fluka             |
| Harnstoff                      | Serva             |
| Kupfersulfat                   | Fluka             |

### 3 Methoden

|  |                   |
|--|-------------------|
| Magnesiumchlorid                                     | Merck             |
| Methylenbisacrylamid                                 | Pharmacia Biotech |
| Molecular Weight Marker Kit                          | Sigma             |
| n-Butanol  | Merck             |
| Natriumthiosulfat-Pentahydrat                        | Merck             |
| Natriumacetat-Trihydrat                              | Merck             |
| Natriumcarbonat (reinst)                             | Merck             |
| Natriumchlorid (reinst)                              | Merck             |
| Natriumhydrogencarbonat                              | Merck             |
| Natriumhydroxid                                      | Merck             |
| Natrium-Pyruvat                                      | Sigma             |
| Natriumthiosulfat                                    | Merck             |
| Nitrocellulose                                       | Amersham          |
| ortho-Phosphorsäure                                  | Sigma             |
| para-Formaldehyd                                     | Sigma             |
| PBS  | Life Technologies |
| poly-L-Lysin   | Biochrom          |
| Pepstation A   | Merck             |
| Protein Assay  | Biorad            |
| PMSF (99 %)  | Sigma             |
| Saccharose   | Serva             |
| Salzsäure (37 %)                                     | Merck             |
| SDS (kristallin)                                     | Serva             |
| Sieb gaze (Nylon Porendurchmesser 75 $\mu\text{m}$ ) | Reichert          |
| Silbernitrat   | Merck             |
| TEMED (reinst)                                       | Serva             |
| Tris   | Merck             |
| Triton X-100   | LKB Bromma        |
| Trypanblau   | Sigma             |
| Trypsin (2,5 %)                                      | Life Technologies |
| Trypsin / EDTA                                       | Life Technologies |

## 3.2 Geräte

### Allgemein

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| Blot-Kammer                 | BioRad Transfer Blot SD221 BR                  |
| Mikrowelle                  | Privilege 9023                                 |
| Autoradiographische Platten | DuPont   |
| Eraser                      | Fujix Bas 1000                                 |
| Image-Plate                 | Fuji   |
| Gefrierschrank              | Colora UF 85-300S                              |
| Gefriertrockner             | Leybold-Heraeus GT 2                           |
| Geltrockner                 | Biometra D62                                   |
| Pumpe für Geltrockner       | Leybold Divac 2,41                             |
| AAS                         | Perkin-Elmer 5100 HGA600                       |
| IEF-Kammern                 | Pharmacia LKB Multiphor 2117                   |
|                             | Boehringer Ingelheim Bioproducts BH1           |
| IEF-Stromversorger          | Biometra High Voltage Power Pack P30           |
|                             | amersham pharmacia biotech EPS 3501 XL         |
| Kühlfalle der Speedvac      | Jouan RTC60                                    |
| Kühlschränke                | Liebherr Kristall                              |
|                             | Triter Hannover                                |
| Gefrierschrank (-20 °C)     | Liebherr Öko-system                            |
| Gefrierschrank (-40 °C)     | Bosch GS 368T                                  |
| Multichannel Analyser       | Canberra Serie 35                              |
| NaI-Detektor                | crismatic AS17                                 |
| Stromversorger              | LKB Bromma 2301 Macrodrive1 Power supply       |
|                             | Apelex Molekular Biology PS 9009 TX            |
|                             | LKB Bromma 2197 power supply                   |
| Magnetrührer                | IKA RTC  |
|                             | IKA RET-G                                      |
|                             | IKA MCT  |
| PH-Meter                    | Knick Digital pH-Meter                         |
| Photometer                  | VWR international Cary50 BIO Spectrophotometer |
| Pipetten                    | Eppendorf und Gilson (verschiedene Grössen)    |
| Polytron PT 1300D           | Kinematik AG                                   |
| Rotor der Ultrazentrifuge   | Beckmann Ti-75                                 |
| Scanner                     | Fujifilm FLA-3000                              |
| Schüttler                   | Greiner Mixer 5                                |

### 3 Methoden

|                         |                                 |
|-------------------------|---------------------------------|
| Schwenker               | IKA vibra VR                    |
| Trockenschrank          | GFL 3016                        |
| Vakuumpumpen            | Kötterman 2715                  |
|                         | Edwards 5 two stage             |
|                         | Leybold-Heraeus mini a          |
| Vortexer                | Heidolph REAX 2000              |
| Waagen                  | Mettler PC 440 Delta-Range      |
|                         | Mettler PE 2000                 |
|                         | Sartorius 1872                  |
| Wasserbäder             | IKA TE2 Temperierbad            |
|                         | Braun Melsungen Thermoplus 1450 |
| Wasserbad mit Schüttler | GFL 1086                        |
| Wasserbad-Rührer        | Braun Melsungen Thermomix 1420  |
| Zentrifugen             | Centricon T324                  |
|                         | Eppendorf 5415C                 |
| Zentrifuge der Speedvac | Jouan RC 10.22                  |

#### Zellkultur

|                |                           |
|----------------|---------------------------|
| Brutschrank    | Juan IG 150               |
| Clean Bench    | Heraeus Instruments HS 18 |
| Mikroskop      | Zeiss Axiovert 25         |
| Zählkammer     | Neubauer Labor Optik      |
| Kamera         | Kodac Digital Science 120 |
| Zentrifuge     | Sorvall RT 7              |
| Pipetboy       | Integra Biosciences       |
| Kühlschrank    | Liebherr glass line       |
| Gefrierschrank | Kryotech                  |
| Autoklav       | Varioklav 400             |

#### NAA

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| Waagen                                       | Mettler AE 240                |
|  | Mettler MC 210P               |
| Trockenschrank                               | Heraeus Instruments kelvitron |
| Kühlschrank                                  | Liebherr profi line           |
| Ionisierungsgebläse                          | Sartorius IB-8                |
| Vorrichtung zum Waschen<br>der Quarzampullen | Toss GmbH                     |

**Aktivlabor**

|                              |                              |
|------------------------------|------------------------------|
| Kühlschrank                  | Liebherr Kristall KGK 3584.1 |
| Gefrierschrank               | Heraeus Instruments HFU 86   |
| Zentrifuge                   | Heraeus primo R              |
| Ultrazentrifugen             | Beckmann L8-70               |
|                              | Beckmann Optima MAX          |
| Wasserbad                    | GFL Operating Instruments    |
| Gefriertrocknung             | Leybold Heraeus              |
| Kühlung für Gefriertrocknung | Haake K                      |
| Pumpe für Gefriertrocknung   | Leybold Heraeus Trivac       |

## 3.3 Methoden zur Selenbestimmung

### 3.3.1 Elementanalytik

#### 3.3.1.1 Neutronenaktivierungsanalyse (NAA)

Die Anfänge dieser Analysemethode gehen auf Experimente von George de Hevesy zurück, der im Jahr 1935 durch Neutronenbeschuss induzierte Kernreaktionen zur Elementanalyse nutzte. Die stabilen Isotope der Elemente einer Probe fangen dabei entsprechend ihres Wirkungsquerschnittes Neutronen ein. Die erzeugten instabilen Kerne zerfallen unter Emission von  $\gamma$ -Quanten mit nuklidspezifischen Energien. Durch die Analyse der erhaltenen  $\gamma$ -Spektren kann die Elementzusammensetzung der jeweiligen Probe bestimmt werden. In heutigen Forschungsreaktoren können Neutronenflussdichten von  $10^{13} - 10^{14} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$  erzeugt werden. Die anschließende Analyse erfolgt mit hochauflösenden Germaniumdetektoren.

Der Zusammenhang zwischen erzeugter Radioaktivität des Nuklids und der Menge des Elements in der Probe ist durch folgende Gleichung gegeben:

$$A = x \cdot F \cdot s \cdot N_A \cdot f_H \cdot \left( 1 - \exp \left[ -\frac{\ln 2 \cdot t_B}{t_{1/2}} \right] \right)$$

$A$  = Aktivität / Bq

$F$  = Neutronenflussdichte /  $\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$

$s$  = Einfangquerschnitt /  $\text{cm}^2$

$x$  = Menge des betrachteten Elements / mol

$N_A$  = Avogadrokonstante

$f_H$  = relative Isotopenhäufigkeit

$t_B$  = Bestrahlungszeit in Tagen

$t_{1/2}$  = Halbwertszeit des erzeugten Nuklids in Tagen

Vor der Bestrahlung der biologischen Proben wurden diese gefrieretrocknet. Anschließend wurden sie im Quarzampullen eingeschmolzen und der Neutronenstrahlung ausgesetzt. Zur Selenbestimmung wurde die Instrumentelle Neutronenaktivierungsanalyse (INAA) eingesetzt, d.h. die bestrahlten Proben wurde direkt, ohne vorangegangene chemische Trennung gemessen. Zur Analyse des Selen-Nuklids  $^{75}_{34}\text{Se}$  wurden dessen spezifische  $\gamma$ -Energien bei 135,9 keV, 264,6 keV und 400,7 keV verwendet.

Ein Teil der Proben wurde zur Bestrahlung zum Forschungsreaktor FRG-1 in Geesthacht geschickt. Dort wurden sie für 7 Tage bei einer Neutronenflussdichte von  $3 \cdot 10^{13} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$  bestrahlt. Der andere Teil der Proben wurde im Forschungsreaktor BER II des HMI für 14 Tage bei einer Neutronenflussdichte von  $6,6 \cdot 10^{12} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$  bestrahlt. Die bestrahlten Ampullen wurden von Verunreinigungen auf der Außenwand der Quarzampulle durch Eintauchen in verschiedene Bäder (40 % (v/v) Flusssäure, bi-distilliertes Wasser, Ethylalkohol und Aceton) bei Raumtemperatur befreit. Anschließend wurden die Proben im  $\gamma$ -Spektrometer gemessen.

Durch Beachtung der nuklidspezifischen Abklingzeit von 70 – 80 Tagen konnte die Nachweisgrenze verbessert werden. Zur Minimierung des Zählfehlers bei der  $\gamma$ -Spektrometrie wurde jede Probe über eine Zeitspanne von 6 Stunden gemessen. Die simultane Bestrahlung von zertifiziertem Referenzmaterial (NIST 1577B: Bovine Liver, National Institute of Standards and Technology, Washington, USA) sowie eines Multielement-Standards ermöglichte die Quantifizierung.

#### 3.3.1.2 Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)

In der Gasphase absorbieren Atome eines Elements elektromagnetische Strahlung einer spezifischen Energie. Dabei ist die Schwächung der Strahlungsintensität der Zahl der Atome proportional und kann daher zur quantitativen Analyse verwendet werden. Als Strahlungsquelle wird eine Hohlkathodenlampe genutzt. Sie besteht aus einem Glasgehäuse mit einer Wolfram-Anode und einer becherförmigen Kathode aus dem Material, das untersucht werden soll. Die emittierte Strahlung einer solchen Lampe stammt vom Trägergas und von den Atomen des Kathodenmaterials. Durch die Messung einer Lösung bekannter Konzentration des entsprechenden Elementes wird das Gerät geeicht. Die Atomisierung der Probe erfolgt in einem beheizbaren Graphitrohr, das im Strahlengang positioniert ist. Im Verlauf eines Temperaturprogrammes wird die Probe getrocknet, verascht und anschließend atomisiert.

#### 3.3.1.3 Statistische Auswertung

Statistische Methoden beschäftigen sich mit der Aufarbeitung, Auswertung und der Beurteilung von empirischen Daten. Mit ihrer Hilfe kann auf allgemeine Gesetzmäßigkeiten geschlossen werden [185].

Aus dem Vergleich der Prüfgröße mit tabellierten Signifikanzschranken kann die Irrtumswahrscheinlichkeit  $P$  bestimmt werden. Die Irrtumswahrscheinlichkeit spiegelt die Einstufung in ein Signifikanzniveau wider. Im Allgemeinen wird ein  $P < 0,05$  als schwach signifikant [\*], ein  $P < 0,01$  als signifikant [\*\*] und ein  $P < 0,001$  als hochsignifikant [\*\*\*] eingestuft. In dieser Arbeit wurde der  $F$ -Test und der  $t$ -Test (Student's-Test) angewendet.

#### 3.3.1.4 Versuchstiere

Die Versuche wurden am Tiermodell Ratte (*Rattus norvegicus*, Charles River, WIGA GmbH, Sulzfeld) durchgeführt. Die Tiere wurden in der Abteilung "Nuklearmedizin" des Universitätsklinikum Benjamin Franklin (Charité) bei einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus (12 h) gehalten. Für die hier durchgeführten Versuche wurden mit einer Selenmangel-Nahrung (8 – 10  $\mu\text{g Se/kg}$  Trockenmasse)<sup>1</sup> über mehrere Generationen ernährte Tiere sowie mit selenadäquater Nahrung (Zusatz von 300  $\mu\text{g Se/kg}$  Trockenmasse als Natriumselenit zur Mangel-Nahrung) versorgte Tiere verwendet.

#### 3.3.1.5 Präparation der Proben

Die Tötung der Tiere und die Probenpräparation erfolgte in der Abteilung "Nuklearmedizin" des Universitätsklinikums. Nach Dekapitierung wurde der Schädel geöffnet und das Gehirn entnommen. Die anschließende Präparation erfolgte in eisgekühlter, isotonischer Kochsalzlösung (Braun-Melsungen, Heidelberg), wobei die entnommenen Hirnfraktionen sofort auf Eis gelagert wurden. In einem ersten Schritt wurde das Gehirn in Hirnstamm, Kleinhirn und Großhirn zerlegt. Anschließend wurde der Hippocampus aus dem Großhirn präpariert. Das Gewebe des Großhirns wurde zerteilt in

---

<sup>1</sup>Selendiät: 30 % Torulahefe, 58,7 % Saccharose, 5 % tocopherolarmes Fett, 5 % Mineralmischung, 1 % Vitaminmischung, 0,3 % D-,L-Methionin, 200 mg D-,L-a-Tocopherolacetat/kg und 50 mg Zn/kg

Vitaminmischung (g/kg): 1,8 g Vitamin A Konzentrat (500 000 IU/g), 0,125 g Vitamin D Konzentrat (850 000 IU/g), 5,0 g p-Aminobenzoesäure, 0,00135 g Vitamin B12, 0,02 g Biotin, 3,0 g Ca-Pantothenat, 75,0 g Cholin-Chlorid, 900,46 g Glucose, 0,09 g Folsäure, 5,0 g Inositol, 2,25 g Menadion, 4,25 g Niacin, 1,0 g Pyridoxin-HCl, 10 g Riboflavin und 1,0 g Thiamin-HCl

Vorderhirn, das das vordere Drittel des Cortex, den Bulbus olfactorius und die Basalganglien enthielt, sowie Hinterhirn, das die hinteren zwei Drittel des Cortexes und das Zwischenhirn umfasste. Als Kontrollgewebe wurden Hypophyse, Leber und Niere präpariert. Von den letzten beiden Organen wurden jeweils gleiche Gewebe-Areale zur Analyse abgetrennt. Diese waren der rechte Leberlappen und das obere Drittel der rechten Niere. Die entnommenen Organe wurden auf Eis gelagert, zum Hahn-Meitner Institut transportiert und dort bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### **Gewebeaufarbeitung für die INAA**

Die Gewebe wurden nach mindestens 6 Stunden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in die Anlage zur Gefriertrocknung überführt. Im Verlauf von 4 Tagen wurden sie unter Vakuum bei einer Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  getrocknet. Anschließend wurden die Proben zur Homogenisation in einem Achatmörser zermahlen und jeweils 15 – 20 mg des Gewebe-Pulvers in Quarzampullen eingewogen. Nach weiteren Tagen der Trocknung bei  $50^{\circ}\text{C}$  und Kontrolle der Massen wurden die Quarzampullen zugeschmolzen und zur NAA eingesetzt.

#### **Gewebeaufarbeitung für die AAS**

Die Gewebe wurden mit dem Polytron (Kinematica AG, Heidelberg) in eiskalter 20 mM Tris-HCL-Lösung (pH 7.4) im Verhältnis 1 : 3 (g : ml) für ca. 4 Minuten homogenisiert. Die Hypophyse wurde nach Zusatz von Puffer ca. 1 : 100 (g : ml) durch mechanische Dissoziation und Ultraschallbehandlung in Lösung gebracht. Durch Zentrifugation bei  $120\,000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  wurden die Cytosole als Überstände gewonnen.

### 3.3.2 Selenbestimmung mittels Radiotracer $^{75}\text{Se}$ in vivo

#### 3.3.2.1 Radiotracer $^{75}\text{Se}$

Für proteinchemische Untersuchungen von Selenoproteinen ist es erforderlich diese zu markieren, um sie so von anderen Proteinen zu unterscheiden. Zur radioaktiven Markierung bietet sich das Selenisotop  $^{75}_{34}\text{Se}$  an. Dieses Nuklid, das durch Elektroneneinfang in sein stabiles Tochternuklid  $^{75}_{33}\text{As}$  zerfällt, hat eine Halbwertszeit von 120,6 Tagen. Beim Zerfall werden  $\gamma$ -Strahlen der Energien 121,1 keV; 136,0 keV; 264,7 keV und 279,5 keV ausgesendet, die mit einem Kristallszintillator detektiert werden können.

#### 3.3.2.2 Gewinnung des Radiotracers $^{75}\text{Se}$

Zur Erzeugung des  $^{75}\text{Se}$  wurde auf 99,9 % angereichertes, elementares  $^{74}\text{Se}$  in konzentrierter Salpetersäure  $\text{HNO}_3$  zu seleniger Säure  $\text{H}_2\text{SeO}_3$  oxidiert und anschließend mit Ammoniak-Lösung neutralisiert. Das gewonnene Ammoniumselenit  $(\text{NH}_4)_2\text{SeO}_3$  wurde 180 Tage im Forschungsreaktor BERII (Neutronenflussdichte  $1,6 \cdot 10^{14} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) bestrahlt. Das radioaktive Material wurde anschließend in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und auf pH 7.0 – 7.6 eingestellt.

#### 3.3.2.3 Tracer-Messungen mit dem NaI-Szintillator

Hierbei wird ein mit Thallium dotierter Natriumiodidkristall zum Nachweis der freigesetzten  $\gamma$ -Strahlung genutzt. Dabei kommt es im Kristall zu spontaner Lumineszenz. Ein Photomultiplier amplifiziert diese Ereignisse und leitet sie an weitere elektronische Bauelemente, die das Signal digitalisieren. Durch die Messanordnung im Bohrlochdetektor kann nahezu die gesamte radial abgegebene Strahlung detektiert werden. Es werden die Zerfallsereignisse gemessen und die Zählrate in counts per minute (cpm) angegeben.

#### 3.3.2.4 Tracer-Messungen durch Autoradiographie

Zur Aufnahme eines Autoradiogramms werden Image-Platten mit der radioaktiven Probe in einer Kassette belichtet. Die verwendeten Image-Platten der Firma Fuji sind mit Bariumfluorobromid und darin enthaltenen Spuren von zweiwertigem Europium beschichtet. Zur Detektion wird das quantenmechanische Phänomen der Lumineszenz genutzt: die Energien der emittierten  $\gamma$ -Quanten werden im Übergang des Europiums in seinen energetisch höheren, metastabilen Zustand gespeichert. Nach der Belichtungszeit wird die Image-Platte mit einem He-Ne-LASER abgetastet und damit

durch stimulierte Emission die Relaxation in den Grundzustand induziert. Die Signale werden über Photomultiplier vervielfältigt und anschließend digitalisiert. Der entscheidende Vorteil gegenüber herkömmlichen Röntgenfilmen liegt in der Linearität zwischen Intensität der Strahlung und der Anzahl der angeregten Ionen, über sechs Zehnerpotenzen. Zudem kann durch die niedrigere Nachweisgrenze die Expositionszeit geringgehalten werden. Die maximal erreichbare Ortsauflösung beträgt  $50\ \mu\text{m}$ .

#### 3.3.2.5 Markierung von Proteinen mit $^{75}\text{Se}$

Entsprechend den gewählten Versuchsbedingungen wurde den Tieren vor ihrer Tötung  $^{75}\text{Se}$  intraperitoneal (i.p.) verabreicht.

#### 3.3.2.6 Versuchstiere und Präparation der Proben

Für die in vivo-Markierungen mit  $^{75}\text{Se}$  wurden Wistar-Ratten aus derselben Tierhaltung verwendet, wie unter Abschnitt 3.3.1.4 beschrieben. Die Tötung der Tiere und die anschließende Präparation erfolgte wie unter Abschnitt 3.3.1.5 beschrieben.

#### Gewebeaufarbeitung für die Tracer-Experimente

Die Gewebe wurden mit dem Polytron (Kinematica AG, Heidelberg) in eiskalter 20 mM Tris pH 7.4 für 4 Minuten homogenisiert. Durch Zentrifugation bei  $120000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$  wurde das Cytosol als Überstand gewonnen. Im Pellet waren alle Zellorganellen enthalten.

### 3.3.3 Selenbestimmung mittels Radiotracer <sup>75</sup>Se in vitro

#### 3.3.3.1 Kultivierung der Hirnzellen

Die Untersuchungen wurden an den folgenden immortalisierten Zelltypen des Gehirns durchgeführt.

##### **Die neuronale Zell-Linie HT22**

DMEM high Glucose (Invitrogen, Eggenstein)  
10 %(v/v) FCS (Biochrom, Berlin)  
2 mM L-Glutamin (Invitrogen, Eggenstein)  
100 U/ml Penicillin (Invitrogen, Eggenstein)  
100 µg/ml Streptomycin (Invitrogen, Eggenstein)

##### **Die Mikroglia-Zell-Linie BV2**

DMEM high Glucose (Invitrogen, Eggenstein)  
10 %(v/v) FCS (Biochrom, Berlin)  
2 mM L-Glutamin (Invitrogen, Eggenstein)  
100 U/ml Penicillin (Invitrogen, Eggenstein)  
100 µg/ml Streptomycin (Invitrogen, Eggenstein)

##### **Die Astrocyten-Zell-Linie U 373**

DMEM high Glucose (Invitrogen, Eggenstein)  
10 % (v/v) FCS (Biochrom, Berlin)  
2 mM L-Glutamin (Invitrogen, Eggenstein)  
100 U/ml Penicillin (Invitrogen, Eggenstein)  
100 µg/ml Streptomycin (Invitrogen, Eggenstein)

##### **Die Oligodendrocyten-Zell-Linie OLN-93**

DMEM high Glucose (Biochrom, Berlin)  
10 %(v/v) FCS (Biochrom, Berlin)  
2 mM L-Glutamin (Invitrogen, Eggenstein)  
100 U/ml Penicillin (Invitrogen, Eggenstein)  
100 µg/ml Streptomycin (Invitrogen, Eggenstein)

#### **Die Endothel-Zell-Linie rBCEC4**

DMEM high Glucose (Invitrogen, Eggenstein)  
10 % (v/v) FCS (Biochrom, Berlin)  
1,2 mM L-Glutamin (Invitrogen, Eggenstein)  
100 U/ml Penicillin (Invitrogen, Eggenstein)  
100 µg/ml Streptomycin (Invitrogen, Eggenstein)  
2,5 µg/ml Amphotericin B (Biochrom, Berlin)  
100 µg/ml Heparin (Sigma, Deisenhofen)  
110 µg/ml Na-Pyruvat (Sigma, Deisenhofen)  
10 µg/ml ECGF (Sigma, Deisenhofen)

Die verschiedenen Zellkulturen wurden bei 37°C und 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Alle Verbrauchsmaterialien sowie die verwendeten Medien und Puffer wurden nach ihrem Ansetzen autoklaviert bzw. als sterile Ware kommerziell erworben. Zur Reinigung der Arbeitsfläche wurde 70 % (v/v) 2-Propanol verwendet.

#### **3.3.3.2 Markierung von Proteinen mit <sup>75</sup>Se**

Die Kulturen der verschiedenen Hirnzellen wurden 4–5 Stunden nach dem Ausplattieren durch einen Zusatz von 700 – 900 kBq <sup>75</sup>Se-Selenit und der entsprechenden Menge an nicht-radioaktivem Natriumselenit in das Kulturmedium markiert. Insgesamt wurden zur Markierung der Zellkulturen dem Kulturmedium 80 nM Selen zugesetzt. Die Zellkulturen wurden nach einer Proliferationszeit von 3 – 5 Tagen geerntet.

## 3.4 Etablierung der *in vitro* Blut-Hirnschranke

### 3.4.1 Präparation und Kultivierung primärer Astrocyten

Zellen, die frisch aus dem Gewebe isoliert und kultiviert werden, nennt man primäre Zellkulturen. Sie haben nur eine begrenzte Lebenszeit. Die Präparation von primären Astrocyten wurde in der AG Bechmann (Zelluläre Neurobiologie, Charité) durchgeführt. Astrocyten wurden aus dem Cortex neugeborener Wistar Ratten (2. oder 3. Tag *post natum*, P2-P3) gewonnen. Die Tiere wurden dekapitiert und das Gehirn unter sterilen Bedingungen aus der Schädelkalotte freipräpariert und in eisgekühltes PBS überführt. Nach Entfernung der Meningen mit Mikropinzetten unter dem Binokular wurde das Gewebe mit feuerpolierten Pasteurpipetten mechanisch dissoziiert. Die ausgelösten Zellen und verbliebenen Gewebestücke wurden anschließend bei 4°C mit 800 × g pelletiert. Nach ihrer Resuspension wurden die Zellen auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Kulturplatten (Nunc, Wiesbaden) ausplattiert und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach zwei Tagen wurden die Kulturen mit PBS gewaschen und wieder frisches Kulturmedium zugegeben. Die Vorkultur bestand nach etwa acht Tagen aus einem konfluenten Monolayer von Astrocyten, auf dem sich aktivierte Mikroglia (amöboid) befanden. Durch manuelles Schütteln der Kulturflasche konnten die Mikroglia abgelöst und mit dem Kulturmedium entfernt werden.

#### Kulturmedium

DMEM high Glucose (Invitrogen, Eggenstein)  
10%(v/v) FCS (Biochrom, Berlin)  
2 mM L-Glutamin (Invitrogen, Eggenstein)  
100 U/ml Penicillin (Invitrogen, Eggenstein)  
100 µg/ml Streptomycin (Invitrogen, Eggenstein)

#### 3.4.1.1 Immunfärbung der Astrocytenkulturen

Zur Kontrolle der Präparation wurde mittels Immunreaktion das astrocytenspezifische Intermediärfilament GFAP (glial fibrillary acidic protein) nachgewiesen. Die Astrocytenkulturen wurden nach 14 Tagen Kultivierung durch Trypsinbehandlung aus der Kulturflasche gelöst, in einer Dichte von 10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> auf mit poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen (22 mm Durchmesser, Roth) ausplattiert und weitere sieben Tage kultiviert. Die Zellen wurden nach mehrmaligem Waschen mit PBS<sup>2</sup> in 4%(w/v) para-Formaldehyd-Lösung fixiert. Anschließend wurde mit PB<sup>3</sup> gewaschen. Als primärer

---

<sup>2</sup>PBS: 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 18,9 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, pH 7,4

Antikörper wurde anti-GFAP aus Kaninchen (DAKO Zytomation, Glostrup, Dänemark) und als sekundärer Antikörper anti-Kaninchen IgG aus der Ziege mit gekoppeltem Alexa568 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) verwendet. Zum Nachweis der Mikroglia wurde der Antikörper anti-CDw137 gekoppelt mit FITC (Sigma, Deisenhofen) benutzt.

Die fixierten Zellen wurden für 10 min mit Lyse-Puffer<sup>4</sup> inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PB wurde für ca. 1,5 Stunden mit primärem Antikörper inkubiert. Anschließend wurde wiederholt gewaschen und für 1 Stunde mit dem sekundären Antikörper im Dunkeln inkubiert. Nach weiteren Waschschrritten wurden die Deckgläschen mit den nun immungefärbten Zellen in Mounting Medium (Vectashield H1000, Linaris, Wertheim) eingebettet und auf Objektträger transferiert. Zur Dokumentation wurden die angefertigten Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop BX-50 (Olympus, Hamburg) photographiert.

#### 3.4.2 Aufbau der Co-Kultur

Dazu wurden “Cell-Culture-Inserts” [Falcon, Heidelberg) genutzt. Vor dem Aufbau der Co-Kultur wurden jeweils die oberen Membranseiten der Filtereinsätze mit Rattenschwanz Collagen Typ I, (Sigma, Deisenhofen) beschichtet. Die Astrocyten wurden auf der unteren Membranseite der Filtereinsätze kultiviert. Nach zwei Tagen wurden die Endothelzellen in die Filtereinsätze gesät. Die Zellen der Co-Kultur wurde entsprechend mit Selen markiert und nach einer Proliferationszeit von 3 Tagen geerntet.

##### 3.4.2.1 Kulturmedien

Zur Kultivierung dieser Co-Kultur wurden die schon aufgeführten Medien für primäre Astrocyten und die cerebralen Endothelzellen rBCEC4 verwendet.

##### 3.4.2.2 Markierung der Co-Kultur mit <sup>75</sup>Se

Die Co-Kultur wurde zur stärkeren Markierung mit insgesamt 34 nM Selen markiert. Es wurden 700 – 900 MBq <sup>75</sup>Se und die entsprechenden Mengen an nicht-radioaktivem Natriumselenit dem Kulturmedium zugesetzt.

---

<sup>3</sup>PB: 0,1 M PB: 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> , 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> , pH 7,4

<sup>4</sup>Lyse-Puffer: 10 % (v/v) NGS, 0,4 % Triton-X 100 in PB

## 3.5 Biochemische Methoden

### 3.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur quantitativen Bestimmung des Proteingehaltes einer Lösung wurde die kolorimetrische Methode nach Bradford [186] verwendet. Das Prinzip beruht auf einer Absorptionsverschiebung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue von 465 nm nach 595 nm bei Bindung an Protein im sauren Milieu. Als Proteinstandard wurde BSA verwendet. Die Absorption des Farbstoffs korreliert direkt mit der Menge an reagierenden Seitengruppen im Protein. Am wichtigsten hierbei sind die Wechselwirkungen mit aromatischen und basischen Seitenketten des Proteins, insbesondere mit seinen Argininseitenketten.

### 3.5.2 Glycin-SDS-Gelelektrophorese nach Lämmli

Die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld wird als Elektrophorese bezeichnet. Sie wird in der Biochemie für die Molekulargewichtbestimmung von Proteinen genutzt. Das negativ geladene Detergenz SDS denaturiert das Protein und überdeckt dabei dessen Eigenladung. Die entstandenen negativ geladenen Polypeptid-Micellen sind in ihrer Größe dem Molekulargewicht des Protein proportional (1,4 g SDS pro g Protein). Als Matrix wird ein Co-Polymer aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid verwendet. Die Methode nach Lämmli verwendet ein SDS-haltiges, diskontinuierliches Tris-HCL/ Tris-Glycin-Puffersystem<sup>5</sup> [187]. Über einem engporigen Trenngel<sup>6</sup> wird ein weitporiges Sammelgel<sup>7</sup> gegossen. Beim Anlegen einer elektrischen Spannung kommt es im Sammelgel zu einem Stapel-Effekt. Dieser führt zu einer Vortrennung und Aufkonzentrierung des Proteingemisches. Im Trenngel führt der Reibungswiderstand zu einem weiteren Trenneffekt. Anhand von Proteinstandards können die Molekulargewichte der in der Probe enthaltenen Proteine bestimmt werden. Der zweifach konzentrierte Probenpuffer<sup>8</sup> wird vor dem Probenauftrag im entsprechenden Verhältnis zugesetzt. Dieser Ansatz wird für 4 Minuten auf 90 °C erhitzt und weitere 5 – 20 Minuten inkubiert.

---

<sup>5</sup>Laufpuffer: 50 mM Tris, 200 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS

<sup>6</sup>Trenngel: 15 % (w/v) Acrylamid, 0,4 % (w/v) N, N'-Methylenbisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS in 375 mM Tris/ HCl pH 8.8

<sup>7</sup>Sammelgel: 5 % (w/v) Acrylamid, 0,13 % (w/v) N, N'-Methylenbisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS in 125 mM Tris/ HCl pH 6.8

<sup>8</sup>2fach Probenpuffer: 12,5 mM Tris/ HCl pH 8,8, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerol, 20 mM DTT, 0.2 % (w/v) Bromphenolblau

### 3.5.3 2-dimensionale Gelelektrophorese

Werden Proteine in einer Dimension durch Isoelektrische Fokussierung (IEF) nach ihren isoelektrischen Punkten (IP) und in der zweiten Dimension in einer SDS-PAGE nach Lämmli nach ihren Molmassen aufgetrennt, spricht man von einer zweidimensionalen Gelelektrophorese. Diese Auftrennung wurde nach der Methode von O'Farrell [187] mit Modifikationen nach Eckerskorn [188] durchgeführt. Bei der IEF nutzt man die Amphoterie von Proteinen aus [189]. Jedes Protein zeichnet sich durch seinen charakteristischen IP aus, an dem die Nettoladung des Proteins gleich Null ist.

Für die Durchführung der IEF [190] wurden in dieser Arbeit sogenannte IPG-Strips der Firma Amersham Biotech verwendet. Bei ihrer Herstellung werden Immobiline in das Gel einpolymerisiert. Immobiline sind eine Gruppe von bifunktionellen Acrylamidderivaten mit verschiedenen pKa-Werten. Sie gewährleisten einen stabilen pH-Gradienten. Hier wurden 13 cm lange Strips, die einen pH-Bereich von 3 – 10 umfassen, verwendet. In einem ersten vorbereitenden Schritt müssen sie rehydratisiert werden<sup>9</sup>. Die Probe wird dabei dem Rehydratisierungspuffer zugesetzt. Die Fokussierung erfolgte nach einem Zeitprogramm, in dem schrittweise die Spannung erhöht wurde. Nach der IEF wurden die IPG-Strips auf denaturierende Bedingungen äquilibriert<sup>10</sup> und auf ein Glycin-SDS-Gel transferiert. Die anschließende Gelelektrophorese erfolgte nach der Methode von Lämmli.

### 3.5.4 Differentielle Zentrifugation

Um ein Proteingemisch in seine Zellorganellen zu trennen, wird eine Differentielle Zentrifugation durchgeführt. Dabei werden die unterschiedlichen Größen und Dichten der zu trennenden Komponenten ausgenutzt. In einem Festwinkelrotor umläuft die Probe mit konstanter Winkelgeschwindigkeit eine feststehende Achse. Durch eine Erhöhung der Drehzahl in aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten kann ein komplexes Proteingemisch fraktioniert werden. Für die Differentielle Zentrifugation wurde das Pellet nach  $120\,000 \times g$  Zentrifugation resuspendiert und mit sucrosehaltigem Puffer<sup>11</sup> unterschichtet. Dieser Ansatz wurde für 10 Minuten bei  $1\,000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in zwei aufeinanderfolgenden Waschschritten<sup>12,13</sup> gewaschen. Das nun saubere Pellet enthielt die Zellkerne. Die nachfolgenden Zentri-

<sup>9</sup>Rehydratisierungspuffer: 8 M Harnstoff, 2%(w/v) CHAPS

<sup>10</sup>SDS-Äquilibrierungspuffer: 50 mM Tris pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30%(v/v) Glycerol, 2%(w/v) SDS

<sup>11</sup>sucrosehaltiger Puffer: 0,25 mM Sucrose und 5 mM  $\text{MgCl}_2$  in 20 mM Tris/HCl pH 7.4

<sup>12</sup>Waschpuffer 1: 0,5% Triton-X100 in 50 mM Tris pH 7.4

<sup>13</sup>Waschpuffer 2: 20 mM DTT in 50 mM Tris pH 7.4

fugationen wurden in einer Vakuumzentrifuge ausgeführt. Der erhaltene Überstand der ersten Zentrifugation wurde in einem zweiten Schritt bei  $10\,000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert und das gewonnene Pellet zweimal gewaschen<sup>14,15</sup>. Diese Fraktion enthielt die Mitochondrien. Aus dem Überstand des zweiten Zentrifugationsschrittes wurde durch eine letzte Zentrifugation bei  $120\,000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$  eine Mikrosomenfraktion pelletiert, die ebenfalls gewaschen wurde<sup>16</sup>.

#### 3.5.5 Western-Blot

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden auf eine Membran übertragen [191]. Anschließend konnten die gesuchten Proteine durch die Immunreaktion mit ihrem spezifischen Antikörper erkannt und durch die Reaktion eines gekoppelten Agens detektiert werden. In der Regel wird mit einem sekundären Antikörper, der mit Peroxidase oder einem Fluorophor gekoppelt ist, im Dunkeln inkubiert und dieser anschließend detektiert. Es wurde ein "Sandwich" aus puffergetränktem Filterpapier<sup>17</sup>, dem Gel und der Nitrocellulosemembran aufgebaut. Bei  $1\text{ mA/cm}^2$  wurde 2 Stunden lang geblottet. Nach Blocken unbesetzter Bindungsstellen der Membran<sup>18</sup> wurde mehrfach mit PBP<sup>19</sup> gewaschen. Anschließend wurde mit einem primären Antikörper für 2 Stunden inkubiert. Nach wiederholten Waschschritten wurde für 2 Stunden mit einem sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper inkubiert. Zur Detektion wurde ein System, welches auf Chemilumineszenz basiert (ECL<sup>TM</sup>, Amersham), verwendet. Wahlweise wurde ein sekundärer Antikörper mit gekoppeltem Fluorophor genutzt. Die Fluoreszenz wurde dann mit Odyssey® (LI-COR, Bad Homburg) gescannt.

#### 3.5.6 Peptid-Antikörper gegen SelP

Der Antikörper zur Detektion von SelP wurde von Dr. U. Schweizer (AG Neurobiologie des Selen, Neurowissenschaftliches Forschungszentrum, Charité) zur Verfügung gestellt [179]. Als Antigen wurde das Fragment  $\text{H}_2\text{N-SKPSENQQPGPSETAC-COOH}$  der Cysteinmutante des humanen Selenoprotein P (AA 221-AA 237) rekombinant hergestellt. Nach Immunisierung eines Kaninchens wurde Antiserum gewonnen, das direkt in einer Verdünnung von 1 : 5 000 verwendet wurde.

---

<sup>14</sup>Waschpuffer 3: 0,1 % Triton-X 100 in 100 mM Tris pH 7.4

<sup>15</sup>Waschpuffer 4: 20 mM DTT in 100 mM Tris pH 7.4

<sup>16</sup>Waschpuffer 5: 150 mM Tris pH 7.4

<sup>17</sup>Blotpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol

<sup>18</sup>Block-Puffer: 5 % (v/v) dry Milk in PBS

<sup>19</sup>PBS: 130 mM NaCl, 3 mM KCl, 6,4 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,4 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , pH 7.4

### 3.5.7 Dialyse

Zur Entfernung von Salzen sowie von niedermolekularen Verbindungen oder zum Umpuffern von Proteinlösungen wurde die Dialyse eingesetzt. Es wurden semipermeable Cellulosemembranen mit definiertem cut-off verwendet. Die Probenlösung wurde in einen Dialyse-Schlauch eingefüllt, der an beiden Enden verschlossen und in ein großes Volumen mit entsprechendem Puffer gehängt wurde. Moleküle, die mit ihrer Größe über dem cut-off liegen, wurden zurückgehalten, kleinere Moleküle konnten entsprechend ihres osmotischen Druckes durch die Membran diffundieren. Der Dialysepuffer wurde während des Dialysevorgangs gerührt.

### 3.5.8 Färbemethoden für Polyacrylamidgele

#### 3.5.8.1 Coomassie-Färbung

Zur Färbung von Proteinen im Gel wurde überwiegend der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G 250 verwendet. Er bindet im sauren Milieu an kationische, unpolare Seitenketten im Protein. Im Anschluss an eine Elektrophorese wurden die Gele für 30 – 40 Minuten mit Coomassie-Färbelösung<sup>20</sup> unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Hintergrund in mehreren Schritten entfärbt<sup>21</sup>. Man erreicht mit dieser Proteinfärbung Nachweisgrenzen von bis zu 0,1  $\mu\text{g}$  Protein.

#### 3.5.8.2 Silberfärbung nach Rabilloud

Bei dieser Färbemethode werden die Gele in Silbernitrat-Lösung inkubiert. Dabei bilden sich an den Proteinen aber auch in der Gelmatrix Silberkeime. In einem nachfolgenden Schritt werden diese mit einem starken Reduktionsmittel zu metallischem Silber reduziert [192]. Die Gele wurden nach der Elektrophorese für mindesten 4 Stunden in Fixierer-Lösung fixiert. Nach mehreren Waschschrinen wurde nach kurzer Sensitivierung in 1,2 mM Natriumthiosulfat-Lösung  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  für eine Stunde in silbernitratthaltiger Lösung<sup>22</sup> inkubiert. Nach Waschen erfolgte die Reduktion<sup>23</sup>, die unter Sichtkontrolle gestoppt wurde.

<sup>20</sup>Coomassie-Färbelösung 30 %(v/v) Ethanol, 10 %(v/v) Essigsäure, 0,2 %(w/v) Coomassie Blue G 250

<sup>21</sup>Fixierer:30 %(v/v) Ethanol, 10 %(v/v) Essigsäure

<sup>22</sup>12 mM  $\text{AgNO}_3$ , 0,06 %(v/v) Formaldehyd

<sup>23</sup>3 %(w/v)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 0,03 %(v/v) Formaldehyd und 70  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

### 3.5.9 Trocknung der Gele

Eine Trocknung der Gele der elektrophoretisch getrennten Selenoproteine ist für die anschließende Detektion mittels Image-Platte zwingend notwendig. Zum einen darf die Image-Platte nicht mit dem feuchtem Gel in Berührung kommen, zum anderen kann damit auch die Ortsauflösung der Autoradiographie gesteigert werden. Durch den Trocknungsvorgang bei Unterdruck wird die Dicke der Gele von 1,5 mm auf ca. 0,8 mm reduziert. Dadurch wird der vorhandene Radiotracer angereichert und die Höhe seines Strahlungskegels verringert. Die gefärbten Gele wurden zur Vorbereitung auf den Trocknungsvorgang in glycerolhaltiger Lösung<sup>24</sup> inkubiert. Sie wurden dann in einer Cellophanfolie eingeschlagen und bei 70 – 80 °C getrocknet.

### 3.5.10 Datenverarbeitung

Diese Arbeit wurde mit dem Textsatzsystem  $\text{\LaTeX} 2_{\epsilon}$  ([www.miktex.org](http://www.miktex.org)) mit Hilfe des  $\text{\LaTeX}$ -Editors *TeXnicCenter 1 Beta 6.31* ([www.toolscenter.org](http://www.toolscenter.org)) und der Bib $\text{\TeX}$ -Verwaltung *JabRef 1.8* ([www.jabref.org](http://www.jabref.org)) erstellt. Die Auswertung der aus den Image-Platten erhaltenen Daten wurden mit dem Programm AIDA 2.43 (Raytest, Straubenheim) durchgeführt. Die dargestellten Graphiken wurden mit *MS PowerPoint*, *MS Excel* und *Microcal Origin* (Microsoft, Unterschleißheim bzw. Microcal Software Inc., Northhampton – USA) erstellt, sowie mit den freien Bildverarbeitungsprogrammen *The Gimp* ([www.gimp.org](http://www.gimp.org)) und *jPicEdt 1.4* ([www.jpicedt.org](http://www.jpicedt.org)) bearbeitet.

Die Sequenzen der publizierten Selenoproteine wurden aus der Datenbank *NCBI* ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) abgerufen. Die Kalkulation der Molekularmassen und IP-Werte wurden mit Hilfe der Sekundärdatenbank *EXPASY* ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) durchgeführt.

---

<sup>24</sup>5 %(v/v) Ethanol, 7 %(v/v) Essigsäure, 10 %(v/v) Glycerol