

**Untersuchungen zur Identifizierung und Lokalisierung von  
Metallo- und Selenoproteinen in der Prostata und in Human-  
Prostata Zell-Linien**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
Der Freien Universität Berlin**

**Vorgelegt von**

**Igor Grbavac  
aus Berlin**

**Mai, 2008**

Gutachter der eingereichten Dissertation:

1. Gutachter: Prof. Dietrich Behne
2. Gutachter: Prof. Ulrich Abram

Disputation am:

Lehre mich heilsame Einsicht und Erkenntnis; denn ich glaube deinen Geboten.(Psalter 119,66)

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe „Spurenelementforschung in den Biowissenschaften (SF 6)“ am Hahn-Meitner-Institut in Berlin angefertigt.

An erster Stelle möchte ich Prof. Dietrich Behne und Prof. Ulrich Abram dafür danken, dass sie sich bereit erklärt haben die hier vorliegende Dissertation zu begutachten.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Antonios Kyriakopoulos dafür bedanken, dass ich die Möglichkeit hatte meine Dissertation in seiner Abteilung SF6 des HMI anzufertigen. Mit Interesse verfolgte er das Voranschreiten dieser von ihm vorgeschlagenen Arbeit und beteiligte sich durch kontroverse Diskussionen und Empfehlungen in hohem Maße am Erfolg dieser Dissertation.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen vorbildlichen Arbeitskollegen für ihre Ratschläge und Instruktionen beim Erlernen neuer Techniken.

Hervorheben möchte ich hierbei Dr. D. Alber und die INAA-Gruppe für die Bestrahlung der untersuchten Proben und die Auswertung der erhaltenen Gammasppektren.

Herrn Dr. M. Kühbacher danke ich für die zusammen durchgeführten Markierungsversuche an dem Tiermodell Ratte.

Auch Dr. C. Wolf möchte ich sehr herzlich für die Instruktionen beim Betrieb der SEC und ICP-MS danken.

Frau A. Gaebert danke ich für die Hilfe beim Umgang mit Zelllinien und für die Erklärung verschiedener biochemischer Verfahren.

Auch Herrn T. Bartz danke ich für seine Hilfe bei den Messungen mit der AAS.

Des Weiteren danke ich Herrn. J. Franke und Dr. G. Niggemann für die Tierhaltung und Tierpräparation vom Benjamin Franklin Krankenhaus / Charite.

# Inhaltsangabe

	Seite:
Abkürzungen und Einheiten.....	4
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1. Spurenelemente – Allgemeine Einleitung.....	5
1.1.2. Bedeutung von Spurenelementen in Organismen.....	5
1.1.3. Eigenschaften und Vorkommen der untersuchten Spurenelemente.....	5
1.2. Selenocystein.....	8
1.3. Selenoproteine und Selen bindende Proteine.....	9
1.4. Die Prostata.....	10
1.4.1. Prostatakrebs und Einfluss von Spurenelementen auf Prostatakrebs.....	11
<b>2. Material</b> .....	<b>13</b>
2.1. Chemikalien.....	13
2.2. Geräte.....	14
2.3. Versuchstiere.....	15
2.4. Humane Prostatakarzinomzelllinie DU145.....	16
2.5. Probenvorbereitung.....	16
2.5.1. Radioaktive Markierung.....	16
2.5.2. Mortalisierung, Probenentnahme und Frostung der Versuchstiere.....	17
2.5.3. Kryoschnitte.....	17
<b>3. Aufgabenstellung</b> .....	<b>18</b>
<b>4. Methoden</b> .....	<b>19</b>
4.1. Homogenisierung.....	19
4.2. Subzelluläre Fraktionierung durch differentielle Zentrifugation.....	19
4.3. Mikrowellenaufschlüsse.....	21
4.4. Analytische Methoden.....	21
4.4.1. Messung radioaktiver Substanzen mit dem NaI-Detektor.....	21
4.4.2. Instrumentelle Neutronenaktivierungsanalyse (INAA).....	21
4.4.3. Induktiv gekoppelte Plasmamassenspektroskopie (ICP-MS).....	22
4.4.4. Größenausschlusschromatographie (Size exclusion chromatography SEC).....	23
4.4.5. Elektrothermale Atom-absorptions-spetrometrie (ET-AAS).....	24
4.4.6. Autoradiographie.....	25
4.4.7. Autoradiographie mittels $\mu$ -imager.....	25
4.5. Allgemeine Methoden.....	25
4.5.1. Die Gleichgewichts-Dialyse.....	25
4.5.2. Einengen von Proben mittels Speed-Vac.....	26
4.6. Biochemische Standardmethoden.....	26
4.6.1. SDS-Gelelektrophorese nach Lämmli.....	26
4.6.2. Die zweidimensionale Elektrophorese (2D-E).....	27
4.6.3. Zweidimensionale Gelelektrophorese mit mobilem Gradienten (NEPHGE).....	27
Groß-Gele	
4.6.4. Proteinbestimmung nach Bradford.....	28
4.6.5. Gel-Trocknung.....	29
4.6.6. Westernblot.....	29
4.7. Nachweismethoden.....	30

	Seite:
4.7.1. Die Gelfärbung.....	30
4.7.2. Silberfärbung.....	30
4.7.3. Coomassie-Färbung.....	30
4.7.4. Antikörpertests.....	30
4.7.5. Chemilumineszenznachweis.....	31
4.7.6. Detektion nach Odyssee.....	31
4.7.7. Proteinsequenzierung mittels MALDI-MS.....	32
4.7.8. Hämalaun-Eosin-Färbung von Dünnschnitten.....	32
<b>5. Ergebnisse.....</b>	<b>33</b>
5.1. Analytische Untersuchungen.....	33
5.1.1. Spurenelementgehaltbestimmung mittels INAA.....	33
5.1.2. Spurenelementgehaltbestimmung mittels AAS.....	35
5.1.2.1. Spurenelementbestimmung in den Zytosolen mit der AAS.....	37
5.1.3. Spurenelementgehaltbestimmungen mittels ICP-MS.....	39
<b>Zusammenfassung von Kapitel 5.1: Analytische Untersuchungen</b> .....	<b>42</b>
<b>(Spurenelementgehaltsbestimmung)</b>	
5.2. Chromatographisch- analytische Untersuchungen.....	45
5.2.1. Detektion von spurenelementhaltigen Proteinen im Gewebezcytosol der .....	45
Prostata mit Hilfe der SEC-ICP-MS	
5.2.2. Trennung und Nachweis proteingebundener Radiotracer.....	54
5.2.3. Autoradiographie von Dünnschnitten von unterschiedlich markierten .....	57
Organen	
5.2.4. Einfluss von Metallen auf das Wachstum von humanen .....	59
Prostatakarzinomzellen (Du145)	
5.2.5. Detektion von Spurenelementproteinen in den Zytosolen der metall-.....	60
inkubierten Zellen der humanen Prostatakarzinomzelllinie DU145	
<b>Zusammenfassung von Kapitel 5.2: Chromatographisch- analytische</b> .....	<b>65</b>
<b>Untersuchungen</b>	
5.3. Biochemische Trennverfahren und Autoradiographie.....	68
5.3.1. Auftrennung der <sup>75</sup> Se-Proteine in den Homogenaten und Zytosolen .....	68
verschiedener Gewebe mittels SDS-PAGE und Detektion des Tracers durch	
Autoradiographie	
5.3.2. Vergleich der Selenoproteinverteilung in den subzellulären Fraktionen der .....	70
Prostata von Tieren mit unterschiedlicher Selendiät	
5.3.3. Untersuchungen zu der Selenoproteinverteilung in den subzellulären Frak-.....	74
tionen der Prostata mittels 2D-Gelelektrophorese und Autoradiographie	
<b>Zusammenfassung von Kapitel 5.3: Biochemische Trennverfahren und</b> .....	<b>82</b>
<b>Autoradiographie</b>	
5.4. Unterschiede des Rattenprostataproteoms in Abhängigkeit vom Selenstatus: .....	85
Lokalisation und Identifizierung	
5.4.1. Untersuchung der Proteinexpression in den subzellulären Fraktionen der .....	85
Rattenprostata abhängig von der Selendiät mittels NEPHGE	
5.4.2. Analyse der vom Selenstatus abhängigen Proteine der Rattenprostata mittels ....	87
MALDI-MS	
<b>Zusammenfassung von Kapitel 5.4: Unterschiede des Rattenprostataproteoms in</b> .....	<b>92</b>
<b>Abhängigkeit vom Selenstatus: Lokalisation und Identifizierung</b>	

	Seite:
5.5. Detektion und Lokalisation von Spurenelementproteinen mittels Immunotests .....	94
5.5.1. Immunochemischer Nachweis von Selenoprotein P (SeP) in der Rattenprostata...	94
5.5.2. Immunochemischer Nachweis von cGPx in der Rattenprostata.....	95
5.5.3. Immunochemischer Nachweis des sauren 15 kDa- Selenoproteins in der .....	96
Rattenprostata	
5.5.4. Immunochemischer Nachweis von Selenoprotein T (Sel T) in der Rattenprostata	97
5.5.5. Immunochemischer Nachweis von Superoxid dismutase (SOD) in der Ratten-....	98
prostata	
5.5.6. Immunochemischer Nachweis von Metallothionein (MT) in der Rattenprostata...	99
5.5.7. Immunochemischer Nachweis von Lysyl oxidase (LOX) in der Ratten-.....	100
prostata	
5.5.8. Immunochemischer Nachweis von Dermatopontin (DPT) in der .....	101
Rattenprostata	
<b><i>Zusammenfassung von Kapitel 5.5: Detektion und Lokalisation von Spuren-</i></b> .....	<b>102</b>
<b><i>elementproteinen mittels Immunotests</i></b>	
5.6. Identifizierung und Charakterisierung des Proteins Dermatopontin als .....	104
kupferbindendes Protein	
<b>6. Diskussion</b> .....	<b>106</b>
<b>7.1. Zusammenfassung</b> .....	<b>114</b>
7.2. Summary.....	116
<b>8. Literaturangaben</b> .....	<b>118</b>

## Abkürzungen

DNS	Desoxyribonukleinsäure
PSE	Periodensystem der Elemente
SOD	Superoxid dismutase
ADH	Alkoholdehydrogenase
pK <sub>a</sub> -Wert	neg. dekad. Logarithmus d. Säuregleichgewichtskonstanten
SECIS	Selenocystein-Einbau-Sequenz
SELB	Elongationsfaktor
tRNA <sup>Sec</sup>	selenylierte transfer-Ribonukleinsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
ATP	Adenosintriphosphat
(c)GPx	(zytosolische) Glutathionperoxidase
Trx	Thioredoxinreduktase
PHGPx	Phospholipid-hydroperoxid-glutathionperoxidase
AMP	Adenosinmonophosphat
Sel T	Selenoprotein T
SeP	Selenoprotein P
Se(-/+)	Selen-unterversorgt/überversorgt
PBS	phosphate buffered solution
t <sub>1/2</sub>	Halbwertszeit
EC	electron capture
SDS	Sodiumdodecylsulphate
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
2D	zweidimensional
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation
INAA	Massenspektrometrie
DBVK/R	instrumentelle Neutronenaktivierungsanalyse
(ET-)AAS	Drehbare Bestrahlungseinrichtung Reflektor/Kern
HKL	(elektrothermale) Atomabsorptionsspektrometrie
ICP-MS	Hohlkathodenlampe
ER	induktiv gekoppelte Plasmamassenspektrometrie
HPLC	Endoplasmatisches Retikulum
SEC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatografie
cps/m	Größenausschlusschromatographie
IEF	counts per second/ minute
IP	isoelektrische Fokussierung
NEPHGE	Isoelektrischer Punkt
Da	Non Equilibrium pH Gradient Electrophoresis
MW	Dalton
b.d.l.	Molekulargewicht
Cbr 3	below detection limit
PDI	Carbonyl- Reduktase 3
gp 96	Vorstufe Disulfid-Isomerase
LOX	Tumor-Abwehr Antigen 96
DPT	Lysyl oxidase
MT	Dermatopontin
	Metallothionein

# 1. Einleitung

## 1.1. Spurenelemente – Allgemeine Einleitung

Zu einer ausgewogenen Ernährung zählen neben Fetten, Kohlenhydraten, Proteinen, Vitaminen auch Mineralstoffe. Diese Mineralstoffe kommen als Mengenelemente und/oder als Spurenelemente vor. Von den Mengenelementen ist bekannt, dass eine tägliche Zufuhr von mindestens 100mg notwendig ist, um keine Mangelerscheinungen zu bekommen. Spurenelemente hingegen kommen in Konzentrationen von weniger als 60 mg je Kilogramm Körpermasse im Organismus vor (1) und sind nicht immer essentiell sondern sogar schädlich. Eine Überdosierung von einem Spurenelement wie Blei oder Quecksilber führt immer zu toxischen Krankheitsbildern. Zu den essentiellen Spurenelementen gehören neben Anderen die untersuchten Elemente Kupfer (2), Zink (3), Nickel (4), Kobalt (5), Mangan (6) und Selen (7).

### 1.1.2 Bedeutung von Spurenelementen in Organismen

Spurenelemente sind meist an Proteine gebunden, deren tertiäre oder quartäre Struktur sie stabilisieren und dadurch die Funktion der Proteine ermöglichen. Hierbei sind die metallischen Spurenelemente meist im aktiven Zentrum komplex gebunden, wo sie auch dem Substrat als Bindungsstelle dienen (8). Nichtmetallische Spurenelemente wie Selen oder Jod sind kovalent wie z.B. in Selenoproteinen oder Thyroxin, welches ein Schilddrüsenhormon ist, gebunden (9, 10). Das Selen wird co-translational in Form von Selenocystein, welches als die 21. Aminosäure bezeichnet wird, in Selenoproteine eingebaut. Ihre physiologische Bedeutung tritt besonders in ihrer Funktion als Stärkung der Immunabwehr, Aufrechterhaltung der Fertilität (11), dem Einfang freier Radikale oder der Reduktion von Stoffen, die oxidativen Stress auslösen und somit Krebs wie z.B. Prostatakrebs auslösen könnten. Das Spurenelement Zink ist in Form von Zinkfinger-Proteinen bei der Genexpression beteiligt. Hierbei spielen die Zinkfinger-Proteine eine Rolle als Transkriptionsfaktoren, wobei sie an die DNS binden und den Transkriptionsvorgang initiieren (12).

### 1.1.3. Eigenschaften und Vorkommen der untersuchten Spurenelemente

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden außer dem Selen die Spurenelemente Mangan, Kobalt, Nickel, Kupfer, Arsen, Cadmium und Zink untersucht.

Mangan ist ein Übergangsmetall mit der Ordnungszahl 24 und steht in der 7. Gruppe im PSE. Es kommt natürlich nur als  $^{55}_{25}\text{Mn}$  vor.

Im Organismus kommt es in einer Konzentration von durchschnittlich 0,3 mg/kg vor und ist Bestandteil einiger Co-faktoren bestimmter Enzyme. Diese Enzyme wiederum katalysieren Phospholierungen und die Synthese von Cholesterin und Blutgerinnungsfaktoren. Es schützt des Weiteren den Organismus vor oxidativem Stress in Form der MnSOD (13). Ein Mangel äußert sich u.a. in Störungen des Fett- und Sexualhormonstoffwechsels (14, 15).

Das Übergangsmetall Kobalt mit der Ordnungszahl 27 und der Masse 59 steht in der 9. Gruppe des PSE zwischen Eisen und Nickel und ist wie diese ferromagnetisch. 1735 entdeckte der Schwede Georg Brandt das Element. Doch bereits seit dem Mittelalter sind dessen arsenhaltige Erze bekannt. Kobalterze treten häufig zusammen mit Nickelerzen auf.

Physiologisch ist nur das Cobalamin oder Vitamin B12 von Relevanz, welches durch Darmbakterien synthetisiert wird. Ein Mangel an Cobalamin führt zu Anämie und neurologischen Schäden (15). Ein Überschuss an Kobalt führt u.a. zu Herzmuskelschwäche (16).

Im PSE hat Nickel die Ordnungszahl 28 und steht zwischen Kupfer und Kobalt. Es kommt natürlich in fünf stabilen Isotopen vor, von denen diejenigen mit den Massen von 58 und 60 am häufigsten auftreten.

Zusammen mit Eisen kommt Nickel u.a. in Hydrogenasen auf. Unklar ist hierbei ob das Nickel darin notwendig oder ersatzweise anstelle von Eisen vorkommt (17).

Das Übergangsmetall Kupfer mit der Ordnungszahl 29 kommt natürlich in den beiden Isotopen  $^{63}_{29}\text{Cu}$  und  $^{65}_{29}\text{Cu}$  vor, zählt zu den Edelmetallen und ist sehr duktil. Bereits seit der Antike wird Kupfer mit Zink zu Messing legiert (14).

Im Körper kommt Kupfer zu etwa 3 mg/kg Körpergewicht bei Erwachsenen vor und ist größtenteils an Proteine gebunden. Zahlreiche dieser kupferbindenden Metalloproteine sind essentiell und haben Schlüsselfunktionen u.a. bei der Bindegewebsbildung (Lysyl oxidase (18, 19, 20)) oder dem Schutz vor oxidativem Stress (Superoxid dismutase (21)). Ein Mangel an Kupfer zeigt verschiedenste Krankheitsbilder, äußert sich aber vor allem in Störungen des zentralen Nervensystems und der Bildung von Elastin, Kollagen und Hämoglobin. Des weiteren spielt Kupfer eine immens wichtige Rolle bei der Funktion des Prion-Proteins, welches in Zusammenhang mit der neurologischen Krankheit Morbus Alzheimer steht (21, 22).

Zink hat die Ordnungszahl 30 und kommt in fünf Isotopen vor von denen  ${}^{64}_{30}\text{Zn}$ ,  ${}^{60}_{30}\text{Zn}$  und  ${}^{68}_{30}\text{Zn}$  die wichtigsten sind (14).

Im Organismus ist eine durchschnittliche Konzentration von ca. 40 mg/kg Zink vorhanden. Physiologisch gesehen ist Zink eines der wichtigsten Spurenelemente, da es in vielen Enzymen als aktives Zentrum vorkommt (13). Zinkmangel führt unter anderem zu Störungen des Immunsystems, Veränderungen des Haut- und Knochenbaus, Wachstumsstörungen und Störungen der psychomotorischen Entwicklung (23). Als Teil des aktiven Zentrums in der Alkoholdehydrogenase (ADH) ist Zink ein Bestandteil eines wichtigen Proteins der Detoxifikation von Ethanol (24).

1817 wurde Cadmium als Verunreinigung von Zinkcarbonat von F. Strohmeyer und C.S. Hermann entdeckt. Es ist das letzte Element in der zweiten Übergangsmetallreihe und hat die Ordnungszahl 48 in der 12. Gruppe. Cadmium verhält sich ähnlich wie Zink und kommt ausschliesslich als Verunreinigung in Zinkerzen vor. Im Gegensatz zu Zink sind die Oxide des Cadmiums sehr giftig. Es gibt insgesamt acht stabile Isotope des Cadmiums, wovon die häufigsten Nuklearmassen zwischen 110-114 haben (14).

Das Halbmetall Arsen hat die Ordnungszahl 33 und ist in der 15 Gruppe direkt unter Phosphor und neben Selen. Es ist seit dem Altertum bekannt und kommt sowohl kationisch als Arsensulfid als auch anionisch als Arsenid vor. Es gibt vom Arsen nur ein stabiles Isotop mit der Nuklearmasse 75 (14).

Bisher sind keine physiologisch relevanten Arsenverbindungen bekannt, aber es wird auf Grund der Ähnlichkeit zu Selen, welches einige Selenoproteine bildet, vermutet, dass auch Arsen essentiell sein könnte. Des weiteren ist bekannt, dass Arsen durchschnittlich 1 µg/kg ubiquitär im Organismus vorkommt. Dafür sind zahlreiche Krankheiten bekannt, die durch eine erhöhte Arsenkonzentration im Körper hervorgerufen werden. Hierzu zählt die „blackfoot“-Krankheit, die das Absterben von Gliedmaßen als Folge von Schädigungen der Haut und Blutgefässen hat (25).

Das dem Schwefel in seinen Eigenschaften sehr ähnliche Selen hat die Ordnungszahl 34 und kommt natürlich in den sechs Isotopen  ${}^{74}_{34}\text{Se}$ ,  ${}^{76}_{34}\text{Se}$ ,  ${}^{77}_{34}\text{Se}$ ,  ${}^{78}_{34}\text{Se}$ ,  ${}^{80}_{34}\text{Se}$ ,  ${}^{82}_{34}\text{Se}$  vor. Es ist ein Halbmetall aus der 16. Gruppe und zeigt sich in der Natur in elementarer Form oder kationischer Form als Selenit, Selenat und Selenid (26).

Selen kommt im menschlichen Körper in einer Konzentration von 3-20 mg vor, wobei es größtenteils gebunden in Form von Selen bindenden Proteinen oder Selenoproteinen vorliegt. Selen wird durch die verschiedenen Därme resorbiert und analog dem Schwefel in die Aminosäuren Selenocystein und Selenomethionin eingebaut. Nur in Form von Selenocystein hat Selen eine eigenständige Funktion in Enzymen, wohingegen es in Form von Selenomethionin die selben Funktionen hat wie Schwefel. Diese Selenoenzyme haben u.a. protektive Eigenschaften in Bezug auf oxidativen Stress (27) oder Einfluss auf Schilddrüsenhormone (10, 28, 29). Die Resorption von Selen wird durch das Vitamin E gefördert. Bei einem Mangel an Selen im Organismus treten verschiedene Krankheitsbilder auf. Die Keshan-Krankheit ist eine in China auftretende Herzmuskelschwäche, die aus dem Verzehr der regional angebauten und sehr selenarmen Feldfrüchte resultiert (30). Eine andere Auswirkung des Selenmangels kann im verminderten Knochenbau bei Kindern beobachtet werden, was als Kashin-Beck-disease bekannt ist (31).

Allerdings ist eine Selenzufuhr von mehr als 300 mg am Tag zu vermeiden, da es ansonsten toxisch wirkt und zu Haarausfall, Ermüdung, Reizbarkeit, Übelkeit, Erbrechen und Zyanose führen kann, obwohl inzwischen eine Bandlung mit hochdosiertem Selen zu therapeutischen Zwecken existiert.

## 1.2. Selenocystein

Charakteristisch für Selenoproteine und Selenoenzyme ist das Vorhandensein mindestens eines Selenocysteins in der Aminosäuresequenz des Proteins. Es ist ein Homologes zu dem Cystein, welches anstelle des Selens Schwefel bindet. In Relation zu Cystein besitzt Selenocystein einen kleineren  $pK_a$ -Wert von 5,2. Bei physiologischem pH liegt die Selenolgruppe vollständig dissoziiert vor, wohingegen beim homologen Cystein die Thiolgruppe nur teilweise dissoziiert vorliegt (32). Von allen anderen Aminosäuren unterscheidet sich Selenocystein vor allem durch seine co-translationale Synthese und einen eigenen Elongationsfaktor. Das bisher als Stopcodon geltende Triplet UGA wird alternativ für den Selenocysteineinbau decodiert. Charakteristisch für den Selenocysteineinbau sind das SECIS-Element und das SELB. Beide Teile zusammen sind verantwortlich für die richtige Decodierung des Stopcodons auf der mRNA.

Die t-RNA<sup>sec</sup> wird durch Katalyse von Seryl-Synthase mit Serin beladen. Anschliessend wird mit Selenophosphat und unter Katalyse durch Selenocystein-Synthetase der Serylrest in einen Selenocysteinrest umgewandelt. Unter ATP-Verbrauch wird aus Selenid in einer Selenophosphat-Synthetase katalysierten Reaktion das Selenophosphat gebildet. Zur Ausbildung des ternären Komplexes am Translationsort ist der Elongationsfaktor „SELB“ essentiell, was in

Bindungsstudien bewiesen wurde. In eukaryotischen Zellen sind einige der Schritte im Einbau des Selenocysteins in Proteine und der dazugehörigen Enzyme noch unbekannt. Bisher wurden einige t-RNA<sup>sec</sup> und eine Selenophosphat-Synthase (SPS2) charakterisiert. Das SECIS-Element liegt anders als bei prokaryotischen Zellen weiter entfernt vom Stop-Codon (33, 34).

### 1.3. Selenoproteine und selenbindende Proteine

Als Selenoproteine werden alle Proteine bezeichnet, die Selenocystein in ihrer Aminosäuresequenz enthalten. Selen bindende Proteine hingegen enthalten Selenomethionin, welches nicht spezifisch in Proteinsequenzen eingebaut wird sondern zufällig statt Methionin oder mit einer noch ungeklärten Bindungsform eingebaut wird (35). Die spezifischen Selenoproteine, welche die biologischen Funktionen des Selens ausüben, werden aus einem intermediären Selen-Pool versorgt. Die Menge der exprimierten Proteine unterliegt der Homöostase. Bei Versuchen mit Ratten, die einen Selenmangel hatten, wurde festgestellt, dass sowohl bestimmte Organe als auch bestimmte Selenoproteine einer Hierarchie unterliegen (36, 37).

Zu den Selenoproteinen gehören die drei großen Klassen der Glutathionperoxidasen (GPx), die Thioredoxinreduktasen (Trx) und die Deiodinasen. Daneben gibt es Selenoproteine deren Funktion noch unbekannt ist und die noch keine aussagekräftigen Namen besitzen. Die GPx werden vor allem nach ihrem Auftreten im Körper unterschieden, je nachdem ob es die Spermienkerne, das Plasma oder das Zytosol ist. Hierbei ist die zytosolische GPx (cGPx) diejenige die ubiquitär im Organismus vorkommt (38, 39). Die Funktion der cGPx ist es, Superoxide, die als Abfallstoffe bei der Energiegewinnung in den Mitochondrien anfallen, in nicht schädliche Stoffe zu reduzieren. Die einzigen schädlichen Peroxide, die die cGPx nicht reduzieren kann, sind die Phospholipidperoxide. Diese Funktion hat jedoch die Phospholipidhydroperoxid-glutathionperoxidase (PHGPx) inne (40).

Die Thioredoxinreduktasen katalysieren die Reduktion von Thioredoxin, welches das Redoxgleichgewicht in den Zellen reguliert. Daher sind die Trx ubiquitär in den Zellen vorhanden (41, 42).

Die dritte grosse Gruppe der Selenoproteine, die Deiodinasen, katalysieren die spezifische Abtrennung eines Iodatoms aus dem Thyroxin, um das Trijodthyronin als aktive Form des Schilddrüsenhormons zu erhalten (43, 44) und die spätere Deaktivierung des Hormons (45) herbeizuführen.

Von keinem weiteren Selenoprotein ausser der Selenophosphat-Synthase ist bekannt, welche Funktion das Selenoprotein hat, so dass sie nach ihrer Molekularmasse, ihrem Vorkommen oder

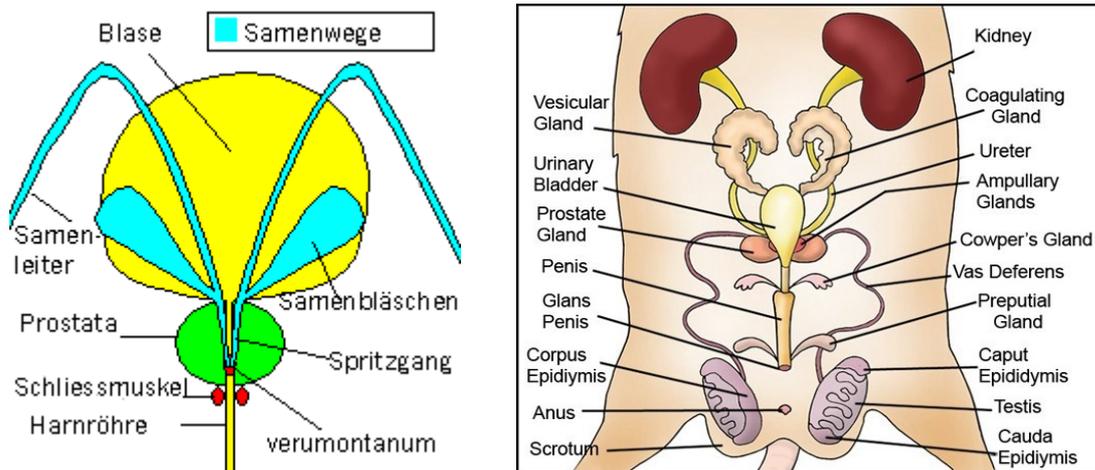
dem Alphabet benannt sind. Diese Selenophosphat-Synthetase katalysiert die Synthese von Selenophosphat aus Selenid und AMP (46). Dieses Selenophosphat wird wiederum für die Selenocysteinsynthese benötigt. Für andere Selenoproteine wird im Einzelfall eine Funktion vermutet, konnte aber bisher nicht bestätigt werden. Weitere hier untersuchte Selenoproteine waren das 18-kDa Selenoprotein (47), das saure 15-kDa Selenoprotein (48,49), das neutrale 15-kDa Selenoprotein (49), das prostataspezifische 15-kDa Selenoprotein (50), das Selenoprotein T (Sel T) (51) und das Selenoprotein P (SeP) (52, 53).

#### **1.4. Die Prostata**

Die Prostata ist Teil des männlichen Reproduktionsapparates und gehört zu den inneren männlichen Geschlechtsteilen, zu denen auch die Hoden, Nebenhoden, Bläschendrüsen und Samenleiter gehören. Zu den äußeren männlichen Geschlechtsteilen gehören der Hodensack und der Penis. Die humane Prostata, welche ca. 20g wiegt und die Form einer Kastanie besitzt, umschließt die Harnröhre direkt unter der Harnblase. Ausserdem liegt sie in der Nähe des Mastdarms, wo sie im Falle einer Erkrankung (Prostatitis, Prostatakrebs) durch den Arzt mit der „digitalen Untersuchung“ ertastet werden kann. Die auch als Vorsteherdrüse bekannte Prostata besteht aus ca. 40 einzelnen Drüsen, die durch eine Kapsel aus Bindegewebe umschlossen sind. Die Drüsen wiederum bestehen aus drei verschiedenen Zelltypen: Bindegewebszellen, Drüsenzellen und Stromazellen. Die einzelnen Drüsen sind wiederum von Bindegewebe umgeben, welches sie von Muskeln separiert. Dieses Muskelgewebe um die Drüsen soll das Prostatasekret bei der Ejakulation in die Harnröhre hinauspressen, wo auch die Samenleiter enden und den Spritzkanal bilden. Hier vermengen sich die Spermien mit dem Seminalplasma, welches zu ca. 75% aus dem Samenblasensekret und zu 25 % aus dem Prostatasekret besteht. Die Spermien machen nur ca. 5-10% des Ejakulats aus, während der Rest des Ejakulats das Seminalplasma ist. Das Sekret der Bläschendrüsen enthält vor allem Fruktose, Phosphorylcholin und Ascorbat, welche die Spermien mit Nährstoffen versorgen, wohingegen das Prostatasekret Cholesterin, Phospholipide und Proteasen sowie Spermin und Spermidin enthält, die das Sekret dünnflüssig halten sollen, so dass eine gute Motilität der Spermien gewährleistet wird.

Da es in dieser Arbeit nicht möglich war auf humane Gewebe in Form von Biopsien zurückzugreifen, wurden die Experimente an der Rattenprostata durchgeführt. Die Rattenprostata ist der humanen Prostata in ihrer Funktion und Beschaffenheit recht ähnlich. Der grösste Unterschied zwischen den Prostatas der beiden Spezies ist deren Form. Im Gegensatz zu der kastanienförmigen humanen Prostata hat die Rattenprostata eine Dreiteilung: ein Mittelstück und

zwei Loben. Während sich in den Loben ein grösserer Anteil an Drüsengewebe befindet, ist der Mittelteil größtenteils aus Bindegewebe beschaffen.



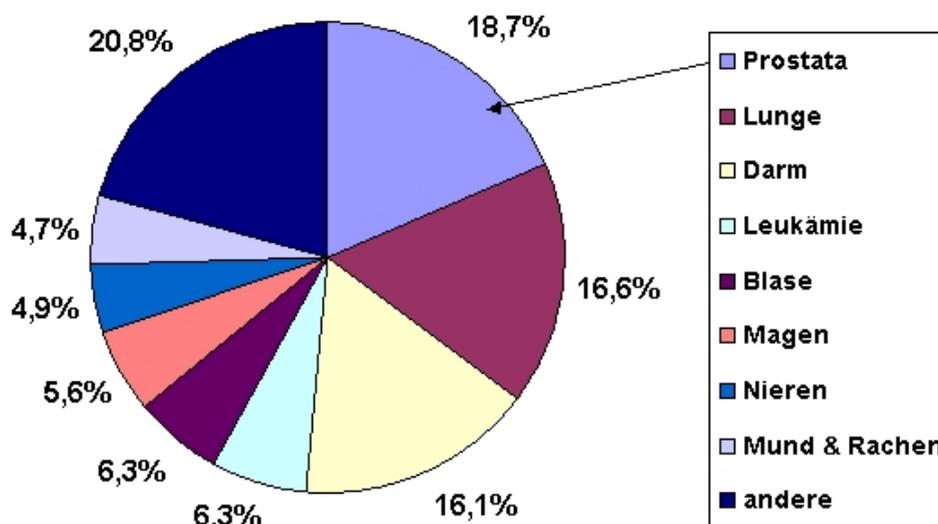
Graphiken 1 + 2: Diese beiden Schemata zeigen die humanen inneren Reproduktionsorgane, die um die Prostata lokalisiert sind (1 links) und die inneren Reproduktionsorgane des Rattenbocks (2 rechts).

Quelle: www.medizin-Forum.de ; Dr. Tarfusser

### 1.4.1. Prostatakrebs und Einfluss von Spurenelementen auf Prostatakrebs

Eine der häufigsten beim Mann vorkommenden Krebsformen ist der Prostatakrebs. Ähnlich wie das Drüsengewebe bei der Frau (Brust) ist beim Mann die Prostata das für Krebs anfälligste Organ.

**Prozentuale Verteilung der Krebsneuerkrankungen**



Graphik 3: Dieses Diagramm zeigt die prozentuale Verteilung der häufigsten Krebsneuerkrankungen bei Männern in Deutschland im Jahr 2002.

Quelle: Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. "Krebs in Deutschland" 3. erweiterte, aktualisierte Ausgabe Saarbrücken 2002

Die vorhergehende Graphik zeigt, dass die Hälfte aller Krebsneuerkrankungen durch Prostatakrebs, Lungenkrebs und Darmkrebs hervorgerufen wird. Trotz dieser Zahlen ist Prostatakrebs in nur wenigen Fällen tödlich, da die Prostata kein lebensnotwendiges Organ ist. Nur wenn das Prostatakarzinom Metastasen in anderen Organen bildet, ist es tödlich.

Es gibt einige Risikofaktoren wie oxidativen Stress, benigne Prostata Hyperplasie oder Prostatitis, die Prostatakrebs hervorrufen können. Es gibt aber auch Spurenelemente die einen Einfluss auf das Entstehen oder Verhindern von Prostatakrebs haben (54). Bei Spurenelementen wie Arsen (55, 56, 57) oder Cadmium (58, 59) ist bekannt, dass sie kanzerogen wirken und das Entstehen und das Wachstum von Neoplasmen induzieren und fördern. Eine herabgesetzte Konzentration von Zink (60) und/oder Selen (61) in der Prostata kann genauso einen Risikofaktor darstellen. Eine ausreichende Zufuhr dieser beiden Spurenelemente ist geradezu notwendig um Krebszellen abzutöten oder zu vermeiden. Zink in Form von Zinksalzen ist dafür bekannt, dass es die Apoptose in Krebszellen induziert, so dass diese absterben (62). Auch Selen (63, 64) und Kupfer (65, 66) wirken, nachweislich gegen Krebszellen. Aber besonders in organisch gebundener Form als aktives Zentrum in Proteinen sind Spurenelemente wie Selen (67), Zink oder Kupfer wirksam (68). Besonders Proteine wie die SOD (enthält Kupfer und Zink) und die GPx (enthält Selen) wirken u.a. gegen oxidativen Stress, der kanzerogen wirkt. Aber auch Proteine deren Funktion noch unbekannt ist wie das SeP fördern bei einem Mangel die Entstehung von Krebs (69).

Eine Überdosierung dieser Spurenelemente hingegen wirkt in einigen Fällen gegen den präventiven oder protektiven Effekt, den sie haben. So ist eine Überdosierung von Zink mit verantwortlich, dass aus der benignen Prostata Hyperplasie ein Tumor entstehen kann (70).

## 2. Material

### 2.1. Chemikalien

MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O		Sigma
CuCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O		Sigma
CdCl <sub>2</sub> * 5 H <sub>2</sub> O 98%		Sigma
CoCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	cell culture tested	Sigma
CaCl <sub>2</sub> *2 H <sub>2</sub> O	Analysegrad	Merck
NiCl <sub>2</sub>	Wasserfrei	Merck
MgCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O	Analysegrad	Merck
EDTA	Titriplex III <sup>®</sup>	Merck
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	Suprapur	Merck
AgNO <sub>3</sub>	Analysegrad	Merck
6-Aminohexansäure		Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *12 H <sub>2</sub> O		Merck
NaN <sub>3</sub>	Reinst	Merck
Harnstoff	für biochem. Zwecke	Merck
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Reinst	Merck
Essigsäure 100%		Merck
Ethanol	Absolut	Merck
Formaldehyd 37%		Merck
n-Butanol		Merck
NaCl	Reinst	Merck
NaHCO <sub>3</sub>		Merck
NaOH		Merck
HCl 37%		Merck
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>		Sigma
Bromphenolblau		Sigma
Dithiothreit 99 %		Sigma
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> >98 %		Roth
NaSCN		Fluka
Coomassie brilliant blue		Serva
Glycin		Serva
Harnstoff		Serva

PMSF		Sigma
SDS	kristallin	Serva
TEMED	reinst	Serva
TWEEN 20 Detergent	molekular biology grade	Calbiochem
Proteinmarker : Mark 12		Invitrogen
Nährmedium RPMI 1640 + L-Glutamin		GIBCO/Invitrogen

## 2.2.Geräte:

Blotkammer	BioRad Transfer Blot SD221 Br
Mikrowelle	Privilege 9023
Autoradiographische Platten	Fuji
Gefrierschrank	Colora UF 85-300S
Geltrockner	Biometra D62
Pumpe für den Geltrockner	Leybolt Divac 2.4 l
IEF-Kammer	Bromma Multiphor II 2117
IEF-Stromversorger	Amersham EPS 3501 XL
Kühlfalle der Speedvac	Jouan RTC60
Kühlschränke	Triter Hannover
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr Öko System
Gefrierschrank (-40°C)	Bosch GS 368T
Gefrierschränke (-80°C)	Heraeus instruments HFU 86
Multichannel analyser	Canberra Serie 35
NaI-Detektor	crismatic AS17
Stromversorger	Biometra High voltage power pack P30
Magnetrührer	IKA RTC
	IKA RET-G
	IKA MCT
pH-Meter	Knick 760 Calimatic
Photometer	Beckmann DU 650 Spectrophotometer
Pipetten	Eppendorf
Scanner für Autoradiographie	Fujifilm FLA-3000
Schüttler für Gelfärbungen	GFL 3016
	IKA KS 260 basic
Vakuumpumpen	Leybold-Heraeus mini A
Vortexer	Heidolph REAX 2000

Waagen	Mettler PC 440 Delta-range Mettler PE 2000 sartorius 1872
Thermoblock für Eppendorfgefäße	Biometra TB1 Thermoblock
Perestaltikpumpe	Ismatec IPN-8
Plastikküvetten für UV-VIS-spektrometer	Plastibrand PMMA
Scanner	UMAX Powerlook III
UV-VIS-spektrometer	Cary 50 BIO
Chromatographiesäulen	BioRad Econo Column
Chemoluminiszenz-Detektor	Odysses LI-COR 9120
Kühlschrank	Liebherr Kristall KGK 3584.1
Zentrifugen	Centricon T324 Eppendorf 5415C
Zentrifuge	Heraeus primo R
Ultrazentrifugen	Beckmann L8-70 Beckmann Optima MAX
Rotor der Ultrazentrifuge	Beckmann Ti-75
Zentrifuge der Speedvac $\mu$ -imager	Jouan RC10.22 Biospace

### 2.3. Versuchstiere

Für die Versuche mit Tieren wurden männliche Ratten vom Stamm Wistar (Charles River, WIGA GmbH, Sulzfeld) verwendet, die bei einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h im Universitäts-Klinikum Benjamin Franklin (Berlin) gehalten und mit einem speziell hergestellten Trockenfutter (ICN Pharmaceuticals, Cleveland, USA) ernährt, um einheitliche Zuchtbedingungen zu schaffen. Die Ratten wurden in zwei Gruppen aufgeteilt, die eine unterschiedliche Selendiät erhalten haben, ansonsten jedoch identische Bedingungen vorfanden. Das Futter enthielt auf der einen Seite ca. 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Selen und auf der anderen Seite ca. 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Selen. Die Diät, die nur 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  enthält, stellt eine starke Selenmangeldiät und die Diät von 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  eine normale bis leicht erhöhte Selenzufuhr dar. Um sicher zu gehen, dass die Tiere der Selenmangeldiät (Se(-)-Tiere) auch kein Selen von der Parentalgeneration erhalten, wurde die Diät über mehrere Generationen hinweg aufrechterhalten. Da die Männchen der Se(-)-Tiere in ihrer Fertilität beeinträchtigt waren, wurden die Weibchen von Männchen mit ausreichender Selenzufuhr begattet. Im Alter von sechs Monaten wurden die Ratten getötet ihre Organe entnommen und für die Versuche unmittelbar danach bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

## 2.4. Humane Prostatakarzinomzelllinie DU145

Diese Zelllinie wurde aus dem Prostatakarzinom eines 69 Jahre alten Mannes etabliert. Die Biopsie wurde im Jahr 1975 vorgenommen (71). Hierbei handelt es sich um eine von zwei gebräuchlichen und in der Literatur beschriebenen Prostatakarzinomzelllinien. Eine Prostatakarzinomzelllinie aus der Ratte konnte aus Gründen der erhöhten Sicherheit nicht benutzt werden. Die Du145 wurden in Zellkulturflaschen mit dem Nährmedium RPMI 1640 + L-Glutamin mit Zusätzen eines Antibiotikums aus Penicillin/Streptomycin und fötalem Rinderserum (ca. 10-20%) herangezogen (alles von der Firma GIBCO/Invitrogen; USA). Das Ernten der Zellen geschah durch das Inkubieren der vom Nährmedium befreiten Zellen mit Trypsin und anschließender Zentrifugation. Das Pellet, das aus den Zellen bestand, wurde jeweils drei mal mit PBS-Puffer gewaschen um Kontaminationen durch Proteine aus dem fötalen Kälberserum auszuschließen.

## 2.5. Probenvorbereitung

### 2.5.1. Radioaktive Markierung

Die Versuchsratten und die Zelllinie Du145 wurden zu Versuchszwecken mit radioaktiven Isotopen markiert. Die hierbei benutzten Isotopen waren das  $^{75}\text{Se}$  ( $t_{1/2} = 120\text{d}$ ),  $^{73}\text{As}$  ( $t_{1/2} = 80,3\text{d}$ ),  $^{54}\text{Mn}$  ( $t_{1/2} = 312,2\text{d}$ ) und  $^{64}\text{Cu}$  ( $t_{1/2} = 12,70\text{h}$ ).

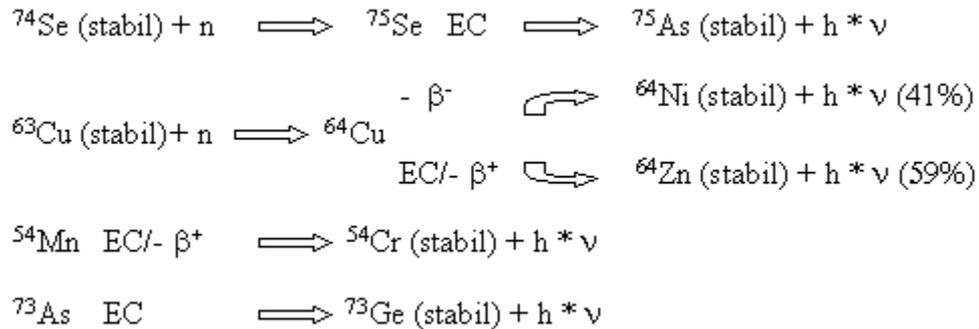
Die Zellen wurden einfach durch Zugabe der jeweiligen Inkubationslösung zu dem Nährmedium mit den jeweiligen radioaktiven Isotopen ( $^{75}\text{Se}$  &  $^{73}\text{As}$ ) markiert.

Die Versuchsratten wurden per Schlundsonde oral mit den Radiomarkern inkubiert. Eine Ausnahme gab es bei der Darreichung des Selen, welches intraperitoneal verabreicht wurde. Die Inkubationszeit der Probanden betrug jeweils fünf Tage, wonach sie dann geerntet bzw. geschlachtet wurden. Eine Ausnahme stellte das Kupfer dar, welches nur ca. eine Halbwertszeit lang inkubiert wurde.

Sowohl das Arsen als auch das Selen wurden in anionischer Form als  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  oder als  $\text{Na}_3\text{AsO}_3$  dargereicht, wohingegen Kupfer und Mangan in kationischer Form als  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  und  $\text{MnCl}_2$  verabreicht wurden. Um unvorhersehbare Schädigungen der Tiere durch Verätzung auszuschließen, wurden die Inkubationslösungen auf einen für die Tiere leicht verträglichen pH-Wert von 5,5 –6,0 eingestellt.

Die beiden Isotope des Selen und des Kupfers wurden am Reaktor BER II am Hahn-Meitner-Institut (in Berlin Wannsee) erzeugt, wohingegen die Isotope des Mangans und Arsens käuflich erworben wurden.

Die folgenden Formeln zeigen die Zerfälle der benutzten Isotope an. Hierbei steht EC für electron capture (Elektroneneinfang aus der K-Schale).



### 2.5.2. Mortalisierung, Probenentnahme und Frostung der Versuchstiere

Sofern nicht anders beschrieben wurden die verwendeten Gewebe der Ratten wie folgt behandelt: Die für die Schlachtung vorgesehenen sechs Monate alten männlichen Ratten wurden mit einer Überdosis des Betäubungsmittels Fluorene<sup>®</sup> durch Inhalation in einem Glasgefäß auf milde Art getötet, um die Bildung von Stressproteinen zu vermeiden. Nach einer Herzpunktion, bei der der größte Teil des Blutes entnommen wurde, wurden alle anderen Organe entnommen und für die Versuche eingefroren. Durch Zentrifugation wurde aus dem Blut das Plasma gewonnen. Für die weiteren Versuche wurden die entnommenen Prostatas zum einen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgekühlt oder für die Dünnschnitte bei  $-198^{\circ}\text{C}$  über flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### 2.5.3. Kryoschnitte

Dünnschnitte sind sehr dünne Querschnitte von ganzen Geweben, die mit Hilfe eines Kryotoms angefertigt werden (Leica CM 3050 S). Hierbei werden durch eine sehr scharfe dünne Klinge die Gewebe auf einer Halterung in  $10\mu\text{m}$  dünne Teile geschnitten und auf einen Objektisch geschoben, von wo sie mit einem Objektträger vorsichtig aufgenommen werden können und anschliessend an der Luft getrocknet werden. Die Arbeitstemperatur des Kryotoms betrug  $-25^{\circ}\text{C}$ .

### **3. Aufgabenstellung**

Ziel der geplanten Arbeiten ist es, durch Kombination analytischer Methoden (INAA, AAS, ICP-MS, Ultra-Zentrifugation, Chromatographie und Radiotracer-Techniken) mit biochemischen/immunochemischen und molekularbiologischen Verfahren die Verteilung von Spurenelementen und Spurenelementproteinen in der Prostata der Ratte zu identifizieren und zu charakterisieren. Aufgrund der bereits bekannten Beziehung zwischen Selen und der Prostata sollen auch Untersuchungen unter Berücksichtigung des Selenoproteoms in Abhängigkeit vom Selenstatus durchgeführt werden.

Mit Hilfe der instrumentellen Neutronenaktivierungsanalyse (INAA), der induktiv gekoppelten Massenspektrometrie (ICP-MS) und der elektrothermalen Atom-absorptionsspektroskopie (ETAAS) sollten qualitativ und quantitativ die in der Prostata vorhandenen Spurenelemente bestimmt werden. Zusätzlich sollen mit der AAS die Spurenelementkonzentrationen im Prostatazytosol bestimmt werden. Erste Hinweise über metallhaltige Proteine in den Zytosolen sollen durch online-Kopplung von HPLC und ICP-MS zur Auftrennung der Proteine mit der Größenausschlusschromatographie und anschließender Analyse der Elemente in den aufgetrennten Fraktionen erhalten werden. Diese Untersuchungen weisen auf die Existenz spurenelementhaltiger Proteine in der Prostata drüse hin.

Durch elektrophoretische Techniken wie der SDS-PAGE, der isoelektrischen Fokussierung und der zweidimensionalen Elektrophorese sollen die in vivo mit Radiotracer markierten Proteine in den subzellulären Fraktionen der Prostatazellen aufgetrennt werden. Anschliessend soll mit Hilfe der Autoradiographie der Tracer sowohl in Kryoschnitten als auch in den Proteinbanden nachgewiesen werden. Die Selenoproteine und anderen Spurenelementproteine sollten mit Hilfe von Immunotests (Antikörper gerichtet gegen spezifische Proteine in den verschiedenen Zell-Fraktionen) detektiert werden.

Um den Einfluss des Selenstatus auf die Expression von Proteinen zu untersuchen, sollen 2D-Elektrophoresen von den Prostatahomogenaten der Ratten mit unterschiedlichem Selenstatus angefertigt werden. Die daraus resultierenden Proteinspektren sollen auf Unterschiede in der Proteinexpression untersucht werden. Auf die gleiche Weise sollen auch die zytosolischen Proteinspektren mit einander verglichen werden. Vorhandene Expressions-Unterschiede sollen mit speziellen Computerprogrammen erfasst werden. Signifikante Unterschiede zwischen den Proteinspektren der Selenmangel- Rattenprostatas und der Kontroll- Rattenprostatas sollten mit Hilfe der MALDI-/ESI-MS analysiert werden und nach ihrer biologischen Bedeutung klassifiziert werden.

## **4. Methoden**

### **4.1. Homogenisierung**

Bevor die Prostatas homogenisiert wurden, wurden alle Gewebe, wie Fettanlagerungen und Blutgefäße, die die Prostata umschließen oder durchziehen, manuell entfernt. Je Gramm Gewebe wurden drei Milliliter Homogenatpuffer, welcher ein Gemisch aus Proteaseinhibitoren enthielt, zur Verhinderung des Zersetzungsprozesses der Proteine durch Proteasen hinzugefügt und alles zusammen mit einem Handhomogenisator homogenisiert. Bindegewebstücke und andere nicht zerkleinerte Feststoffe wurden durch Filtration durch eine Gaze ( Porengröße 80 µm) entfernt.

Mit dieser Methode der Homogenisation ist eine schnelle und einfache Aufbereitung möglich, jedoch eignet sie sich aus Gründen der Kontamination nicht für die Spurenelementanalytik.

Hierfür mussten alle Geräte säurefest und für die zu messenden Spurenelemente kontaminationsfrei sein. Alle hierfür benutzten Geräte, Gefäße etc. wurden mit 5%-iger Salpetersäure gereinigt. Zum Homogenisieren wurde ein Glaspotter statt eines Handhomogenisators aus Edelstahl benutzt. Die Kontamination mit Silizium u.a. im Glas vorkommenden Elementen spielten keine Rolle bei den Messungen, da sie nicht gemessen wurden und keinen Einfluss auf die zu messenden Spurenelemente ausübten.

Da eine komplexe Matrix die Messungen stören würde, wurde ein einfacherer Homogenatpuffer benutzt, der keine störende Matrix hat.

Homogenatpuffer (normal): 0,25 M Saccharose, 5 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 20 mM Tris/HCl, pH 7,4

Homogenatpuffer (analytisch): 20 mM Tris/ $\text{HNO}_3$  (Suprapur) pH 7,4

### **4.2. Subzelluläre Fraktionierung durch differentielle Zentrifugation**

Das Ziel der subzellulären Fraktionierung ist die Separation von Zellorganellen mit möglichst geringem Schaden. Durch diese Separation ist es möglich Proteine oder Spurenelemente den einzelnen Fraktionen zuzuordnen oder sie darin zu lokalisieren.

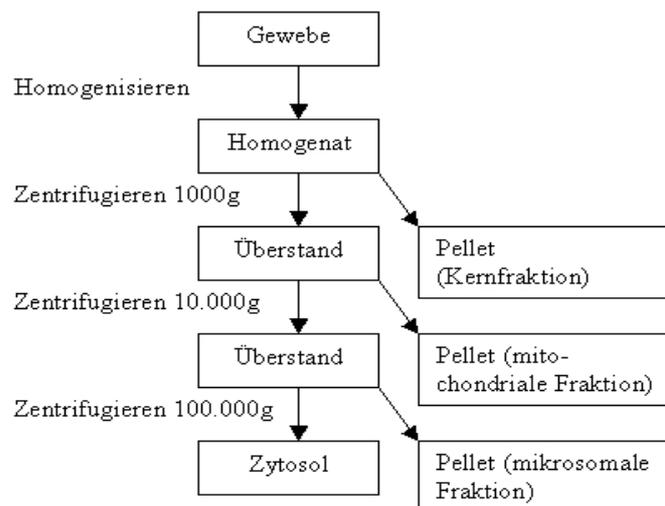
Aus den erhaltenen Gewebekomogenaten konnten Fraktionen mit unterschiedlichen Dichten separiert werden, indem die unlöslichen Zellkompartimente durch Zentrifugation bei unterschiedlichen Winkelbeschleunigungen und Zentrifugationszeiten sedimentiert wurden. Hierbei konnten eine nukleare, eine mitochondriale, eine mikrosomale und ein zytosolische Fraktion gewonnen werden. Bei einer Winkelbeschleunigung von ca. 1000 x g und einer Zentrifugationsdauer von ca. 10 Minuten konnte die nukleare Fraktion als erste von den anderen Fraktionen abgetrennt werden, da sie die höchste Dichte hat. In der nuklearen Fraktion befinden

sich fast ausschliesslich die Zellkerne, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass Teile des den Kern umgebenden Endoplasmatischen Retikulums (ER) in dieser Fraktion vorkommen. Um die Verunreinigung der nuklearen Fraktion vom ER zu minimieren, wurde sie mit einem Triton X-haltigen Puffer gewaschen.

Bei 20-minütiger Zentrifugation und einer Winkelbeschleunigung von 10.000 x g konnte aus dem Überstand die mitochondriale Fraktion sedimentiert werden. In diesem Sediment befinden sich vorwiegend die Mitochondrien aber auch andere Zellkompartimente mit gleicher Dichte wie der Golgi Apparat.

Im darauf folgenden Schritt wurden aus dem Überstand bei 90-minütiger Zentrifugation und einer Winkelbeschleunigung von 100.000 x g die mikrosomale Fraktion und das Zytosol gewonnen. Das sedimentierte Pellet bildet die mikrosomale Fraktion, welche unter anderem das Endoplasmatische Retikulum beinhaltet. Der jetzt klare Überstand besteht aus den Inhaltsstoffen des Zytoplasmas der Zelle, welches aus löslichen Proteinen, Salzen, freien Aminosäuren usw. besteht, sowie aus dem benutzten Puffer.

Alle Pellets wurden nach der Sedimentation vorsichtig mit einem Tris-Puffer gewaschen und danach im Verhältnis von 1:1 in ihm aufgenommen.



Graphik 4: Dieses Schema zeigt in vereinfachter Form die Gewinnung der verschiedenen benutzten Fraktionen im Überblick.

Bei der subzellulären Fraktionierung für die analytischen Spurenelementnachweise wurde ausschliesslich mit dem analytischen Homogenatpuffer gearbeitet, um Kontaminationen zu vermeiden.

Triton X-Puffer: 0,25 M Saccharose, 5 mM MgCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O, 20 mM Tris/HCl, 1% Triton X, pH 7,4

Tris-Puffer : 20 mM Tris/HCl pH 7,4

### **4.3. Mikrowellenaufschlüsse**

Um das Gewebe analytisch auf die darin enthaltenen Spurenelemente zu untersuchen, musste es im Vorhinein präpariert werden, da dies so nicht mit der AAS oder ICP-MS messbar ist. Die besten Resultate für diese Messmethoden liefern wässrige, leicht saure Lösungen. Durch Mikrowellenaufschlüsse ist es möglich Gewebe jeder Art in wässrige Lösungen zu überführen. Hierbei werden allerdings sämtliche Strukturen in den Proben zerstört, so dass keine Matrixeffekte bei den Messungen auftreten.

Die Lyophilisation der Proben vor dem Mikrowellenaufschluss ermöglicht eine höhere Konzentration der Spurenelemente in der Lösung der Probe.

In hochreine, säuregereinigte Teflonbomben wurden die lyophilisierten Gewebeprobe zusammen mit einem Gemisch aus Wasserstoffperoxid und Salpetersäure (1ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 2ml HNO<sub>3</sub> je 200 mg Trockenprobe) gegeben und verschlossen. Daraufhin wurde die verschlossene Bombe innerhalb von 10 Minuten auf 200°C erhitzt und weitere 10 Minuten bei dieser Temperatur belassen, um eine vollständige Zersetzung der Gewebes zu gewährleisten. Die zersetzten Probenlösungen wurden hierauf mit hochreinem Wasser für die Analysen verdünnt, da die Proben eine zu hohe Säurekonzentration hatten.

### **4.4. Analytische Methoden**

#### **4.4.1. Messung radioaktiver Substanzen mit dem NaI-Detektor**

Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der Lumineszenz bestrahlten dotierten Natriumjodids. Der Natriumjodidkristall ist mit Thallium dotiert, wodurch Lumineszenz bei Absorption von  $\gamma$ -Strahlen ermöglicht wird. Mittels eines Photomultipliers und elektronischer Hilfsgeräte kann das Signal auf einem Bildschirm optisch dargestellt werden. Dieser Detektor ist ein sogenannter „Bohrloch-Detektor“ mit dem es möglich ist den grössten Teil der emittierten Strahlung einzufangen und zu detektieren. Die Zerfallsraten werden in counts per minute (cpm) angegeben.

#### **4.4.2. Instrumentelle Neutronenaktivierungsanalyse (INAA)**

Bei der INAA handelt es sich um eine analytische Methode bei der Elemente durch Neutronenbeschuss in instabile Isotope höherer Masse überführt werden, die isotopenspezifische  $\gamma$ -Quanten emittieren. Diese  $\gamma$ -Quanten können dann durch die Gammaskopie den

entsprechenden Elementen zugeordnet werden. Eine Quantifizierung der Elemente erfolgt über den Zählratenvergleich der Proben mit einem zeitgleich mitbestrahlten Standard.

Je nach Isotop ist eine andere Bestrahlungsweise vorteilhaft, da die entstehenden Tochternuklide unterschiedliche Halbwertszeiten haben oder der Einfangquerschnitt der Elemente ungleich ist. Hierbei gibt es u.a. die Möglichkeiten die Proben im Reaktorkern oder an Reflektoren in Reaktornähe zu bestrahlen, wo der Neutronenfluss geringer ist als im Reaktorkern. Elemente deren Tochternuklide stabil sind oder zu geringe Halbwertszeiten haben können nicht gemessen werden.

Die Proben müssen zur Analyse nur lyophilisiert und im Achatmörser homogenisiert werden bevor sie in hochreinen Quarzampullen eingeschmolzen und darin bestrahlt werden.

#### **4.4.3. Induktiv gekoppelte Plasmamassenspektroskopie (ICP-MS)**

Bei der ICP-MS handelt es sich um eine Multielementanalyse. Die durch den Mikrowellenaufschluss erhaltenen Lösungen werden durch einen Nebulizer zerstäubt und in einem Gasstrom (Argon) zur Plasmafackel befördert, wo die Tröpfchen zu ionisiertem Gas erhitzt werden. Dieses ionisierte Gas wird durch verschiedene Linsen fokussiert bevor es durch ein magnetisches Feld eines Quadrupols in Schwingungen versetzt wird. Nur die Schwingungen eines bestimmten Masse-Ladungs-Quotienten erreichen den Detektor, wohingegen andere schwingende Ionen herausgefiltert werden. Das Quadrupol wechselt in bestimmten Intervallen die Frequenz der Magnetfelder, so dass nacheinander alle Masse-Ladungs-Quotienten gefiltert werden.

So werden nicht nur die Elemente gemessen, sondern alle stabilen Isotopen eines Elements, da sie unterschiedliche Massen haben. Durch die hohe Temperatur der Plasmafackel (ca.8000 K) entstehen auch ionische Moleküle deren Bestandteile aus der Lösung stammen, die zum Teil die Signale bestimmter Elemente überlagern, da sie den gleichen Masse-Ladungs-Quotienten haben ( z.B.  $(^{35}\text{Cl}^{16}\text{O})^+ \Leftrightarrow ^{51}\text{V}^+$ ). Diese Überlagerungen können teilweise dadurch umgangen werden, dass ein anderes Isotop des jeweiligen Elements gemessen wird.

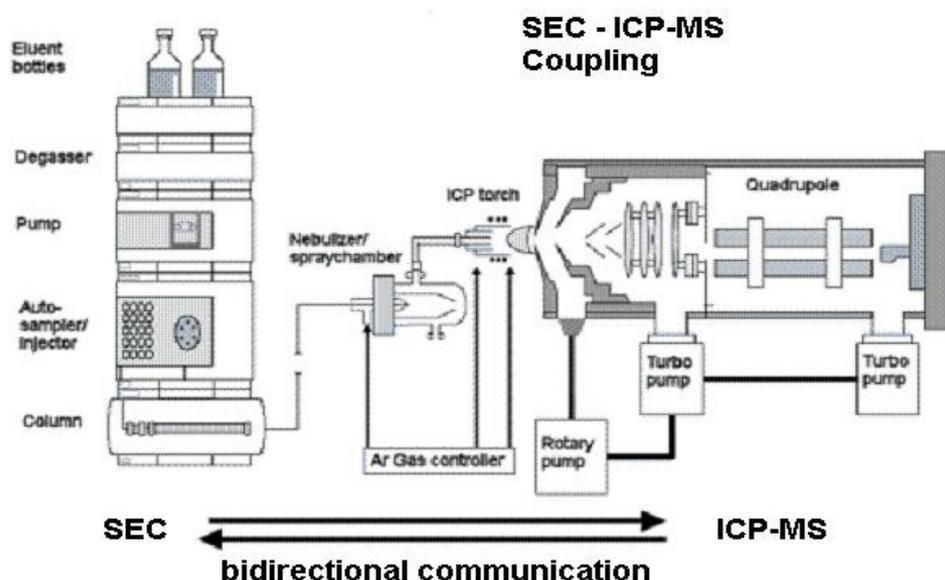
Um die Elemente nicht nur qualitativ zu bestimmen, wird der zu untersuchenden Lösung ein Standard bekannter Konzentration hinzugefügt und mitgemessen. So werden durch Vergleich der Zählraten des zu untersuchenden Elements mit denen des Standards relativ zueinander die Elementkonzentrationen bestimmt. Graphik einer ICP-MS im Kapitel 4.4.4.

#### 4.4.4. Größenausschlusschromatographie (Size exclusion chromatography SEC)

Die SEC ist eine Methode zum Separieren von Bestandteilen einer Lösung nach ihrer Größe und wurde in dieser Dissertation in Kombination mit der ICP-MS verwendet.

Die SEC ist eine Flüssigchromatographie (LC), bei der in Lösung vorliegende Proteine nach ihren Massen aufgetrennt werden können.

Das Prinzip dieser Trennung basiert darauf, dass die gelösten Proteine durch eine Säulenmatrix, welche als statische Phase bezeichnet wird, mit einer Membranpumpe befördert werden und die unterschiedlich großen Proteine mit ihr in Wechselwirkung treten, aber weiterhin durch einen Puffer, welcher die mobile Phase bildet, umspült werden. Die mobile Phase drängt somit die Proteine wieder aus der statischen Phase heraus. Da die kleineren Proteine der mobilen Phase einen geringeren Strömwiderstand bieten als die grösseren Proteine, verbleiben sie länger an dem Gel der statischen Phase. Somit erfolgt die Trennung der Proteine. Die massereicheren Proteine sind so in den zeitlich gesehen ersten Fraktionen, welche aus der Säule treten, zu finden, wohingegen die kleineren Proteine später die Säule verlassen. Durch die Kalibration der Säule mit Proteinen bekannter Masse können den Durchflusszeiten bestimmte Proteinmassen zugeordnet werden. Die limitierenden Faktoren sind das darin befindliche Gel, welches den Massenbereich der Trennung vorgibt, der Säulendurchmesser, welcher die Gesamtproteinmenge begrenzt, und die Säulenlänge, die die Auflösung beeinflusst.

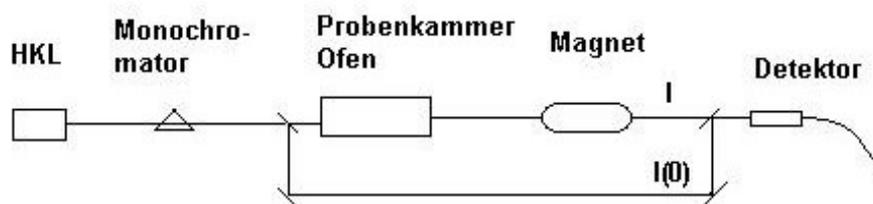


Graphik 5: Dieses Schema zeigt eine SEC und ICP-MS die in Reihe geschaltet sind.

#### 4.4.5. Elektrophotometrische Atom-absorptions-spektrometrie (ETAAS)

Die ETAAS ist die genaueste benutzte Methode zur Spurenelementbestimmung. Sie ist eine photometrische Eielementanalyse, bei der aus der Absorption von elementspezifischem Licht durch eine verdampfte Probe Rückschlüsse auf deren Elementkonzentration gezogen werden können. Hierbei wird Licht durch Hohlkatodenlampen (HKL), die angeregte Ionen eines Elements erzeugen und deren Rückfall in den Grundzustand Lichtquanten bestimmter elementspezifischer Frequenzen emittiert, durch zwei Kanäle geleitet. Einer dieser Kanäle dient als Nullabgleich, wohingegen der andere Kanal ein beheizbares Graphikrohr zur Verdampfung der Probe enthält. Der Lichtstrahl, der durch die atomisierte Wolke der Probe hindurchgeht, wird von ihr durch Absorption abgeschwächt, wohingegen der Lichtstrahl im Nullabgleich durch nichts abgeschwächt wird. Der nicht abgeschwächte Lichtstrahl mit der maximalen Lichtintensität wird hier als  $I(0)$  bezeichnet und der Lichtstrahl mit der verminderten Intensität  $I$ . Durch das Lambert-Beer'sche Gesetz kann anhand dessen die Konzentration des untersuchten Elements in der Probe bestimmt werden.

$E = \log [ I * I(0)^{-1} ]$ $E = \epsilon * c * s$	$E$ = Extinktion $c$ = Konzentration $s$ = Wegstrecke des Lichts durch die Probe	$\epsilon$ = elementspezifischer Koeffizient $I$ = durch Absorption verringerte Lichtintensität $I(0)$ = Licht maximaler Intensität
---	--	---



Graphik 6: Dieses Schema stellt vereinfacht ein ETAAS-Gerät mit Zeeman-Kompensation dar

Um den Untergrund der Messungen zu minimieren, wurde ein Gerät mit Zeeman-Kompensation benutzt, welches durch ein starkes Magnetfeld das Hintergrundrauschen aus dem Signal herausfiltert.

#### 4.4.6. Autoradiographie

Die Aufnahme eines Autoradiogramms erfolgt durch Belichtung der Image-Plates der Firma Fuji mit einer getracerten Probe auf einem SDS-Gel in einer lichtdichten Kassette. Die hierbei benutzten Image-Plates sind mit Bariumfluorobromid beschichtet, das mit  $\text{Eu}^{2+}$  dotiert ist. Wenn das Material bestrahlt wird, gehen die Moleküle in einen energetisch höheren Zustand über und bleiben dort bis sie entweder durch spontane oder induzierte Emission in den Grundzustand gelangen. Beim Scannen der Plates mit einem He-Ne-Laser relaxieren die Moleküle durch stimulierte Emission und geben dabei selber Energiequanten ab, die durch einen Detektor in elektrische Signale umgewandelt werden können und letztendlich an einem Computer optisch dargestellt und bearbeitet werden können.

#### 4.4.7. Autoradiographie mittels $\mu$ -imager

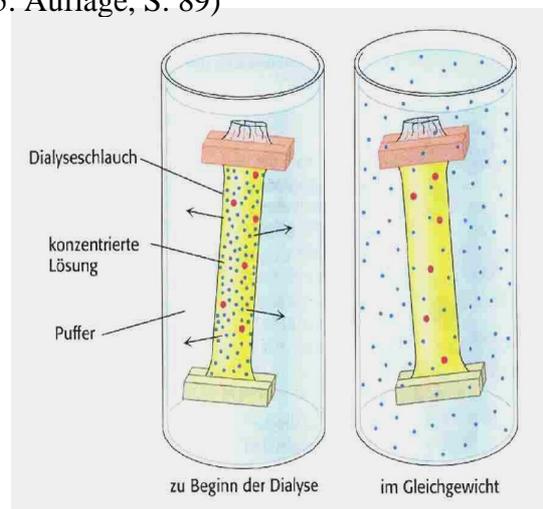
Bei der Aufnahme von Autoradiogrammen mit dem  $\mu$ -imager (Biospace, Frankreich) handelt es sich um eine hochauflösende und sehr schnelle Methode zur Autoradiographie von kleineren Objekten (3 x 4 cm), wie z.B. Dünnschnitten. Hierzu wird ein Objektträger mit dem darauf befindlichen Dünnschnitt mit einer  $2\mu\text{m}$  dicken Polyethylenfolie bedeckt, um die Probe von einer zweiten Folie mit einer radiosensitiven Beschichtung abzugrenzen. Dieses „Paket“ wurde daraufhin im  $\mu$ -imager ausgelesen und digital bearbeitet.

### 4.5. Allgemeine Methoden

#### 4.5.1. Die Gleichgewichts-Dialyse

Bei der Gleichgewichts-Dialyse handelt es sich um eine Trennmethode, um Teilchen verschiedener Volumina voneinander zu trennen. Im Speziellen geht es darum, die Proteine von Salzen und anderen hydrophilen Verunreinigungen zu trennen. Der Effekt beruht auf der Ausnutzung des osmotischen Drucks von Flüssigkeiten unterschiedlicher Konzentration, die durch eine semipermeable Membran getrennt sind. Hierzu verwendet man Dialysemembranen

Graphik 7: Dialyse (Biochemie, Stryer 5. Auflage, S. 89)



aus regenerierter Cellulose. Aus diesen Membranen werden Dialyseschläuche gefertigt, die durch ihre Cutoff-Werte unterschieden werden. Der Cutoff-Wert gibt das Molekulargewicht der Proteine an, die zu 90% von der Membran zurückgehalten werden. Die Abtrennung beruht auf der Diffusion der kleinen, hydrophilen Moleküle und der Zurückhaltung der Proteine. Erfahrungsgemäß können große Volumina durch häufigeren Pufferwechsel die Abtrennung noch steigern. Wenn gegen destilliertes Wasser dialysiert wird, kann die Ionenstärke der Lösung stark absinken, so dass viele Proteine durch die Änderung des pH-Wertes ausfallen.

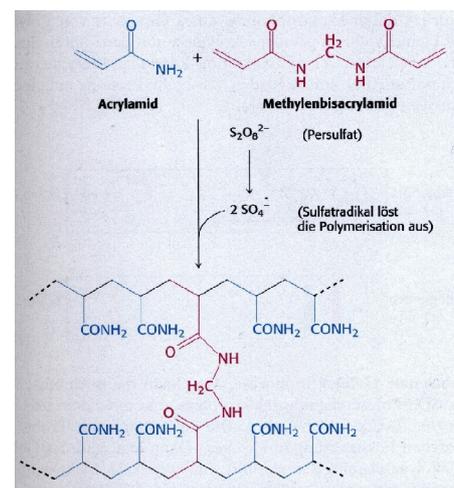
#### 4.5.2. Einengen von Proben mittels Speed-Vac

Bei der Speed-Vac handelt es sich um eine Methode, um Lösungen zu konzentrieren. Zugrunde liegt, dass im Vakuum Lösungen schneller verdunsten, da der Gasdruck erniedrigt wird. Die Lösungsmittel beginnen dann bereits bei Raumtemperatur zu kochen, was zu verstärkter Verdunstungskälte führt, weshalb die Lösungen sich abkühlen. Um der Blasenbildung entgegenzuwirken und die Verdunstung zu beschleunigen, wird eine beheizbare Zentrifuge verwendet. Da bei der Verdunstung nur das Lösungsmittel entfernt wird, reichern sich Salze in der Lösung an, diese können dann durch die Dialyse abgetrennt werden. (s. 5.6. Gleichgewichts-Dialyse)

### 4.6. Biochemische Standardmethoden

#### 4.6.1. SDS-Gelelektrophorese nach Lämmli

Die **Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese** (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteingemischen nach ihrer scheinbaren Masse. SDS, ein ionisches Detergenz mit negativer Ladung und Natrium als Gegenionen, denaturiert die Proteine. Durch nichtkovalente Wechselwirkung bindet ein SDS alle zwei Aminosäuren an die linearisierten Proteine. Durch Kochen mit DTT werden Disulfidbrücken gelöst. Dadurch ergeben sich linearisierte Proteine mit gleichem Masse-Ladungs-Verhältnis, was die Auftrennung nach der Größe in einem elektrischen Feld ermöglicht. Bei der PAGE besteht die Matrix hierbei aus einem Co-Polymer aus Acrylamid und NN'-Methylenbisacrylamid (Graphik 8). Bei der Methode von Laemmli (72) handelt es sich um



les  
Polyacrylamids aus Acrylamid und Methylenbisacrylamid durch radikalische Polymerisation (Biochemie, Stryer S. 93)

eine diskontinuierliche Zonen-elektrophorese. Das Gel besteht aus zwei verschiedenporigen, übereinandergeschichteten Teilen. Der untere Teil ist das Trenngel und ist engporig mit einem pH von 8,8, wohingegen der obere Teil das weitporige Sammelgel mit einem pH von 6,8 ist. Im Laufpuffer sind Cl<sup>-</sup>-Ionen und Glycin enthalten, welche einen Stapeleffekt bewirken durch das Zusammenspiel der Ionen und des pH-Werts im Sammelgel. Im Trenngel bewirkt der Siebeffekt eine Auftrennung der Proteine nach Molekularmassen. Insgesamt erfolgt also eine Auftrennung nach Ladung und Molekularmasse.

Acrylamidlösung : 30 % Acrylamid, 0.8 % Methylen-Bis-Acrylamid

Trenngelpuffer : 1,5 M Tris pH 8,8 (HCl)

Sammelgelpuffer : 0,5 M Tris pH 6,8 (HCl)

Laufpuffer : 25 mM Tris, 0,3 M Glycin, 10 mM SDS

Probenpuffer : 25 % Sammelgelpuffer, 40 % v. 10%iger SDS-Lösung, 20 % Glycerin,  
20 mM DTT , 0.2 % Bromphenolblau

#### **4.6.2. Die zweidimensionale Elektrophorese (2D-E)**

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese werden die Proteine zuerst nach ihrem isoelektrischen Punkt durch die isoelektrische Fokussierung (IEF) und anschliessend nach ihren scheinbaren Massen in der SDS-PAGE nach Lämmli getrennt (IEF/SDS-PAGE). Die IEF erfolgt durch Auftragung des Proteins auf einen käuflichen Strip. Durch die anschliessende Stromzufuhr bildet sich auf dem Gel des Strips ein pH-Gradient aus, wodurch die Proteine in dem Gel des Strips wandern. Jedes Protein hat bei einem bestimmten pH-Wert, dem isoelektrischen Punkt, eine Gesamtladung nach aussen von Null. Bei einem anderen pH-Wert hingegen werden die Proteine deprotoniert oder protoniert, was die Gesamtladung nach außen ändert und die Proteine somit im elektrischen Feld wandern. Nach hinreichend langer Fokussierung werden die Strips auf ein SDS-Gel fest positioniert und wie eine SDS-PAGE behandelt (s.4.6.1.).

#### **4.6.3. Zweidimensionale Gelelektrophorese mit mobilem Gradienten (NEPHGE) Groß-Gele**

Bei der NEPHGE (Non Equilibrium pH Gradient Electrophoresis) baut sich der pH-Gradient während der Fokussierung auf. Empfindliche Proteine werden bei dieser Methode nicht extremen pH-Werten ausgesetzt, was die Gefahr des Ausfallens bzw. der Aggregation verringert. Es tritt keine Kathodendrift auf, die sich bei den IPG-Strips oft in fehlenden

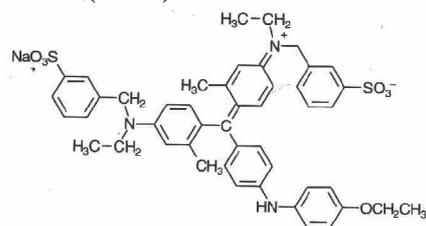
basischen Proteinen äußert. Größere Proteine fokussieren länger als kleine, die sich mit der Zeit an der Kathode sammeln und nicht aufgetrennt werden. Es werden Röhrengel gegossen. Nach der Fokussierung werden diese auf ein SDS-Gel übertragen und die Proteine in der 2. Dimension getrennt.

Die NEPHGE wurde für Large-Gele im Format 200 x 300 x 0,9 mm angewandt. Als Überschichtungslösung für die erste Dimension wurde 31,6 % (w/v) Harnstoff, 5,3 % Glycerin, 5,3 % (v/v) Servalyte 2-4, A. dest. verwendet. Die Inkubationslösung mit pH 6,8 setzte sich aus 1,5 % (w/v) Tris/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 40 % (v/v) Glycerin, 3 % (w/v) SDS, 1 % (w/v) DTT zusammen. Die Röhrengel wurden auf der zweiten Dimension mit 1,5 % (w/v) Tris/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 % (w/v) SDS, 1 % (w/v) Agarose fixiert. Der Laufpuffer enthielt 1,45 % (w/v) Glycin, 0,3 % (w/v) Tris, 1 % (w/v) SDS. Das Cap-Gel setzte sich aus 12 % (w/v) Acrylamid, 0,13 % (w/v) PDA, 9 M Harnstoff, 5 % (v/v) Glycerin, 0,06 % (v/v) TEMED, 4 % (v/v) WITAllyte, A. dest. zusammen. Das Trenngel der 1. Dimension bestand aus 4 % (w/v) Acrylamid, 0,3 % (w/v) PDA, 9 M Harnstoff, 5 % (v/v) Glycerin, 0,06 % (v/v) TEMED, 4 % (v/v) WITAllyte, A. dest. Das Gel der zweiten Dimension setzte sich aus 15 % (w/v) Acrylamid, 0,2 % (w/v) N,N-Methylen-Bisacrylamid, 375 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS, 0,03 % (v/v) TEMED, A. dest. zusammen.

#### 4.6.4. Proteinbestimmung nach Bradford

Der Bradford-Test ist eine Methode, mit der sich relativ schnell Konzentrationen von Proteinen bestimmen lassen. Die zugrunde liegende Reaktion ist die Bindung von Coomassie-Brilliantblau G-250 an Proteine, bei der sich das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Dabei ist die Zunahme der Absorption bei 595 nm proportional zur Proteinkonzentration. Grund der Verschiebung des Absorptionsmaximum liegt sehr wahrscheinlich in der Stabilisierung der unprotonierten, anionischen Sulfonat-Form durch Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein. Der Farbstoff bindet dabei recht unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten. Am wichtigsten ist die Wechselwirkung zu Argenin. Mit Lysin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin bildet Coomassie ebenfalls Wechselwirkungen aus. Der Vorteil gegenüber den anderen quantitativen Färbetests, die auf der Kupferreduktion basieren (BCA-Test & Lowry-Test), ist die Geschwindigkeit (2 min), sowie die relative

**Graphik 9:** Coomassie-Brilliantblau G-250 (als Sulfonat) aus Bioanalytik von Lottspeich / Zorbas (S. 41)



Unempfindlichkeit gegenüber reduzierenden Reagenzien. Nachteilig wirkt sich aus, dass die Reaktion in einem sauren Milieu abläuft, in dem manche Proteine ausfallen. Der Test ist anfällig für Detergenzien (>0,5% Triton X-100, >0,1% SDS; nach Bioanalytik/Lottspeich F.). Da die Wechselwirkungsstärke durch die Seitenketten bestimmt wird, kommt es zu unterschiedlich starken Farbänderungen bei unterschiedlichen Proteinen. Die Nachweisgrenze des Tests liegt zwischen 0,05-0,5 µg/mL Protein und ist damit der sensitivste quantitative Färbetest.

#### **4.6.5.Gel-Trocknung**

Die Gel-Trocknung ist ein Verfahren zur Konservierung und leichteren Aufbewahrung von Gelen. Dabei wird mittels Vakuum und Hitze das Wasser aus dem Gel entfernt. Da das Polyacrylamid sehr brüchig ist, wird zunächst durch Austausch von Wasser mit einem Glycerinpuffer das Gel geschmeidiger gemacht und dann auf einem Trägermaterial getrocknet. Diese Trägermaterialien können Filterpapier oder Cellulosefolie sein. Der Vorteil von Cellulosefolie ist, dass man das Gel mit Durchlicht scannen kann, da das Material durchsichtig ist.

#### **4.6.6.Westernblot**

Das Blotting ist eine elektrophoretische Übertragung der Proteine aus einem Gel auf eine geeignete Blotmembran (Nitrocellulose, PVDF) senkrecht zur Gelfläche. Die Auftrennung, die im Gel erreicht wurde, wird beibehalten. Durch die Übertragung werden die Proteine immobilisiert und für die Antikörperdetektion zugänglich gemacht (s. 4.7.4. Antikörpertest). Die Übertragung von einem Gel (dreidimensional) auf eine Membran (zweidimensional) ermöglicht schnelle Reinigungsschritte, so wie das Abtrennen von Detergenzien, die bei der Detektion stören würden. Durch das Entfernen von SDS können sich die Proteine teilweise wieder in den nativen Zustand zurück falten, was zur Ausbildung von Antikörperepitopen führt, was letztlich erst den Antikörpertest ermöglicht. Die verwendeten Blotmembranen unterscheiden sich in Porengröße, so wie in ihrem Proteinbindeverhalten und leicht in ihrer Handhabung. Die Membranen können zur besseren Kontrolle mit Ponceau S angefärbt werden. Dieser Vorgang ist reversibel, weil der Farbstoff leicht in PBS-Puffer herausgewaschen werden kann.

Blot Puffer: 0.05 M Aminohexansäure in Wasser

## **4.7. Nachweismethoden**

### **4.7.1. Die Gelfärbung**

Bei der Gel-Färbung geht es um die Anfärbung von Proteinen in einem Polyacrylamidgel. Es gibt verschiedene Färbemethoden, die sich bezüglich der Sensitivität und der Quantifizierbarkeit unterscheiden.

### **4.7.2. Silberfärbung**

Die Silberfärbung ist die sensitivste Gel-Färbemethode. Mit ihr lassen sich noch ~5 ng pro Proteinbande (Der Experimentator: Proteinbiochemie 4. Auflage, S. 13) nachweisen. Die Silberfärbung beruht auf einer Reduktion der Silberionen ( $\text{Ag}^+$ ) zu elementarem Silber (Ag). Die Silberionen komplexieren dabei mit Glutamat-, Aspartat- und Cysteinresten. Die genaue Reaktion ist nicht bekannt. Die Variabilität der Färbung ist dabei sehr groß, weshalb eine Quantifizierung nicht möglich ist.

### **4.7.3. Coomassie-Färbung**

Die Coomassie-Färbung ist nicht so sensitiv wie die Silberfärbung. Die Nachweisgrenze liegt hier bei ~100 ng pro Proteinbande (Der Experimentator: Proteinbiochemie 4. Auflage, S. 13). Die Färbung beruht auf der Wechselwirkung des Farbstoffs mit den Proteinen (s. 4.6.4. Bradford). Der Vorteil der Färbung ist, dass sich die Proteinbanden quantifizieren lassen, da Coomassie die Proteine fast gleichmäßig anfärbt. Der Nachteil bei der Coomassie-Färbung ist die lange Entfärbezeit.

Färbelösung: 30% EtOH, 10 % Me-COOH, 2 Tabletten/ L PhastGel Blue R

### **4.7.4. Der Antikörpertest**

Unter dem Antikörpertest versteht man den Proteinnachweis auf einer Blotmembran. Dabei wird durch einen primären Antikörper das Protein gebunden und der sekundäre Antikörper, Träger eines Detektionsmoleküls, bindet an den primären Antikörper. Bei den Detektionsmolekülen kann es sich direkt um Chromophore handeln oder um Enzyme, die eine Nachweisreaktion ablaufen lassen (s. 4.7.5. Chemilumineszenz-Nachweis). Bei den primären Antikörpern kann es sich entweder um einen monoklonalen Antikörper handeln, was den Vorteil bringt, dass nur ein Epitop genau erkannt wird, oder um polyklonale Antikörper, d.h. ein Gemisch aus verschiedenen Antikörpern, die an das gleiche Protein binden. Bei den

primären Antikörpern handelt es sich um IgG und bei den sekundären Antikörpern um anti-IgG des jeweiligen Tieres, in dem der primäre Antikörper hergestellt wurde.

Dabei muss die Membran geblockt werden mit Proteinen (und dem Detergent Tween 20), so dass die Antikörper nicht unspezifisch an die Membran binden und so einen erhöhten Signalhintergrund liefern. Zum selben Ergebnis kommt es, wenn der primäre oder der sekundäre Antikörper mit dem Blockmedium interagiert. Deswegen empfiehlt es sich, die Antikörper immer in Blockmedium auf die Membran zu geben. Der Antikörpertest liefert neben der Masse aus der Gelaufentrennung einen weiteren, spezifischen Hinweis auf das Protein. Zudem lässt sich ein Protein mit dieser Methode quantifizieren (s. 4.7.6.Odyssee).

Waschpuffer: 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 M NaCl, 1 % Tween 20

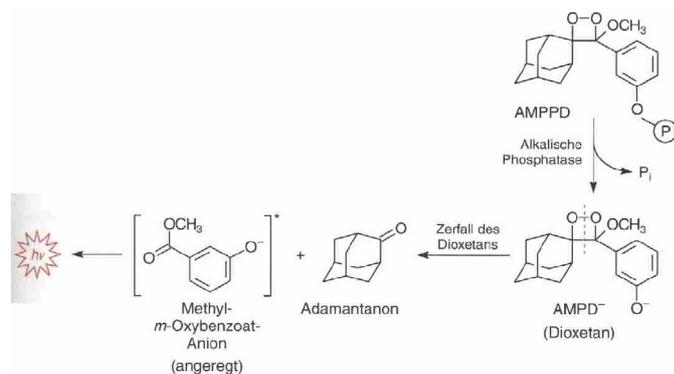
Blockpuffer : 5 % Trockenmilchpulver in Waschpuffer

Antikörperlösungen: Antikörper in Blockpuffer, Spuren NaN<sub>3</sub>

#### 4.7.5. Chemilumineszenznachweis

Bei dem Chemilumineszenznachweis wird eine alkalische Phosphatase verwendet, die an den sekundären Antikörper gebunden ist. Dabei wird durch die Phosphatase ein Phosphat von einem Substrat abgespalten, welches dann instabil wird und unter Lichtemission zerfällt.

Graphik 10: Chemilumineszenz-Reaktion am Beispiel von AMPPD (Bioanalytik; S. 665)



AMPPD ist 3-(4-Methoxyspiro[1,2-dioxetan-3,2'-tricyclo[3.3.1.1.<sup>3,7</sup>] decan]-4-yl)phenylphosphat, Na<sub>2</sub>.

Die Lichtaussendung wird durch Auflegen eines Photofilms dokumentiert.

#### 4.7.6. Detektion nach Odyssee

Bei dem Odyssee handelt es sich um ein Detektionsgerät, welches mittels Laser die an den Antikörpern gebundene Chromophore anregt. Diese Chromophore werden durch den Pumpvorgang des Lasers aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand gebracht. Dieser metastabile Zustand hält allerdings nicht lange an und einige Chromophore fallen durch spontane Emission in den Grundzustand zurück und senden dabei Licht einer

spezifischen Wellenlänge aus, die andere angeregte Chromophoren zu stimulierter Emission anregt. Das anhaltende Pumpen des Lasers wiederholt diese Vorgänge mehrmals. Diese Lichtverstärkung der Chromophoren kann dann detektiert werden. Zudem werden die Daten digital erfasst, was eine computergestützte Quantifizierung ermöglicht.

#### **4.7.7. Proteinsequenzierung mittels MALDI-MS**

Die Matrix unterstützte Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) ist eine Methode, bei der man speziell Makromoleküle identifizieren kann, indem man die Moleküle ionisiert und deren Massenbruchstücke bestimmt. Die MALDI-MS ist vor allem für Moleküle geeignet, deren Massen grösser als ein kDa und kleiner als ein MDa sind.

Hierbei wird die Probe in eine Matrix eingebettet und mittels eines Lasers verdampft und ionisiert. Die positiv geladenen Massenbruchstücke werden beschleunigt und mit einem Detektor erfasst. Auf Grund der unterschiedlichen Zeiten, die die einzelnen Massenbruchstücke benötigen, um eine Strecke zu bewältigen, je grösser die Massen sind, desto grösser ist deren Trägheit und um so kleiner die Beschleunigung, kann daraus auf deren Masse geschlossen werden.

Die Probe wird in die Matrix eingebettet, weil die Matrix unterstützende Wirkung hat beim Verdampfen und beim Ionisieren. Des Weiteren separiert die Matrix die Biomoleküle voneinander, damit keine Interaktionen zwischen den Molekülen möglich sind.

#### **4.7.8. Hämalaun-Eosin-Färbung von Dünnschnitten**

Die auf Objektträger gezogenen Dünnschnitte wurden zur besseren Beobachtung unter dem Mikroskop mit Hämalaun (Mayers Hämalaun, Merck) und Eosin (Sigma) angefärbt. Im ersten Schritt wurden die Objektträger mit dem Dünnschnitt kurz (ca. 10 s) in saurem Hämalaun geschwenkt und daraufhin in 0,25%-iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gefärbt, um die typische Blaufärbung der Kerne zu erhalten. Nach dem Waschen mit demineralisiertem Wasser wurden die Dünnschnitte in der Eosinlösung für 8 Minuten gefärbt. Nach einem weiteren Waschgang mit demineralisiertem Wasser wurden die Dünnschnitte getrocknet und konnten dann für die Mikroskopie verwendet werden.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Analytische Untersuchungen

#### 5.1.1. Spurenelementgehaltbestimmung mittels INAA

Mit Hilfe der INAA wurden die Spurenelementgehalte der Prostatas von jeweils drei Selen unterversorgten und von drei ausreichend versorgten Ratten untersucht. Des Weiteren wurden die subzellulären Fraktionen von jeweils drei Se(-)- und drei Se(+)-Rattenprostatas auf deren Spurenelementkonzentrationen überprüft.

Hierfür wurden die Prostatas von dem sie umgebenden Häutchen und dem Fett befreit. Dazu wurden alle Geräte, die direkten Kontakt mit den Proben hatten, das Keramikbesteck, die Einweggefäße und bei den subzellulären Proben der Glaspotter gründlich mit 5%-iger Salpetersäure gereinigt, um Kontaminationen vorzubeugen. Nach dem lyophilisieren der Proben, wurden sie in einem Achatmörser homogenisiert und in Quarzampullen mit einer Einwaage von circa 10 mg eingeschmolzen.

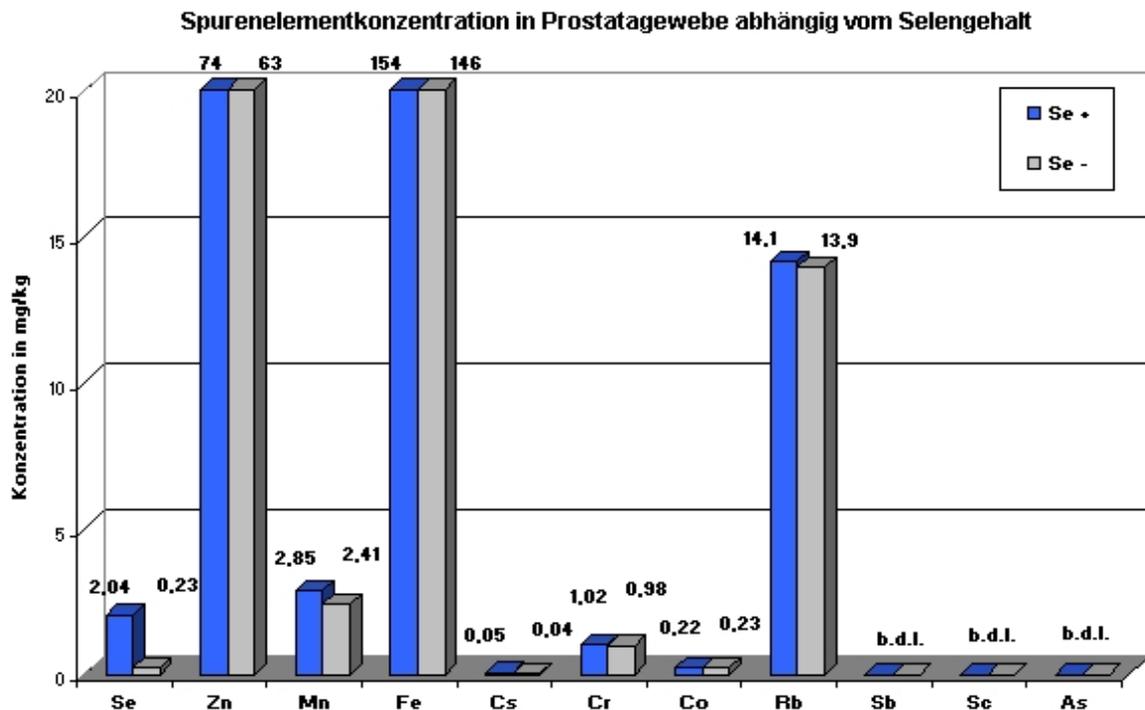
Auf Grund der Art der Spurenelementgehaltsbestimmung mit Neutronenbestrahlung ist es nicht möglich alle Elemente nachzuweisen, da ihre Tochternuklide zu kurzlebig oder stabil sind. Deswegen werden die Proben auf zwei unterschiedliche Arten bestrahlt, um möglichst viele Elemente nachweisen zu können. Mit der DBVR wurden die Elemente Mangan und Arsen auf Grund ihrer kurzen Halbwertszeit bestimmt ( $As-76$ ,  $t_{1/2} = 26,4 h$ ;  $Mn-56$ ,  $t_{1/2} = 2,58 h$ ), wohingegen mit der DBVK Elemente mit längeren Halbwertszeiten gemessen werden konnten.

Für alle Messungen wurde der gleiche Detektor, der aus hoch-reinem Germanium (HPGe) besteht, benutzt.

In der folgenden Tabelle 1 sind alle Werte angegeben, die in den ganzen Prostatas gemessen wurden, und in der Graphik 11 als Diagramm graphisch dargestellt wurden.

Konzentration	Probe der Prostata: von							
	Tier 1 (Se+)	Tier 2 (Se+)	Tier 3 (Se+)	Ø Tiere Se(+)	Tier 1 (Se-)	Tier 2 (Se-)	Tier 3 (Se-)	Ø Tiere Se(-)
Se mg/kg	2,21 ± 0,03	1,82 ± 0,03	2,09 ± 0,03	2,04 ± 0,16	0,21 ± 0,03	0,24 ± 0,03	0,25 ±	0,23 ± 0,02
Zn mg/kg	68 ± 1	82 ± 1	72 ± 1	74 ± 6	64 ± 1	58 ± 1	67 ± 1	63 ± 4
Mn mg/kg	2,02 ± 0,02	3,41 ± 0,02	3,11 ± 0,02	2,85 ± 0,60	1,4 ± 0,02	3,38 ± 0,02	2,44 ± 0,02	2,41 ± 0,81
Fe mg/kg	121 ± 3	176 ± 3	166 ± 3	154 ± 24	107 ± 3	186 ± 3	144 ± 3	146 ± 32
Cs mg/kg	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 1
Cr mg/kg	0,99 ± 0,05	1,21 ± 0,05	0,87 ± 0,05	1,02 ± 0,14	0,89 ± 0,05	0,93 ± 0,05	1,11 ± 0,05	0,98 ± 0,09
Co mg/kg	0,24 ± 0,04	0,24 ± 0,04	0,19 ± 0,04	0,22 ± 0,02	0,38 ± 0,04	0,11 ± 0,04	0,2 ± 0,04	0,23 ± 0,11
Rb mg/kg	14,9 ± 0,2	12,3 ± 0,2	15,1 ± 0,2	14,1 ± 1,3	13,2 ± 0,2	14,4 ± 0,2	14,2 ± 0,2	13,9 ± 0,5
Sb mg/kg	b. d. l.	b. d. l.	b. d. l.	b. d. l.	b. d. l.	b. d. l.	b. d. l.	b. d. l.
Sc mg/kg	b. d. l.	b. d. l.	b. d. l.	b. d. l.	b. d. l.	b. d. l.	b. d. l.	b. d. l.
As mg/kg	b. d. l.	b. d. l.	b. d. l.	b. d. l.	b. d. l.	b. d. l.	b. d. l.	b. d. l.

Tabelle 1: In Dieser Tabelle sind die Konzentrationen einiger Elemente aufgelistet, die mit der INAA gemessen werden konnten. Die Werte wurden für die ganzen Prostatas in mg/kg Trockenmasse angegeben. Die Bezeichnung b. d. l. bedeutet: below detection limit und gibt an, dass diese Elemente gemessen wurden aber nicht nachzuweisen waren.



Graphik 11: Dieses Diagramm zeigt graphisch die Durchschnittswerte der ermittelten Elementkonzentrationen in den Rattenprostatas der mit Selen ausreichend ernährten Ratten und der unter Selenmangel leidenden Ratten.

Aus der Tabelle und dem daraus resultierenden Diagramm geht hervor, dass die Elemente Selen, Zink, Mangan, Eisen, Cäsium, Chrom, Kobalt und Rubidium nachgewiesen werden konnten, wohingegen die Elemente Arsen, Antimon und Scandium nicht nachweisbar waren.

Die Messung, die den Selengehalt bestimmte, zeigt eindeutig, wie der Selengehalt von der Diät abhängt. Die Se(+)-Tiere haben eine Selenkonzentration von 2,04 mg/kg in der Prostata, die um ca. eine Größenordnung über der Selenkonzentration der Se(-)-Tiere (0,23 mg/kg) liegt. Ob der Selengehalt die Konzentrationen der anderen Spurenelemente beeinflusst, sollte mit Hilfe der durchgeführten Messungen ermittelt werden.

Es konnten die Elemente Zink, Mangan und Eisen bestimmt werden, als die Elemente bei denen es Unterschiede zwischen den beiden unterschiedlich mit Selen gefütterten Tiergruppen gab. Die Werte bei Cäsium, Chrom, Kobalt und Rubidium variierten zwischen den beiden Gruppen nur innerhalb der Fehlertoleranz und können als identisch angesehen werden.

Die höchste Konzentration hatte das Eisen. Mit Werten von 154 mg/kg und 146 mg/kg lag die Konzentration sehr hoch im Vergleich zu den anderen Spurenelementkonzentrationen.

Es ist bekannt, dass Zink in der Prostata stark angereichert ist (73). Mit Werten von 74 mg/kg für Se(+)-Tiere und 63 mg/kg für Se(-)-Tiere liegen diese weit über den anderen Spurenelementen abgesehen vom Eisen bei dem, wie erwähnt, keine genauen Aussagen getroffen werden können.

Der Einfluss vom Selengehalt ist gering aber eindeutig. Alle drei gemessenen Prostatawerte der Se(+)-Tiere lagen über allen Werten der Se(-)-Tiere. Anscheinend hat der Selengehalt einen direkten oder indirekten Einfluss auf den Zinkgehalt.

Mangan ist das einzige weitere Element, das Unterschiede in der Konzentration der beiden Gruppen von Rattenprostatas hat, die bei 2,85 mg/kg bei den Se(+)-Tieren und bei 2,41 mg/kg bei den Se(-)-Tieren liegt.

Rubidium ist mit ca. 14 mg/kg das dritthäufigste Element in der Rattenprostata, welches mit der INAA nachgewiesen werden konnte. Die Funktion des Rubidiums in der Prostata ist bislang unbekannt.

Die Werte für Chrom (ca. 1 mg/kg), Kobalt (ca. 0,22 mg/kg) und Cäsium (ca. 0,05 mg/kg) liegen nur knapp über der Nachweisgrenze und unterscheiden sich kaum in den beiden unterschiedlich ernährten Rattengruppen.

### **5.1.2. Spurenelementgehaltbestimmung mittels AAS**

Da mit der INAA nicht alle Elemente bestimmt werden konnten, wurde die AAS benutzt, um einige weitere Elemente zu bestimmen und einige der bereits bestimmten zu verifizieren. Dabei wurden die Elemente Arsen, Selen, Eisen, Zink, Kobalt und Mangan gemessen und zusätzlich Kupfer und Cadmium bestimmt. Dadurch, dass die elektrothermale AAS niedrigere Nachweisgrenzen als die INAA hat, ist es möglich, Arsen mit der AAS in der Prostata nachzuweisen.

Hierfür wurden die Proben lyophilisiert und durch Mikrowellenaufschluss aufgeschlossen. Nach dem Mikrowellenaufschluss mussten die Proben verdünnt werden, um zu verhindern, dass das Graphitrohr mit der Säure reagiert und CO bildet, welche leicht flüchtige Carbonyle mit einigen Spurenelementen bildet, und so ein zu geringer Wert ermittelt wird.

Zwischen 80 und 100 µg der lyophilisierten Probe wurden mit 1,5 ml Salpetersäure und 0,5 ml Wasserstoffperoxyd versetzt. Anschliessend wurden die Proben verdünnt mit bidestilliertem Wasser und die Dichte der Lösung bestimmt.

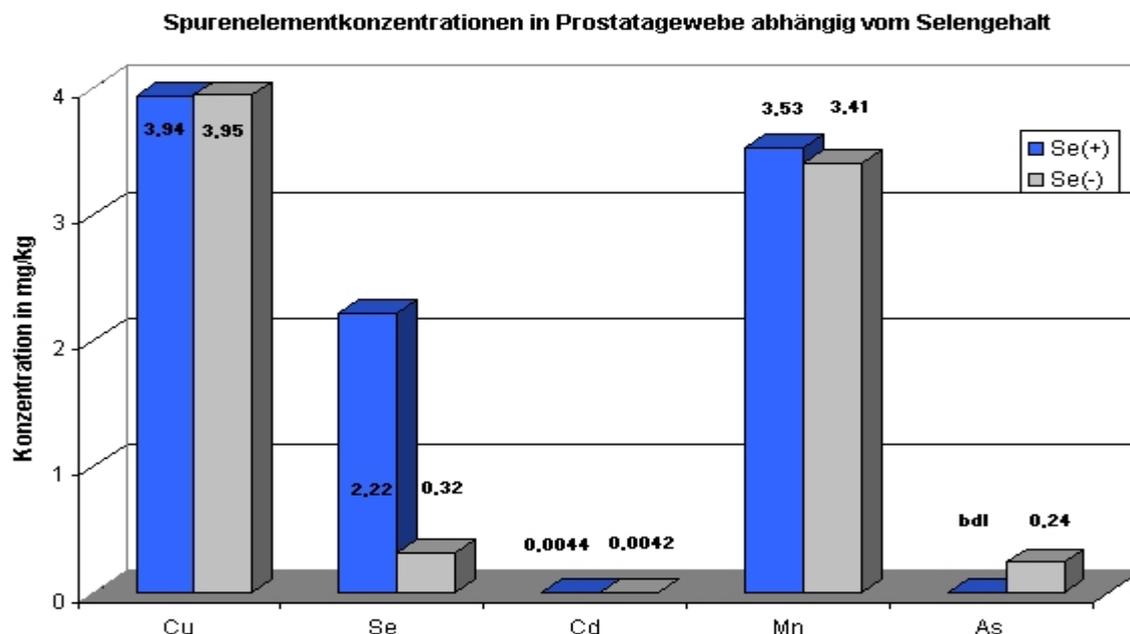
Die Massen der Proben vor und nach der Lyophilisierung und deren Einwaage in die Bomben sind in der nachfolgenden Tabelle 2 und die Werte der Messungen für Arsen, Selen, Eisen, Zink, Kobalt und Mangan in der gesamten Prostata in Tabelle 3 angegeben. Die Werte aus der Tabelle 3 sind in Graphik 12 graphisch dargestellt.

Prostata von	Feuchtmasse [mg]	Trockenmasse [mg]	Einwaage [mg]
Tier 1 Se(+)	610,9	108,3	107,5
Tier 2 Se(+)	560	111,3	86,9
Tier 3 Se(+)	612	110,1	85,4
Tier 1 Se(-)	621,9	90,7	90,7
Tier 2 Se(-)	695,1	104,2	78
Tier 3 Se(-)	632,1	106,2	95,3

Tabelle 2: In dieser Tabelle sind die Probenmassen vor der Lyophilisierung dargestellt und deren getrockneten und in die Bombe eingewogenen Massen.

Konzentration	Prostata von							
	Tier 1 Se(+)	Tier 2 Se(+)	Tier 3 Se(+)	Ø Se(+)	Tier 1 Se(-)	Tier 2 Se(-)	Tier 3 Se(-)	Ø Se(-)
Cu mg/kg	4,11	3,7	4,02	$3,94 \pm 0,18$	4,1	3,83	3,92	$3,95 \pm 0,11$
Se mg/kg	2,1	2,42	2,14	$2,22 \pm 0,14$	0,36	0,31	0,3	$0,32 \pm 0,03$
Cd mg/kg	0,0049	0,0039	0,0044	$0,0044 \pm 0,0004$	0,0046	0,0041	0,004	$0,0042 \pm 0,0003$
Mn mg/kg	2,95	4,32	3,33	$3,53 \pm 0,58$	2,89	4,12	3,21	$3,41 \pm 0,52$
As mg/kg	0,25	b.d.l.	b.d.l.	b.d.l.	0,25	0,26	0,21	0,24

Tabelle 3: In dieser Tabelle sind die Konzentrationen der einzelnen Elemente für die Se(+) und Se(-)-Prostatas angegeben. (b.d.l. = below detection limit)



Graphik 12: In diesem Diagramm sind die Mittelwerte der Konzentrationen der Elemente aus der obigen Tabelle graphisch dargestellt.

Die Messungen der elektrothermalen AAS zeigen leichte Abweichungen von den Werten der INAA. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei den Probenaufbereitungen für die AAS kleinere Kontaminationen aufgetreten sein könnten. Aber im Ganzen bestätigen die AAS-Messungen diejenigen von der INAA.

Wie zu erwarten war, lagen die Werte bei der Selenmessung weit auseinander bei den beiden unterschiedlich mit Selen gefütterten Tiergruppen. Die Se(+)-Tiere hatten eine Selenkonzentration von 2,22 mg/kg und die Se(-)-Tiere einen Wert von 0,32 mg/kg, was bei beiden Werten eine Abweichung von 0,1 mg/kg von den INAA-Werten ergibt.

Die Abweichungen für das gemessene Mangan sind erheblich grösser, liegen aber in der gleichen Größenordnung wie die Manganwerte der INAA-Messung. Sie zeigten aber auch, dass die Se(+)-Tiere mit 3,53 mg/kg eine höhere Mangankonzentration haben als die Se(-)-Tiere mit 3,41 mg/kg. Diese Messungen bestätigen die Annahme, dass die Selenkonzentration einen Einfluss auf den Manganstatus in der Prostata in der Weise hat.

Die anderen beiden untersuchten Elemente Kupfer und Cadmium zeigen nur geringste Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen und liegen nur innerhalb der Fehlertoleranz. Kupfer hat eine Konzentration von 3,95 mg/kg und Cadmium nur 0,0043 mg/kg. Der Selenstatus scheint keinen Einfluss auf die Konzentrationen von Cadmium und Kupfer in der Prostata zu haben.

Im Gegensatz zur Messung mit der INAA konnte Arsen in den Se(-)-Tieren mit 0,24 mg/kg nachgewiesen werden, nicht jedoch in den Se(+)-Tieren. Diesen Unterschied zu den Messungen der INAA kann man sich nur auf zweierlei Weisen erklären. Entweder ist es eine Kontamination der Probe an sich oder die Ratten wurden in vivo mit etwas Arsenhaltigem in Kontakt gebracht. Wenn der zweite Fall zutrifft, dann erkennt man, dass die Se(-)-Tiere Arsen besser inkorporiert haben als die Se(+)-Tiere.

#### **5.1.2.1. Spurenelementbestimmung in den Prostatazytosolen mit der AAS**

Das Zytosol, eine der subzellulären Fraktionen (Überstand bei 100.000 x g) der Prostata, wurde ohne weitere Behandlung mit der AAS direkt gemessen. Die anderen subzellulären Fraktionen wie die Kerne, Mitochondrien und Microsomen konnten nicht gemessen werden, da die Probenmengen für den Aufschluss nicht ausreichten. Da im Zytosol sämtliche Stoffe gelöst vorliegen, entfiel die Notwendigkeit des Aufschlusses.

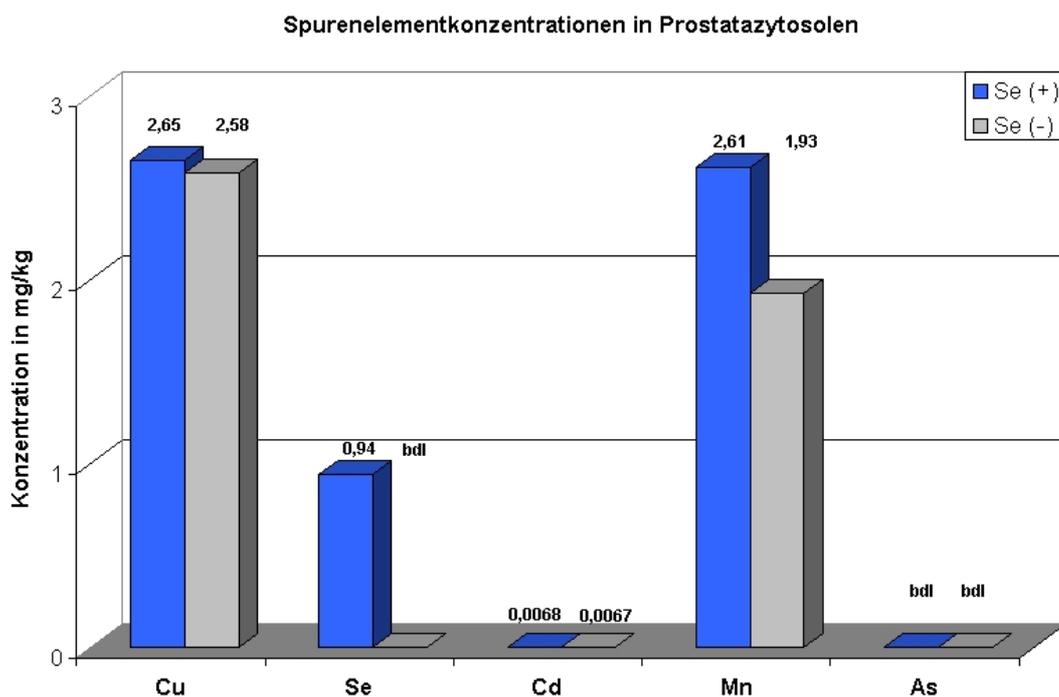
Die Zytosole von drei weiteren Prostatas je Gruppe wurden separat behandelt. Je Gramm Probenmenge wurden 3 ml 20 mM Tris-Puffer (pH:7,4/HNO<sub>3</sub>) hinzugefügt. Durch differentielle

Zentrifugation wurden alle anderen sedimentierbaren Bestandteile von der Lösung, welche das Zytosol ist, abgetrennt. Durch den Bradford-test wurde in den Zytosolen der Proteingehalt gemessen, damit es einen Bezugswert zu der Spurenelementkonzentration gibt. Hierbei wurde eine Konzentration um ca. 20 µg/µl eingestellt.

Die Durchschnittswerte der gemessenen Spurenelemente in den drei Zytosolen je Gruppe sind in Tabelle 4 nachfolgend aufgelistet und im folgenden Diagramm als Graphik 14 dargestellt:

Konzentration der Spurenelemente in den Zytosolen in mg pro kg		
	Ø Se(+)-Tiere	Ø Se(-)-Tiere
Cu	2,65 ± 0,14	2,58 ± 0,1
Se	0,94 ± 0,08	b.d.l.
Cd	0,0068 ± 0,0004	0,0067 ± 0,0004
Mn	2,61 ± 0,41	1,93 ± 0,39
As	b.d.l.	b.d.l.

Tabelle 4: Diese Tabelle zeigt die Durchschnittswerte der gemessenen Spurenelemente: Kupfer, Selen, Cadmium, Mangan und Arsen in den Zytosolen der beiden Rattengruppen.



Graphik 14: Dieses Diagramm stellt die Werte der Tabelle 4 graphisch dar und zeigt die Konzentrationen von Spurenelementen in Prostatazytosolen an.

Die Prostatazytosole zeigen im Allgemeinen eine geringere Spurenelementkonzentration als die Lösungen der Mikowellenaufschlüsse der ganzen Prostatas. Nur die Elementkonzentrationen für

das Cadmium lagen um ca. 50 % höher als bei den ganzen Prostatas, welche nur bei ca. 0,004 mg/kg und im Zytosol bei über 0,0065 mg/kg lag.

Der Selengehalt der Se(+)-Prostatazytosole lag bei knapp unter 1 mg/kg, wohingegen die Konzentration bei den Se(-)-Zytosolen nicht messbar war, da sie unterhalb der Nachweisgrenze lag.

Die Werte für Kupfer lagen bei 2,65 mg/kg und 2,58 mg/kg und unterscheiden sich nur innerhalb der Fehlertoleranz, so dass auch hier kein erkennbarer Einfluss vom Selengehalt zu erkennen ist.

Für den Mangangehalt ergibt sich ein viel deutlicherer Unterschied zwischen den Zytosolen der beiden unterschiedlich Selen-gefütterten Tiergruppen. Mit 2,61 mg/kg Mangan liegt der Wert der Se(+)-Tiere deutlich über dem Wert der Se(-)-Tiere mit nur 1,93 mg/kg. Für die Expression von manganhaltigen Proteinen scheint die Anwesenheit von Selenoproteinen unabdingbar zu sein.

Arsen konnte in den Zytosolen nicht nachgewiesen werden.

Die Cadmiumwerte in den Zytosolen liegen über den Werten der gesamten Prostata. Dabei unterscheiden sich die Werte der Se(+)-Tiere und Se(-)-Tiere nur innerhalb der Fehlertoleranz und scheinen nicht vom Selenstatus beeinflusst zu werden.

Um die Werte der INAA und der AAS zu verifizieren, wurden die aufgeschlossenen Prostatas noch mit Hilfe der ICP-MS gemessen.

### **5.1.3. Spurenelementgehaltbestimmungen mittels ICP-MS**

Mit der induktiv-gekoppelten-Plasma-Massenspektroskopie (ICP-MS) lassen sich leicht viele Elemente gleichzeitig messen. Allerdings sind die Messungen nicht so genau wie die der AAS und benötigen die gleiche aufwendige Probenvorbereitung wie bei der AAS.

Auch hier wurden jeweils drei Prostatas je Gruppe lyophilisiert und anschliessend mit dem Mikrowellenofen aufgeschlossen.

Ein weiteres Problem bestand darin, die richtigen Parameter zu wählen um optimale Ergebnisse zu erzielen. Hierbei wurden folgende Parameter benutzt, um eine möglichst geringe Oxydrate zu bekommen und wenige doppelt geladene Metallionen zu erhalten bei größtmöglicher Plasmaintensität:

**System:** Agilent 7500c

**Zerstäuber:** mikrokonzentrischer PFA-Zerstäuber (~100  $\mu\text{l}/\text{min}$ )

**Sprühkammer:** Scott-Kammer gekühlt auf 4°C

**Intensitäten:** Li,  $m/z = 7$ : 130.970 cps; Y,  $m/z = 89$ : 221.940 cps; Tl,  $m/z = 205$ : 138.250 cps für 10  $\mu\text{g}/\text{l}$  Standard

**Oxidrate:** 0,93 % ( $\text{CeO}^+/\text{Ce}^+ = 156/140$ )

**doppeltgeladenen Ionen:** 1,47 % ( $\text{Ce}^{++}/\text{Ce}^+ = 70/140$ )

**Plasmaleistung:** 1420 W

**Zerstäubergas:** 0,84 l/min, Make-up Gas: 0,24 l/min

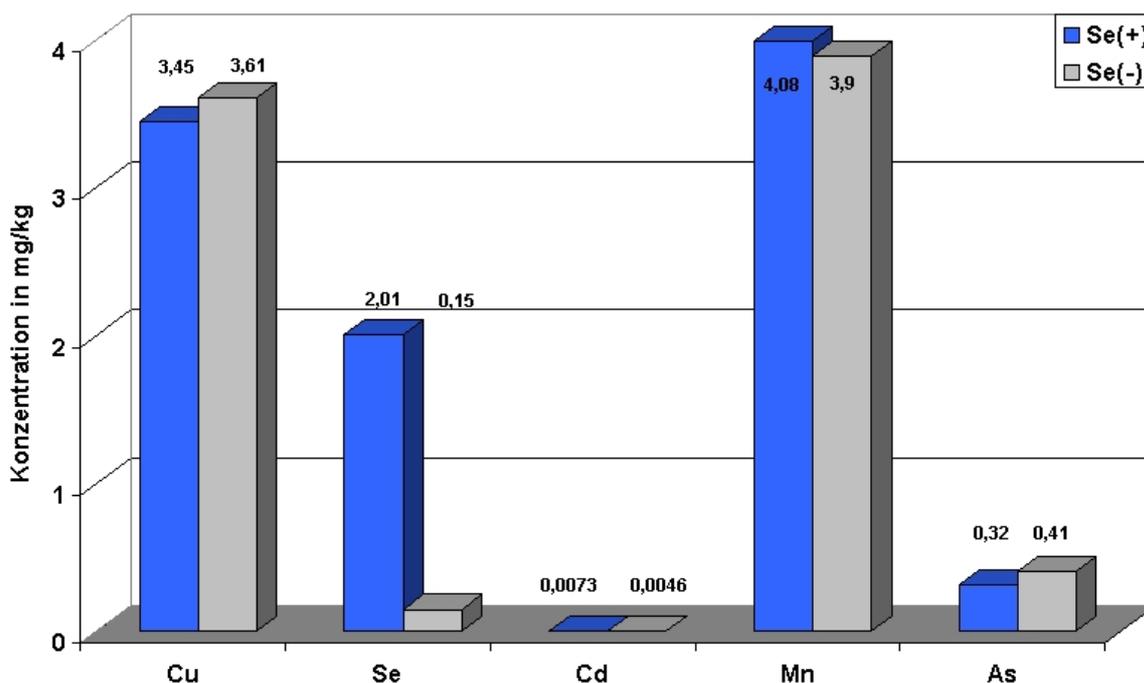
Die Elemente Cadmium (Cd-111) und Mangan (Mn-55) wurden im Standardmodus ohne Kollisionsgas gemessen, Arsen (As-75) und Kupfer (Cu-63) wurden mit Kollisionszelle im Heliummodus bei einem Gasfluss von 4 ml/min an Helium gemessen. Die Selenmessung (Se-78) erfolgte im Wasserstoffmodus (2 ml/min).

Für diese Einstellungen wurden folgende Werte erhalten:

Konzentration	ICP-MS Messung der Prostatas von							
	Tier 1 Se(+)	Tier 2 Se(+)	Tier 3 Se(+)	$\bar{\sigma}$ Se(+)	Tier 1 Se(-)	Tier 2 Se(-)	Tier 3 Se(-)	$\bar{\sigma}$ Se(-)
Cu	3,51	3,13	3,72	$3,45 \pm 0,24$	3,61	3,95	3,28	$3,61 \pm 0,27$
Se	1,71	1,87	2,45	$2,01 \pm 0,32$	0,12	0,15	0,19	$0,15 \pm 0,03$
Cd	0,0119	0,0057	0,0044	$0,0073 \pm 0,0033$	0,0037	0,0054	0,0048	$0,0046 \pm 0,0007$
Mn	4,32	4,37	3,55	$4,08 \pm 0,38$	4,13	3,68	3,88	$3,90 \pm 0,18$
As	0,39	0,25	0,32	$0,32 \pm 0,06$	0,41	0,4	0,42	$0,41 \pm 0,1$

Tabelle 5: In dieser Tabelle sind die Werte aus der ICP-MS Messung für die gesamten Prostatas der beiden Sengruppen aufgelistet.

### Spurenelementkonzentrationen in der gesamten Prostata



Graphik 15: In diesem Diagramm sind die Werte aus Tabelle 5 graphisch dargestellt und zeigen die Spurenelementkonzentrationen in der Prostata von Se(+) und Se(-) Ratten.

Die ICP-MS Daten bestätigen die vorangegangenen Messungen der AAS und der INAA mit geringen Abweichungen. Auffällig ist nur die messbare Konzentration von Arsen, welche in den vorhergehenden Messungen nur in geringsten Mengen gemessen werden konnten oder unter der Nachweisgrenze lagen.

Die Selenkonzentration in den Prostatas, die mit Hilfe der ICP-MS gemessen wurden, ähneln stark denen der INAA. Sie lagen bei 2,01 mg/kg und 0,15 mg/kg.

Die Kupferwerte differierten nur leicht von denen der AAS und lagen mit 3,45 mg/kg für Se(+)-Tiere und 3,61 mg/kg für Se(-)-Tiere knapp unter den Werten der AAS.

Während die Cadmiumwerte bei der AAS noch recht nahe beieinander lagen, differierten die gemessenen Werte der ICP-MS für beide Gruppen beträchtlich. Die Se(+)-Tiere lagen mit 0,0073 mg/kg deutlich über den Werten der Se(-)-Tiere mit 0,0046 mg/kg.

Die mit der ICP-MS gemessenen Manganwerte liegen sowohl über den Werten der INAA als auch der AAS. Wiederum liegt der Wert der Se(+)-Tiere mit 4,08 mg/kg über denen der Se(-)-Tiere mit 3,90 mg/kg, wie schon bei der INAA und der AAS. Es fällt auf, dass die Se(+)-Tiere wesentlich weniger Arsen aufgenommen haben als die Se(-)-Tiere. Mit Werten von 0,32 mg/kg für die Se(+)-Tiere und 0,41 mg/kg für die Se(-)-Tiere, ist eine Anreicherung in den Se(-)-Tiere zu erkennen.

## Zusammenfassung von Kapitel 5.1: Spurenelementgehaltsbestimmungen

Mit Hilfe der INAA, der ICP-MS und der AAS konnte eine Spurenelementgehaltbestimmung in der ganzen Prostata und mit Hilfe der AAS auch eine Bestimmung im Zytosol der Prostata durchgeführt werden. Hierbei wurde auch der Einfluss des Selenstatus der Versuchstiere auf andere Spurenelemente untersucht.

Die Resultate der Messungen mit den drei Methoden variierten von Methode zu Methode ein wenig, was zum Teil an der Probenvorbereitung (Gefriertrocknung und Homogenisieren für die INAA und Mikrowellenaufschluss für die ICP-MS und AAS) liegt. Mit der INAA konnten die Konzentrationen der Elemente: Se, Mn, As, Zn, Fe, Cr, Co, Sb und Rb gemessen werden, jedoch keine Cu- und keine Cd- Konzentrationen.

Mit den beiden Methoden AAS und ICP-MS konnten die Konzentrationen der Elemente: Se, Mn, As, Cd und Cu bestimmt werden.

Hierbei zeigt sich, dass bei den Messungen mit den drei Methoden der Selenstatus der Rattenprostatas gut nachgewiesen werden konnte. Der Selengehalt der Se(+)- Rattenprostatas lag zwischen 2,01 und 2,22 mg kg<sup>-1</sup> während der Selengehalt der Se(-)- Rattenprostatas bei 0,15 bis 0,32 mg kg<sup>-1</sup> lag. Die Selenkonzentrationen in den Se(+)- Rattenprostatas lagen somit um ca. eine Größenordnung höher als die Selenkonzentration der Se(-)- Rattenprostatas.

Die Mangankonzentrationen der Rattenprostatas variieren etwas stärker von Methode zu Methode. Die höchsten Mangankonzentrationen wurden mit der ICP-MS mit 4,08 mg kg<sup>-1</sup> für die Se(+)- Rattenprostatas und 3,9 mg kg<sup>-1</sup> für die Se(-)-Rattenprostatas und die niedrigsten Mangankonzentrationen mit der INAA mit 2,85 mg kg<sup>-1</sup> für die Se(+)- Rattenprostatas und 2,48 mg kg<sup>-1</sup> für die Se(-)- Rattenprostatas bestimmt. Ausser bei den AAS-Messungen, wo die Werte der Mangankonzentrationen nahezu gleich waren, zeigten die Mangankonzentrationen einen etwas höheren Wert bei den Se(+)-Rattenprostatas als bei den Se(-)- Rattenprostatas. Da die Unterschiede der Mangankonzentrationen zwischen den drei Methoden grösser sind als die Unterschiede der Mangankonzentrationen zwischen den Se(+)-Rattenprostatas und den Se(-)- Rattenprostatas kann mit letzter Sicherheit keine Abhängigkeit der Mangankonzentration vom Selenstatus gezeigt werden, auch wenn es eine leichte Tendenz gibt, dass ein hoher Selenstatus der Ratten auch einen höheren Manganstatus in der Rattenprostata hervorruft.

Die Arsenkonzentrationen in den Rattenprostatas konnten nicht mit der INAA und nur bedingt mit der AAS bestimmt werden, da die Werte unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Mit der AAS konnten nur die Arsenkonzentrationen der Se(-)- Prostatas (0,24 mg kg<sup>-1</sup>) bestimmt werden. Mit der ICP-MS konnten sowohl die Arsenkonzentrationen in den Se(+)- Rattenprostatas (0,32 mg kg<sup>-1</sup>) als auch in den Se(-)- Rattenprostatas (0,41 mg kg<sup>-1</sup>) bestimmt werden. Hierbei

zeigt sich eine deutliche Tendenz, dass die Arsenkonzentration mit abnehmendem Selenstatus zunimmt.

Die Eisenkonzentrationen und Zinkkonzentrationen wurden nur mit der INAA gemessen, da bei der Probenvorbereitung für die ICP-MS und die AAS erfahrungsgemäss zu starke Kontaminationen aufgetreten wären und die Resultate verfälscht hätten. Die Eisenkonzentration war in den Se(+)- Rattenprostatas ( $154 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ein wenig höher als bei den Se(-)- Rattenprostatas ( $146 \text{ mg kg}^{-1}$ ), was noch innerhalb der Fehlertoleranz liegt. Die Zinkkonzentrationen zeigen in den Se(+)- Rattenprostatas ( $74 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ebenfalls einen etwas höheren Wert an als die Se(-)- Rattenprostatas ( $63 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Diese Konzentrationsangaben liegen nicht mehr innerhalb der Fehlertoleranz, könnten aber kontaminiert sein. Sowohl die Messungen der Eisen- als auch der Zinkkonzentration sind wenig aussagekräftig und geben keinen Rückschluss auf einen Einfluss des Selenstatus auf diese beiden Elemente.

Das Element Cadmium konnte nicht mit der INAA sondern nur mit der AAS und der ICP-MS gemessen werden. Sowohl die Konzentrationen der Se(-)- Rattenprostatas als auch die der Se(+)- Rattenprostatas hatten einen Wert von ca.  $0,004 \text{ mg kg}^{-1}$ . Der Selenstatus hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Cadmiumkonzentration in den Rattenprostatas.

Ebenfalls nur mit der AAS und der ICP-MS war das Element Kupfer messbar. Die Kupferkonzentration in den Rattenprostatas lag zwischen  $3,45 \text{ mg kg}^{-1}$  und  $3,95 \text{ mg kg}^{-1}$  und war vom Selenstatus unabhängig.

Die nur mit der INAA bestimmten Konzentrationen für Chrom und Kobalt sind ebenfalls vom Selenstatus unabhängig. Die Konzentration für Kobalt in den Rattenprostatas lag zwischen  $0,22 \text{ mg kg}^{-1}$  und  $0,23 \text{ mg kg}^{-1}$ . Die Chromkonzentrationen in den Rattenprostatas lag zwischen  $1,02 \text{ mg kg}^{-1}$  und  $0,98 \text{ mg kg}^{-1}$ , was unter Berücksichtigung der Fehlertoleranz keinen Unterschied darstellt. Die Konzentrationen in den Rattenprostatas unterscheiden sich nur für Selen und Arsen in Abhängigkeit vom Selenstatus signifikant. Die leichten Unterschiede bei den Eisen-, Zink- und Mangankonzentrationen in Abhängigkeit vom Selenstatus lassen einen Einfluss vom Selenstatus auf die Konzentrationen dieser Elemente in den Rattenprostatas vermuten, können aber nicht mit Sicherheit bestätigt werden. Ein Einfluss des Selenstatus auf die Konzentrationen der Elemente Chrom, Kobalt und Kupfer in den Rattenprostatas ist nicht zu erkennen.

Beim Vergleich der AAS Messungen der Rattenprostatas mit den Rattenzytosolen sind kleine Unterschiede zu erkennen.

Die Selenkonzentration konnte mit  $0,94 \text{ mg kg}^{-1}$  nur für die Se(+)-Zytoplaste bestimmt werden, während die Selenkonzentration der Se(-)-Zytoplaste unter der Nachweisgrenze lag. Bis auf die

Cadmiumkonzentrationen lagen auch die Konzentrationen aller anderen gemessenen Elemente bei den Zytosolen niedriger als bei den gesamten Rattenprostatas.

Die Cadmiumkonzentrationen lagen unabhängig vom Selenstatus mit ca.  $0,007 \text{ mg kg}^{-1}$  wesentlich höher in den Zytosolen als mit ca.  $0,004 \text{ mg kg}^{-1}$  in den gesamten Rattenprostatas.

Der Unterschied zwischen den Mangankonzentrationen der Se(+)-Zytosole und Se(-)-Zytosole war mit  $2,61 \text{ mg kg}^{-1}$  (Se(+)) und  $1,93 \text{ mg kg}^{-1}$  (Se(-)) grösser als bei den ganzen Prostatas, was beweist, dass der Selenstatus einen Einfluss auf die Mangankonzentrationen zumindest im Zytosol hat.

Der Vergleich zwischen den AAS-Messungen des Zytosols und der Gesamtprostata zeigt vor allem, dass die Konzentrationen der Elemente Se, Cu, Mn und As abgenommen haben, aber auch dass die Cadmiumkonzentration im Zytosol höher ist. Der Selenstatus hatte bis auf die Bestimmungen der Mangankonzentrationen in den Zytosolen den selben Einfluss wie auch schon in der Gesamtprostata.

Aufgrund der durchgeführten zahlreichen Messungen mit den drei verschiedenen Methoden kann gesagt werden, dass jede Methode geeignet ist die Konzentrationen bestimmter Elemente anzugeben. Die INAA sollte jedoch als Erste Bestimmungsmethode angewendet werden, da sie den Vorteil hat, dass sie eine Multielementmethode ist und die Probenvorbereitung einfach und kontaminationsarm ist.

## 5.2. Chromatographisch- analytische Untersuchungen

### 5.2.1. Detektion von spurenelementhaltigen Proteinen im Gewebezcytosol der Prostata mit Hilfe der SEC-ICP-MS

Durch die bisher beschriebenen Methoden konnten die Spurenelementkonzentrationen in den Gewebe- und den Zytosolproben quantitativ bestimmt werden. Jedoch konnte damit nicht gezeigt werden, ob diese Spurenelemente an Proteine gebunden oder aber frei in Lösung vorliegen. Einige Spurenelemente wie z.B. das Selen liegen bis zu 85 % proteingebunden vor (74).

Durch die vor die ICP-MS gekoppelte Größenausschlusschromatographie (engl. Size exclusion chromatography / SEC) können in Lösung befindliche Stoffe wie Proteine in den Zytosolen nach ihrer Größe aufgetrennt werden. So können Proteine entsprechend nach ihrer Masse aufgetrennt werden und gleichzeitig deren Spurenelementgehalt gemessen werden. Die SEC ist ein sehr schonendes Trennverfahren, bei dem die Auftrennung der Proteine unter Erhalt der Proteinstruktur und der Spurenelementbeladung stattfindet. Eine Einschränkung ist jedoch das beschränkte chromatographische Auflösungsvermögen, es können vorwiegend nur Proteinfractionen aufgetrennt werden und nur in Ausnahmefällen einzelne Proteine. Daher kann nur eine Aussage über Fraktionen bestimmter Massenbereiche und deren gebundene Metalle und Metalloide getroffen werden.

Für die Durchführung der Chromatographie wurden drei Prostatagewebe je Tiergruppe in einem Ultraschallbecher (Branson Sonifier, W-450 mit parabolischem Becherresonator, Heinemann, Germany – Parameter: 4 °C, 10 min, 450 W und 50 % Pulsation) homogenisiert und anschließend durch Ultrazentrifugation bei 100.000 x g (4 °C, 80 min) aufgetrennt, um das Zytosol zu gewinnen. Diese Zytosole wurden anschließend durch die Chromatographie fraktioniert.

Für die Probentrennung wurden folgende Parameter gewählt:

**Chromatographie System:** Agilent Series 1100

**Probenmenge:** 10 µl (gekühlter Autosampler 4°C)

**Mobile Phase:** 50 mmol/l Tris/HNO<sub>3</sub> (pH: 7,4)

**Flussrate:** 100 µl/min, Druck:  $p = 18 \text{ bar}$

**Säule:** Amersham Pharmacia Superdex 75PC 3.2/30

**Vorsäule:** Phenomenex security guard mit GFC-3000 (4L x 3.0 ID)

**Detektor:** UV 204, 258, 280 nm.

Vor den Chromatographieläufen wurde die Säule gründlich mit einem SDS und EDTA- Puffer gereinigt und mit ca. 25 Säulenvolumina Laufpuffer gespült.

Die Detektion der Elemente erfolgte mittels online gekoppeltem ICP-MS.

**ICP-MS-System:** Agilent 7500c

**Modus:** Standard (kein Kollisionsgas)

**Zerstäuber:** mikrokonzentrischer PFA-Zerstäuber ( $\sim 100 \mu\text{l}/\text{min}$ ) mit gekühlter Scott-Kammer ( $4^\circ\text{C}$ )

**Intensitäten:** für  $10 \mu\text{g}/\text{l}$  Standardlösung Y,  $m/z = 89$ : 221.940 cps

**Oxidrate:**  $\leq 1 \%$

**doppeltgeladene Ionen:**  $\leq 2 \%$

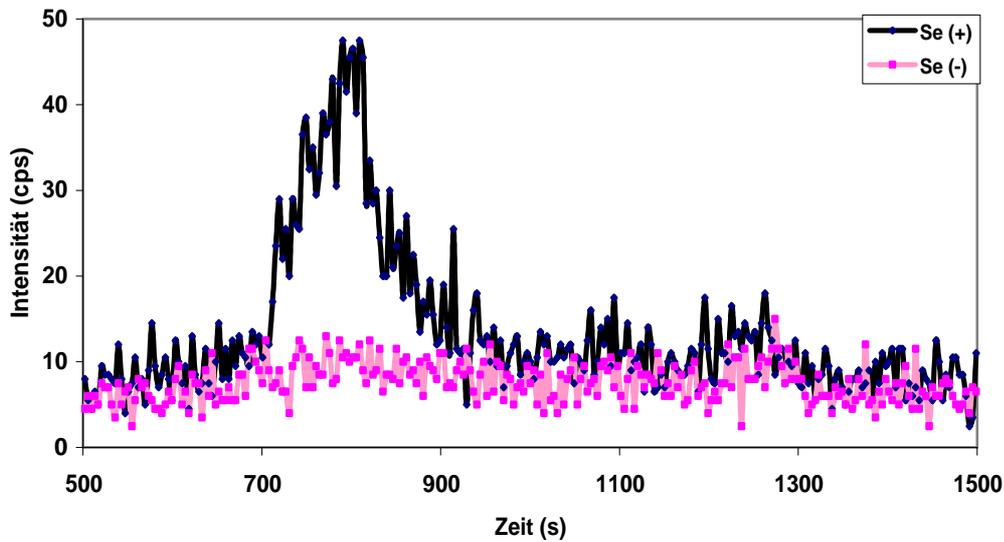
**Plasmaleistung:** 1300 W

**Zerstäubergas:**  $0.84 \text{ l}/\text{min}$ , Make-Up Gas:  $0.25 \text{ l}/\text{min}$

Es wurde ein interner Standard mit  $10 \mu\text{g}/\text{l}$  Rh, Ir, Ge, Y in  $0.12 \%$   $\text{HNO}_3$  verwendet, der über ein T-Stück zwischen dem UV-Detektor und dem Zerstäuber mit einer Flussrate von  $50 \mu\text{l}/\text{min}$  zugegeben wurde.

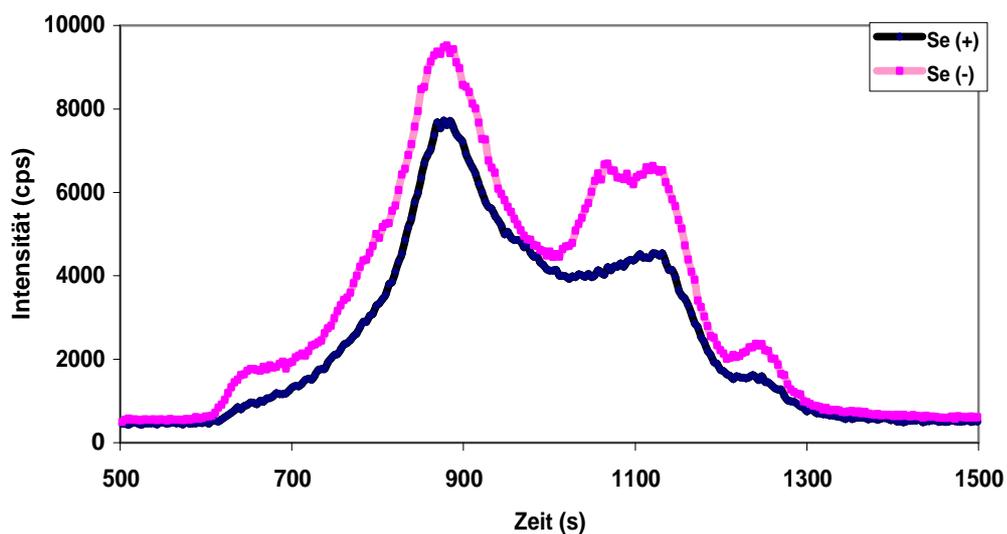
Die Resultate der SEC-ICP-MS-Messungen wurden als Intensitäts-Retentionszeit-Profile dargestellt. Über eine Säulenkalibrierung, bei der die Retentionszeit bekannter Einzelproteine gegen den Logarithmus ihrer molekularen Massen aufgetragen wird, erhält man eine Kalibriergerade. Mit deren Hilfe können die ungefähren Molekularmassen der Proteinfractionen anhand der Retentionszeit abgeschätzt werden. Die Intensität ist in Zählimpulse je Sekunde (counts per second) und die Retentionszeit in Sekunden (s) angegeben. Die Profile sind folgend abgebildet:

### SEC-ICP-MS $^{82}\text{Se}$ (Zytosol der Rattenprostata)



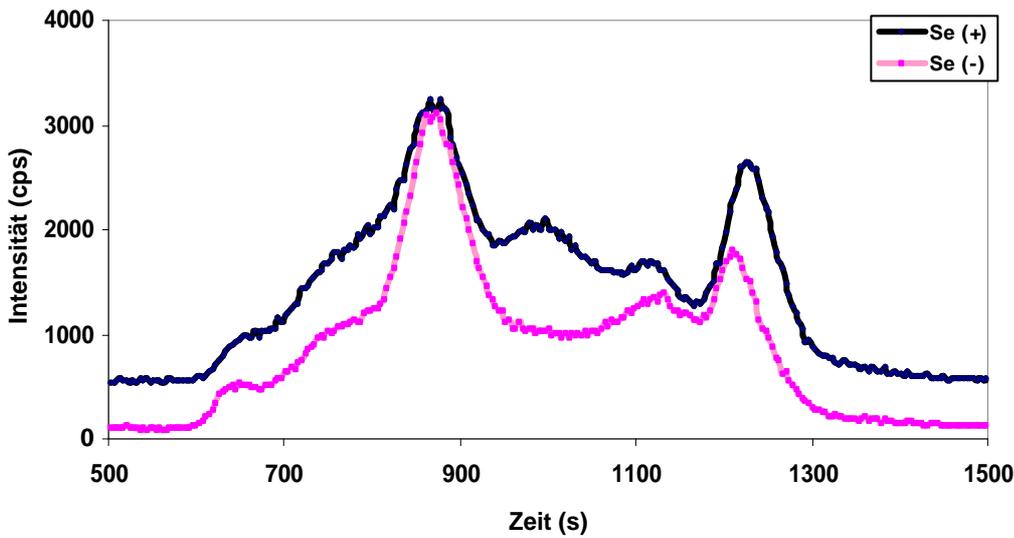
Graphik 16: Dargestellt sind die Selenprofile der aufgetrennten Prostatazytosole der Selenmangeligen Tiere (grau) und der Selen-adäquat ernährten Tiere (schwarz). Das Profil des Se(+)-Zytosols zeigt ein Signal bei  $t = 800$  s, wohingegen das Profil des Se(-)-Zytosols kein Signal zeigt.

### SEC-ICP-MS $^{64}\text{Zn}$ (Zytosol der Rattenprostata)



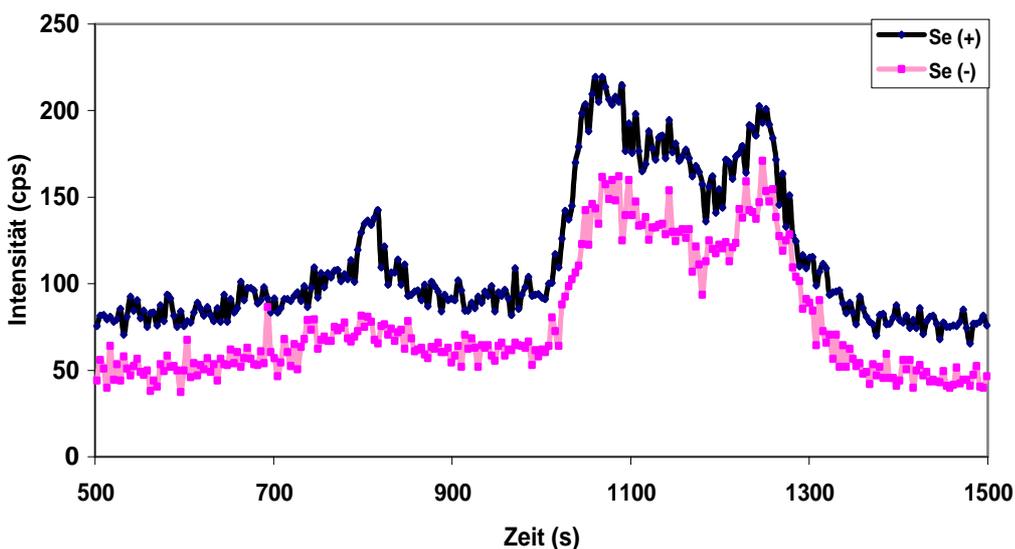
Graphik 17: Dargestellt sind die Zinkprofile der aufgetrennten Prostatazytosole der Selenmangeligen Tiere (grau) und der Selen-adäquat ernährten Tiere (schwarz). Beide Profile zeigen Signale bei  $t = 650$ ,  $880$ ,  $1140$  und  $1230$  s. Die Se(-)-Zytosole zeigen ein zusätzliches Signal bei  $t = 1040$  s.

SEC-ICP-MS  $^{65}\text{Cu}$  (Zytosol der Rattenprostata)

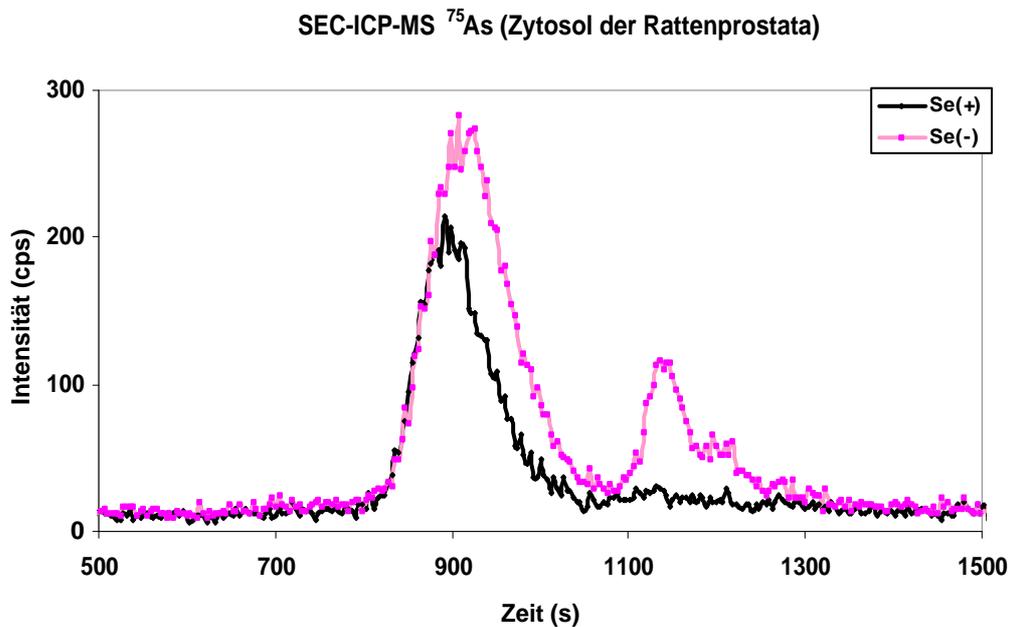


Graphik 18: Dargestellt sind die Kupferprofile der aufgetrennten Prostatazytosele der Selen-mangeligen Tiere (grau) und der Selen-adäquat ernährten Tiere (schwarz). Die Signale beider Profile liegen bei  $t = 640, 870, 1140$  und  $1210$  s. Die Se(+)-Zytosole weisen ein zusätzliches Signal bei  $t = 980$  s.

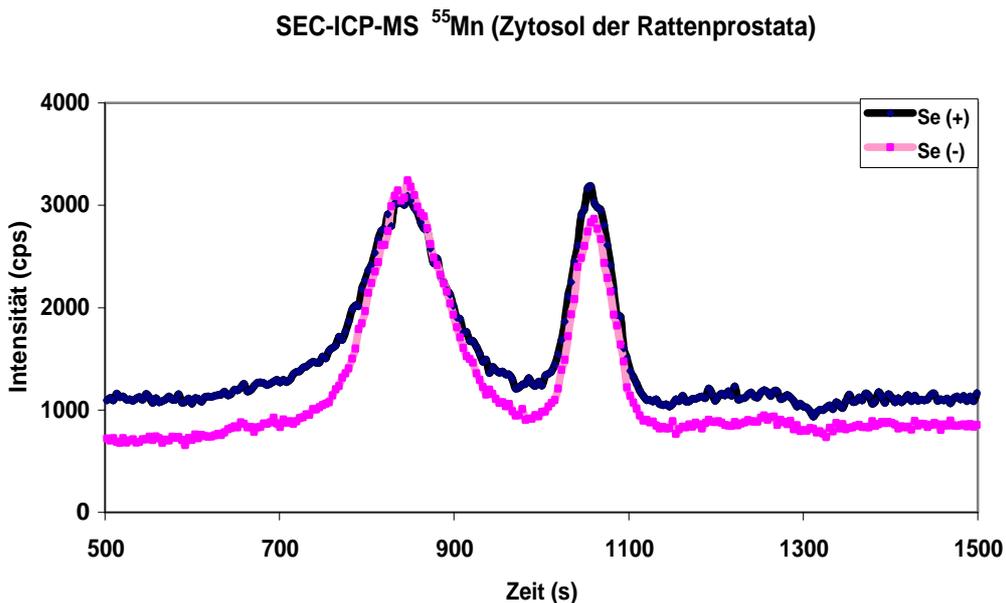
SEC-ICP-MS  $^{59}\text{Co}$  (Zytosol der Rattenprostata)



Graphik 19: Dargestellt sind die Kobaltprofile der aufgetrennten Prostatazytosele der Selen-mangeligen Tiere (grau) und der Selen-adäquat ernährten Tiere (schwarz). Sowohl die Profile der Se(+)-Zytosole als auch die Profile der Se(-)-Zytosole zeigen sehr verrauschte Signale bei  $t = 810, 1080$  und  $1290$  s.

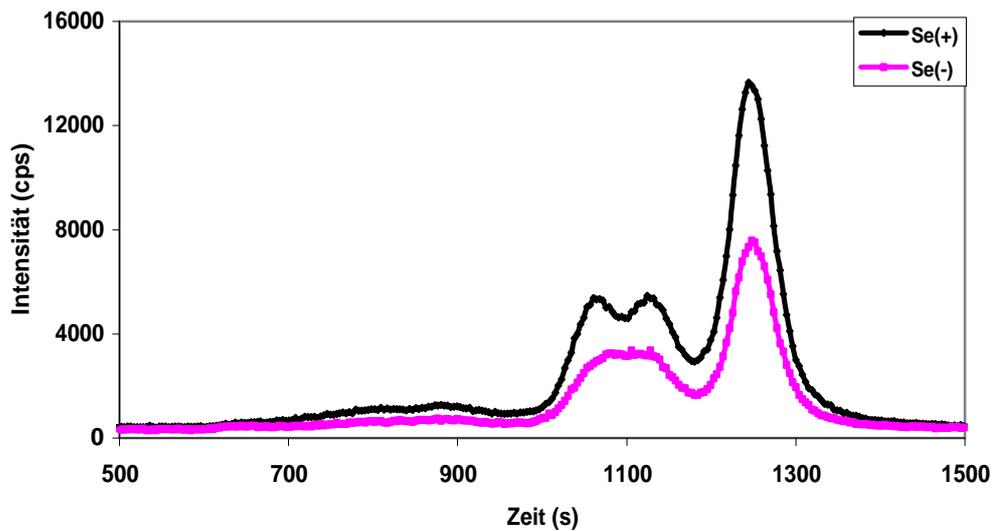


Graphik 20: Dargestellt sind die Arsenprofile der aufgetrennten Prostatazytosole der Selenmangeligen Tiere (grau) und der Selen-adäquat ernährten Tiere (schwarz). Das Se(-)-Zytosole zeigt zwei Signale bei  $t = 910$  und  $1150$  s. Wohingegen das Se(+)-Zytosol kein Signal bei  $t = 1150$  s zeigt.



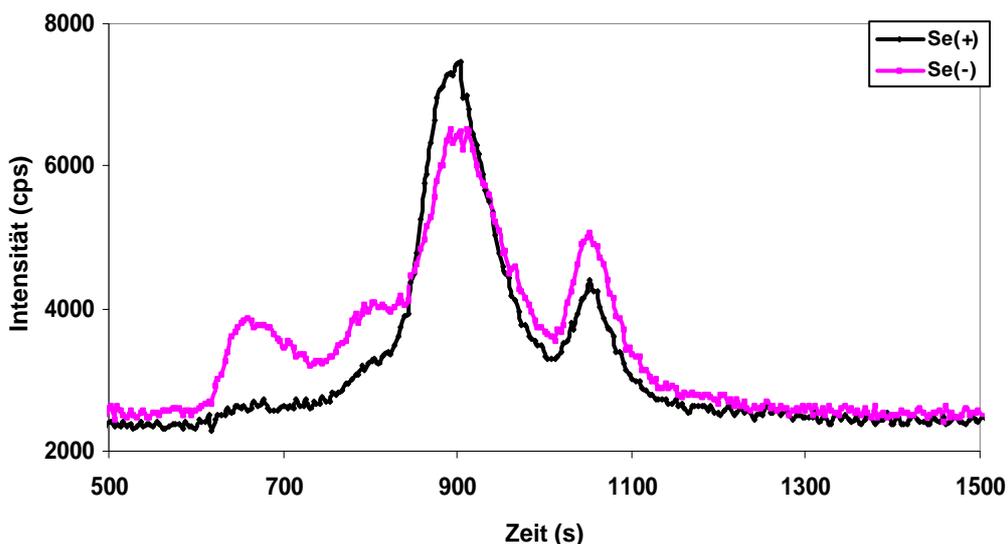
Graphik 21: Dargestellt sind die Manganprofile der aufgetrennten Prostatazytosole der Selenmangeligen Tiere (grau) und der Selen-adäquat ernährten Tiere (schwarz). Sowohl die Zytosole der Se(-)- als auch der Se(+)-Tiere zeigen die gleichen Signale bei  $t = 820$  und  $1070$  s.

SEC-ICP-MS  $^{60}\text{Ni}$  (Zytosol der Rattenprostata)



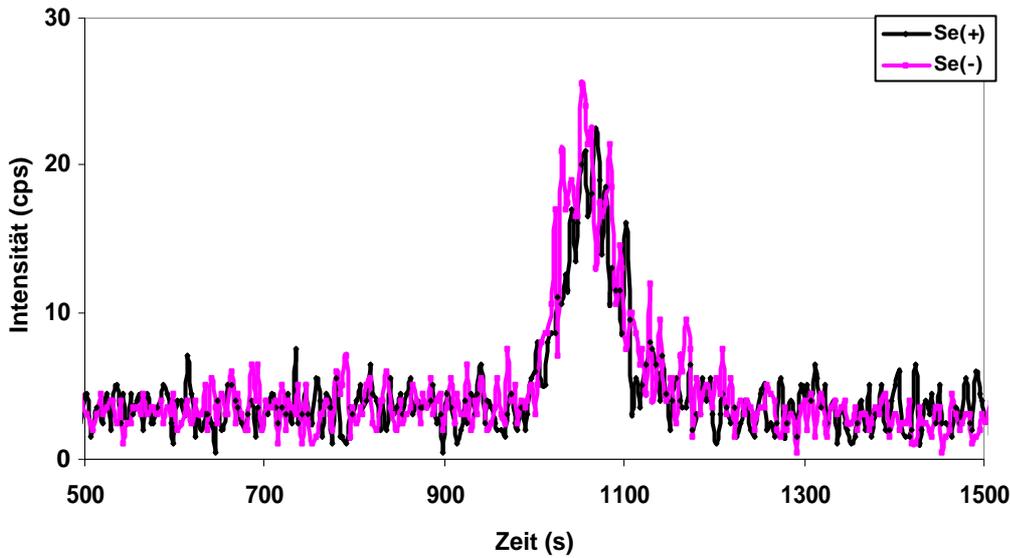
Graphik 22: Dargestellt sind die Nickelprofile der aufgetrennten Prostatazytosoale der Selen-mangeligen Tiere (grau) und der Selen-adäquat ernährten Tiere (schwarz). Beide Zytosole zeigen bei  $t = 1060, 1140$  und  $1280$  s annähernd gleiche Signale. Im Bereich zwischen  $t = 700$  und  $900$  s ist ein sehr schwaches nicht genau lokalisierbares Signal in beiden Profilen zu sehen.

SEC-ICP-MS  $^{54}\text{Fe}$  (Zytosol der Rattenprostata)



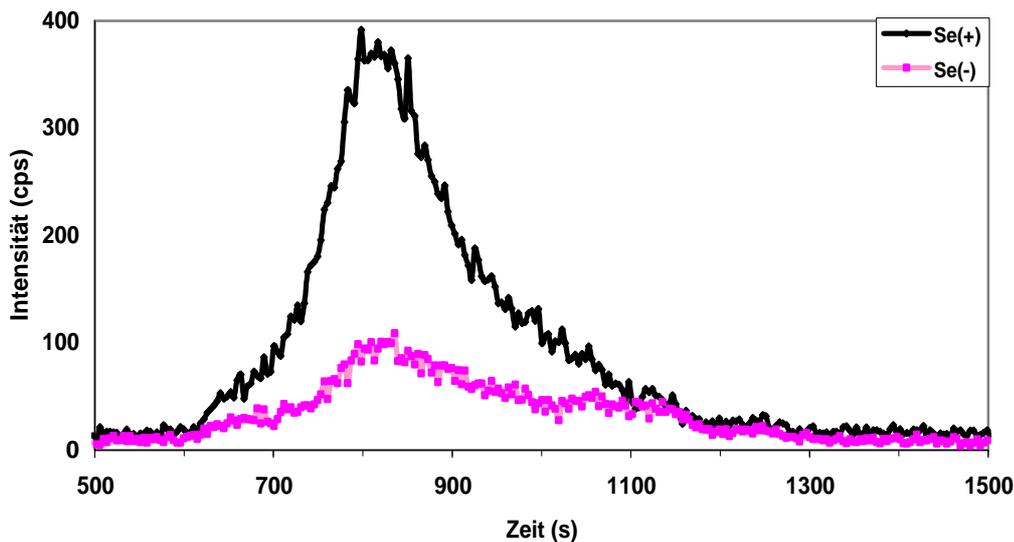
Graphik 23: Dargestellt sind die Eisenprofile der aufgetrennten Prostatazytosoale der Selen-mangeligen Tiere (grau) und der Selen-adäquat ernährten Tiere (schwarz). Beide Zytosole zeigen Signale bei  $t = 640, 800, 910$  und  $1050$  s, wobei die Signale bei  $t = 640$  und  $800$  s der Se(+)-Zytosole schwächer sind als bei dem Se(-)-Zytosol. Die manuelle Präparation der Gewebe in Hinsicht auf die Entfernung der Blutgefäße war schwierig, so dass unterschiedliche Blutgehalte in den Prostatas möglich sind.

SEC-ICP-MS  $^{118}\text{Sn}$  (Zytosol der Rattenprostata)



Graphik 24: Dargestellt sind die Zinnprofile der aufgetrennten Prostatazytosole der Selenmangeligen Tiere (grau) und der Selen-adäquat ernährten Tiere (schwarz). Die Zytosole zeigen unabhängig von dem Selenstatus das gleiche Signal bei  $t = 1060$  s.

SEC-ICP-MS  $^{111}\text{Cd}$  (Zytosol der Rattenprostata)



Graphik 25: Dargestellt sind die Cadmiumprofile der aufgetrennten Prostatazytosole der Selenmangeligen Tiere (grau) und der Selen-adäquat ernährten Tiere (schwarz). Zwei verbreiterte Signale sind bei  $t = 810$  und  $1100$  s in den Profilen der Zytosole zu erkennen, wobei der Peak bei  $t = 1100$  s nur sehr schwach ausgeprägt ist.

Durch die für die SEC kalibrierte Säule können den Banden und Peaks Molekularmassen zugeordnet werden. Hierbei sind die Zuordnungen der Molekularmassen entsprechend dem Trennbereich der Säule nur zwischen 5 kDa und 75 kDa möglich.

Das Selenprofil (Graphik 16; S.47) zeigt eindeutig nur einen verbreiterten Peak um 42 kDa bei den Se(+)-Tieren, wohingegen keine Peaks oder Banden bei den Se(-)-Tieren erkennbar waren, bzw. sie unter der Nachweisgrenze lagen.

Die beiden Zinkprofile (Graphik 17; S.47) zeigen klare Banden, die aussagekräftigere Resultate lieferten. Die beiden Profile weisen ein sehr ähnliches Bandenmuster auf, wobei die Se(-)-Zytoplaste bei ca. 12 kDa ein deutlich stärker ausgeprägtes Signal aufweisen. Ansonsten zeigen beide Profile die Existenz von mindestens 4 Proteinfractionen mit den Molekularmassen von 85 kDa, 28 kDa, 8 kDa und <6 kDa an.

Auch die beiden Kupferprofile (Graphik 18; S.48) zeigen eine gute Auflösung. Diese beiden Profile sind sich auch sehr ähnlich, unterscheiden sich jedoch in dem Gehalt einer kupferbindenden Proteinfraction. Jedoch ist es hier so, dass die Se(-)-Zytoplaste eine Proteinfraction weniger enthalten als die Se(+)-Zytoplaste. Diese Proteinfraction hat eine ungefähre Masse von 17 kDa. Vier weitere Proteine bei 85 kDa, 32 kDa, 9 kDa und bei <6 kDa sind bei beiden Zytoplasten vorhanden.

Die beiden Kobaltprofile (Graphik 19; S.48) zeigen trotz einer relativ schlechten Auflösung viele Ähnlichkeiten. Die Signale sind zum Teil schwer vom Untergrundrauschen zu unterscheiden. Beide Profile zeigen recht unscharfe Banden bei 40 kDa, 12 kDa und bei < 6kDa. Es fällt auf, dass bei den Se(-)-Tieren die 40 kDa-Bande wesentlich schwächer ausgeprägt ist als die bei den Se(+)-Tieren.

Die beiden Profile der Arsenmessungen (Graphik 20; S.49) zeigen ein deutliches Bild mit scharfen Peaks. Beide Profile unterscheiden sich jedoch deutlich voneinander. Bei 27 kDa zeigen beide Profile einen eindeutigen Peak, wobei der Peak bei den Se(-)-Zytoplasten verbreitert ist und sein Maximum scheinbar bei 23 kDa hat. Des Weiteren unterscheiden sich die Profile dadurch, dass das Se(-)-Zytoplaste einen zusätzlichen Peak bei 8 kDa aufweist.

Bei den Manganmessungen (Graphik 21; S.49) sind beide Profile deutlich erkennbar und unterscheiden sich im Grunde nicht. Beide Profile weisen bei 32 kDa und bei 12 kDa Peaks auf. Der Selenstatus scheint keinen Einfluss auf die mangangebundenen Proteine zu haben.

Die beiden Nickelprofile (Graphik 22; S.50) weisen eine ähnliche Struktur auf. Das Profil der Se(-)-Tiere zeigt weniger ausgeprägte Peaks als das Profil der Se(+)-Tiere. Zwei Banden von Proteinfractionen mit den Molekularmassen von 11 kDa und 9 kDa sind deutlich erkennbar.

Diese Banden sind im Gegensatz zu den Signalen von höhermolekularen Proteinfractionen sehr gut bestimmbar, auch wenn bei den Se(-)-Profilen keine genaue Abgrenzung, sondern ein Plateau zwischen diesen beiden Fraktionen zu beobachten ist. Eine dritte Bande ist außerdem noch bei einer Molekularmasse weit unter 6 kDa deutlich zu sehen. Da beide Profile das gleiche Muster von Nickelproteinfractionen zeigen, jedoch in unterschiedlicher Intensität, scheint der Selenstatus einen Einfluss auf alle Nickelproteinfractionen gleichermaßen zu haben und nicht auf einzelne Fraktionen wie bei den Zinkprofilen beschränkt zu sein.

Bei den Eisenmessungen (Graphik 23; S.50) wurden zwei Profile erhalten, die die gleichen vier Peaks bzw. Schultern aufwiesen, jedoch deren Signalstärke teilweise sehr voneinander variiert. Es gibt Peaks bzw. Schultern bei 81 kDa, 41 kDa, 25 kDa und 12 kDa. Bis auf die Bande bei 25 kDa sind alle anderen Banden stärker bei den Se(-)-Zytosolen ausgeprägt als bei den Se(+)-Zytosolen. Bei den Zytosolen der Se(-)-Tiere sind die vier Banden sehr gut zu erkennen, wohingegen die beiden höhermolekularen Banden im Profil der Se(+)-Zytosole sehr schwach ausgeprägt sind. Diese Unterschiede werden beeinflusst, von Kontaminationen durch Blutgefäße in den Geweben, die manuell nicht entfernbar gewesen sind.

Für das Element Zinn (Graphik 24; S.51) ergaben sich zwei fast identische Profile mit jeweils nur einem Peak. Da das Untergrundrauschen bei diesen Messungen sehr groß war, ist es nicht auszuschließen, dass noch weitere schwache Peaks vorhanden sind. Der deutlich sichtbare Peak liegt um 12 kDa. Durch das Rauschen ist diese Angabe nicht sehr genau und könnte um 3 kDa variieren.

Für Cadmium (Graphik 25; S.51) ist die Interpretation der Profile recht schwierig, da einerseits das Rauschen recht hoch ist und andererseits bei dem Zytosol der Se(+)-Tiere ein sehr großer und breiter Peak andere Peaks zum Teil stark überlagert. Beide Profile zeigen wahrscheinlich die gleichen drei Signale bei ca. 85 kDa, 39 kDa und 6 kDa. Die Maxima der Signale waren nur schwer zu bestimmen, weil die Peaks sehr breit sind. Bei den Se(-)-Zytosolen waren alle drei Signale sehr flach, aber deutlich zu erkennen, wohingegen bei den Se(+)-Zytosolen die Bande bei ca. 39 kDa eine hohe Intensität besitzt und die anderen beiden Peaks überdeckte, so dass diese nur als Schultern zu erkennen waren.

### 5.2.2. Proteintrennung und Nachweis proteingebundener Radiotracer

Mit der SEC-ICP-MS können die Proteine in den Proteinfractionen zwar auf deren Spurenelementgehalt überprüft werden, aber danach sind sie zerstört und nicht weiter analysierbar. Deswegen mussten die Proben mit Hilfe einer anderen zerstörungsfreien Methode detektiert werden, um weitere Analysen durchführen zu können. Auf Grund dessen wurden die Versuchstiere mit unterschiedlichen radioaktiven Elementen markiert. Die Prostata des jeweiligen Versuchstieres wurde wie bereits beschrieben aufgearbeitet und aus dem Homogenat das Zytosol gewonnen. Auch hier erfolgte eine Fraktionierung mittels SEC und die einzelnen, gesammelten Fraktionen wurden mit einem NaI-(TI)-Bohrlochdetektor auf deren Aktivität hin überprüft. Folgende radioaktive Isotope wurden jeweils in getrennten Versuchen verwendet :  $^{75}\text{Se}$ ;  $^{64}\text{Cu}$  und  $^{54}\text{Mn}$ .

Da  $^{75}\text{Se}$  nach Verstoffwechslung im Organismus vorwiegend kovalent in den Proteinen gebunden vorliegt, und in dieser Form auch durch Denaturierung nicht mehr abgetrennt wird, kann es autoradiographisch nach einer SDS-PAGE mit einer analytisch höheren Auflösung nachgewiesen werden (dieses wird in Kapitel 5.3 genauer beschrieben). Beim Kupfer und Mangan ist dies nur bedingt möglich, da sie nicht kovalent gebunden sind, sondern als Metallion-Protein-Komplex vorliegen und so leicht bei der SDS-PAGE abgetrennt werden können.

Da das  $^{64}\text{Cu}$  nur eine Halbwertszeit von 12 h besitzt, wurde bei diesem Versuch die Inkubationszeit von 5 Tagen auf 12 Stunden reduziert, um genügend Aktivität in den Proben nach der Aufarbeitung zur Verfügung zu haben bzw. die Tiere nicht einer unnötig hohen Strahlenbelastung auszusetzen. Es wurden für den Tracerversuch mit dem  $^{64}\text{Cu}$  sechs Tiere verwendet, um statistisch korrekt zu sein.

Für die Probentrennung wurden folgende Parameter gewählt:

**System:** Beckmann Gold

**Probenmenge:** 10  $\mu\text{l}$  (ungekühlter Autosampler)

**mobile Phase:** 50 mmol/l Tris/HNO<sub>3</sub> (pH: 7,4)

**Flussrate:** 100  $\mu\text{l}/\text{min}$ , Druck:  $p = 16 \text{ bar}$

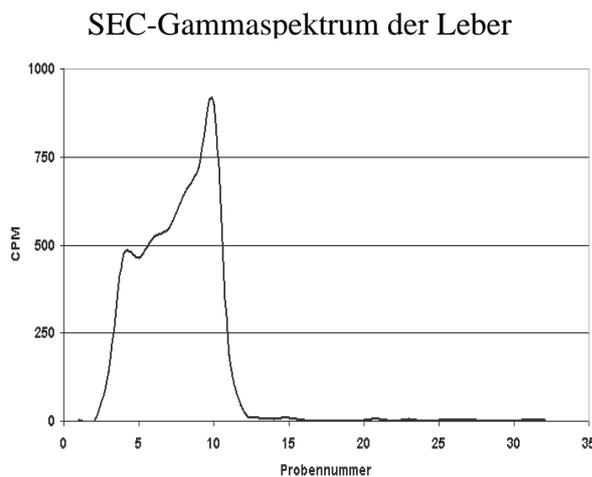
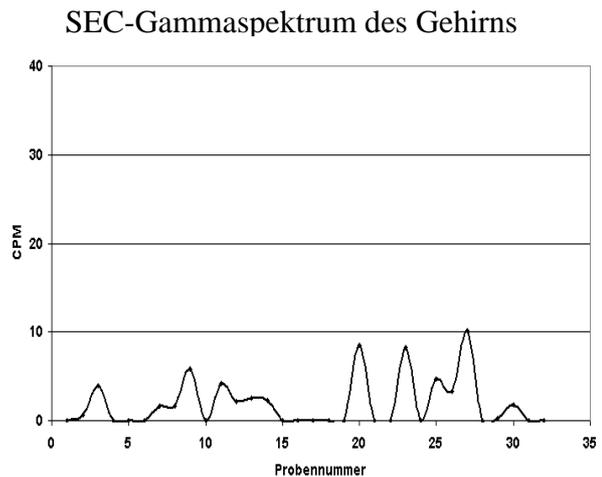
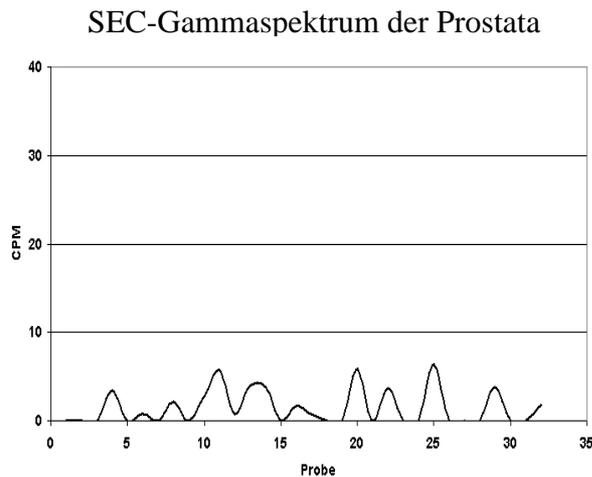
**Säulenmaterial:** Amersham Pharmacia Superdex 75PC 3.2/30

**Vorsäule:** Phenomenex security guard mit GFC-3000 (4L x 3.0 ID)

**Detektor:** UV 204, 258, 280 nm.

**NaI- Detektor ( Bohrlochdetektor):** crismatic AS17

Nach der chromatographischen Auftrennung wurden die einzelnen, aufgefangenen Fraktionen im Bohrlochdetektor gemessen. Es wurden zum Vergleich auch Messungen von Gehirnzytosolen und Leberzytosolen der  $^{64}\text{Cu}$ -markierten Tiere durchgeführt. Die aus diesen Messungen resultierenden Profile sind unten angeführt.



Graphiken 26, 27, 28: Dargestellt sind die chromatographischen Profile der Gewebezcytole der Prostata (26), des Gehirns (27) und der Leber (28) der  $^{64}\text{Cu}$ -markierten Ratten. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels eines Szintillationsdetektors vermessen und die Zählraten des Energiebereichs um 511 keV aufgetragen

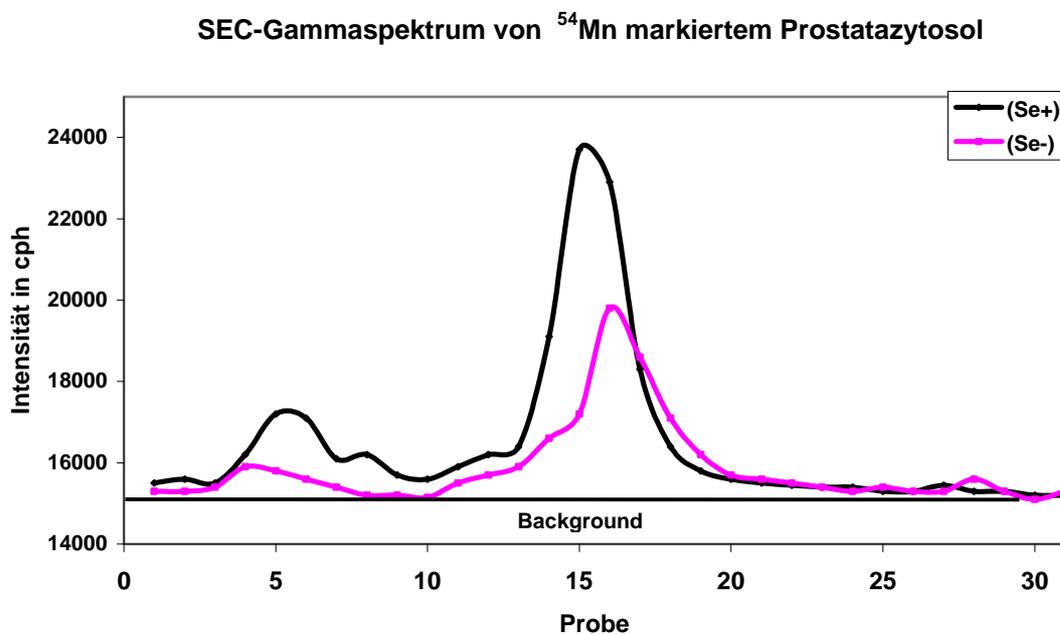
Da die Profile der sechs Tiere quasi identisch waren, wurden hier nur die Profile für jeweils ein Organ exemplarisch dargestellt.

Die Szintillationsprofile für die Prostatazytole und die Gehirnzytole ergaben nur unzureichende Informationen, da die Aktivitäten in den Fraktionen sehr knapp über der Hintergrundstrahlung lagen. Und selbst diese geringfügigen Abweichungen von der Hintergrundstrahlung scheinen Störungen zu sein, da in dem Labor zeitgleich andere radioaktive Proben verarbeitet wurden. Bei der Leber jedoch ist deutlich zu erkennen, dass das  $^{64}\text{Cu}$  an Proteine gebunden vorliegt. Daraus lässt sich schliessen, dass 12 h nicht ausreichend sind, bis das  $^{64}\text{Cu}$  in Proteinen gebunden oder in freier Form in der Prostata ankommt. Der Körper der

Ratte scheint das  $^{64}\text{Cu}$  zuerst in der Leber zu metabolisieren bevor es in anderen Organen nachgewiesen werden kann. Beim Gehirn kann die Blut-Hirnschranke eine Rolle als Blockade für Anreicherung des  $^{64}\text{Cu}$  im Gehirn spielen.

In ähnlicher Weise wurde mit dem Mangan verfahren. Jedoch wurden diesmal die Tiere mit  $^{54}\text{MnCl}_2$  für fünf Tage inkubiert. Da dieses Manganisotop eine Halbwertszeit von über 300 Tagen hat, war es möglich, dem Körper der Ratte genügend Zeit für die Manganmetabolisierung zu geben. Daraufhin wurden die Gewebe genauso verarbeitet wie bei dem Versuch mit dem  $^{64}\text{Cu}$ , um die Zytosole zu gewinnen. Nach der gleichen Vorgehensweise wurden sie mit der SEC fraktioniert und dann im Bohrlochdetektor gemessen.

Die folgenden chromatographischen Profile wurden erhalten.



Graphik 29: Diese Szintillationsprofile zeigen die fraktionierten Prostatazytosole und deren Aktivitäten in Impulsen pro Stunde. Das helle Profil entspricht dem Se(-)-Zytosol und das dunkle das Se(+)-Zytosol.

In diesen beiden Profilen erkennt man, dass auch hier zwei Maximalwerte zu beobachten sind, wie sie bereits bei den nicht radioaktiv markierten Versuchen mit der SEC-ICP-MS zu sehen waren.

Das Szintillationsprofil der Se(-)-Zytosole zeigt einen geringeren Mangangehalt als das Szintillationsprofil der Se(+)-Zytosole, was an einer höheren Verdünnung des Zytosols liegt. Man erkennt deutlich, dass der höhermolekulare Peak wesentlich weniger  $^{54}\text{Mn}$  enthält als der niedermolekulare. Dies kann zwei Gründe haben, entweder ist bei der höhermolekularen Fraktion der Mangedurchsatz recht hoch, dass bereits ein Teil des radioaktiven Isotops durch das nicht radioaktive Mangan ersetzt wurde, welches in der normalen Nahrung der Ratten in

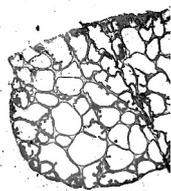
geringen Mengen vorkommt, oder dass in den fünf Tagen der Inkubation nur ein Teil des Mangans im Protein durch das radioaktive Isotop ausgetauscht wurde. Eine genauere Erklärung kann hier nicht gegeben werden.

Eine genauere Bestimmung, um welche  $^{54}\text{Mn}$ -bindenden Proteine es sich in den am stärksten radioaktiv markierten Fraktionen handelt, konnte nicht mit Hilfe der SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie gemacht werden, da das  $^{54}\text{Mn}$  bei der SDS-PAGE von den Proteinen abgetrennt wurde.

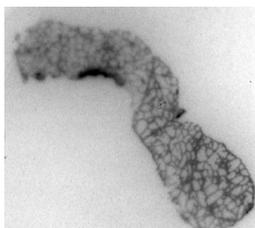
### 5.2.3. Autoradiographie von Dünnschnitten von unterschiedlich markierten Organen

Für eine Anreicherung der radioaktiven Isotope in bestimmten Teilen der Prostata können histologische Schnitte der Gewebe autoradiographisch untersucht werden.

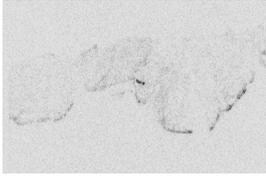
Für diese Untersuchungen wurden Teile der Prostata und der Leber als Vergleichsorgan, in der viele Stoffe metabolisiert werden, direkt nach der Entnahme aus dem Tier auf Aluminiumfolie gelegt und über flüssigem Stickstoff bei ca.  $-196^{\circ}\text{C}$  schockgefroren, um eine Denaturierung des Gewebes während eines langsamen Gefrierprozesses zu umgehen. Die Organe wurden dann an einem Mikrotom mit Kryozelle in  $10\ \mu\text{m}$  dünne Schnitte geschnitten und auf Objektträger gezogen. Die Proben wurden dann an der Luft für 48 h (ausser bei den  $^{64}\text{Cu}$ -Proben) getrocknet, um die Dünnschnitte der Organe auf dem Objektträger zu fixieren. Daraufhin wurden die Proben auf den Objektträgern im  $\mu$ -imager (Biospace, Frankreich) gemessen, um die Autoradiogramme der verschiedenen Organe mit den unterschiedlichen Isotopen aufzunehmen. Die folgenden Graphiken zeigen die Autoradiogramme der  $^{75}\text{Se}$ - und  $^{54}\text{Mn}$ -markierten Prostatas und  $^{64}\text{Cu}$ -markierter Vergleichsorgane im Vergleich zueinander und im Vergleich zu einem Hämalaun/Eosin-gefärbten Dünnschnitt der Prostata.



Graphik 30: Hier ist ein Teil eines Lobuses des H/E-gefärbten Prostatadünnschnittes zu sehen. Deutlich kann hier die schwammartige Struktur der Prostata erkannt werden. Eine etwas stärkere Färbung tritt an den Rändern auf



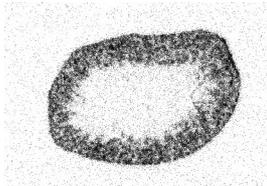
Graphik 31: Dieses Autoradiogramm einer  $^{75}\text{Se}$ -markierten Prostata zeigt, dass das Se ubiquitär verteilt ist und der H/E-gefärbten Prostata ähnelt..



Graphik 32: Dieses Autoradiogramm einer  $^{54}\text{Mn}$ -markierten Prostata zeigt, wie vor allem die Peripherie eine Anreicherung von Mn zeigt, wohingegen kaum Mn im Inneren der Loben zu sehen ist. Eine leichte Anreicherung ist außerdem im Mittelstück erkennbar.



Graphik 33: Dieses Autoradiogramm einer  $^{64}\text{Cu}$ -markierten Prostata zeigt, dass kein Radiotracer in den 12 Stunden Inkubationszeit in der Prostata angekommen ist.



Graphik 34: Dieses Autoradiogramm einer  $^{64}\text{Cu}$ -markierten Niere zeigt, dass der Radiotracer vor allem im Kortex (äußerer Bereich der Niere) der Niere zu finden ist, wohingegen kein  $^{64}\text{Cu}$  in der Metula (innerer Bereich der Niere) gefunden wurde.



Graphik 35: Dieses Autoradiogramm einer  $^{64}\text{Cu}$ -markierten Leber zeigt, dass der Radiotracer fast in der ganzen Leber gleich verteilt ist. Die Gewebeteile, die nicht markiert wurden, könnten Bindegewebe darstellen.

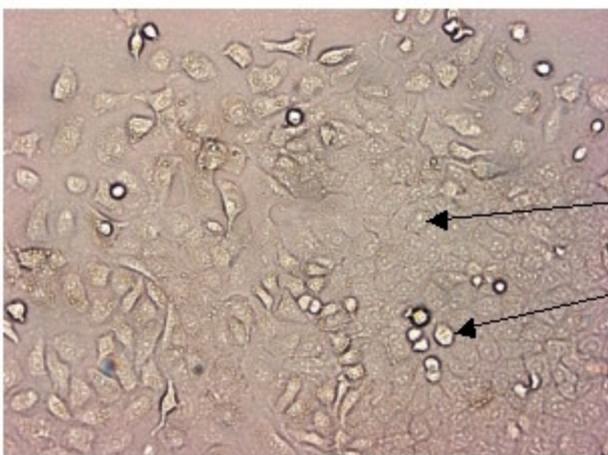
Die mikroskopische Aufnahme der H/E-gefärbten unmarkierten Prostata zeigt, dass die Prostata eine schwammartige Struktur aufweist, was für Drüsengewebe typisch ist. In Graphik 31, welches das Autoradiogramm der  $^{75}\text{Se}$ -markierten Prostata darstellt, ist klar das gleiche poröse Muster wie bei der H/E-gefärbten Prostata zu sehen. Der Tracer ist gleichförmig in allen Zellen der Prostata verteilt. Im Vergleich dazu ist der Tracer der  $^{54}\text{Mn}$ -markierten Rattenprostata vor allem in den Epithelzellen und in dem Mittelstück der Rattenprostata angereichert, wo mehr Bindegewebszellen vorhanden sind. Das Autoradiogramm der  $^{64}\text{Cu}$ -markierten Prostata zeigt keine Anwesenheit des Tracers, obwohl diese Probe zwei Halbwertszeiten lang gemessen wurde. Daraus folgt, dass innerhalb von 12 Stunden kein Kupfer in der Rattenprostata inkorporiert wird. Im Gegensatz zum Autoradiogramm der  $^{64}\text{Cu}$ -markierten Prostata zeigen die Autoradiogramme der  $^{64}\text{Cu}$ -markierten Leber und Niere eine deutlich Anwesenheit des Tracers. Bei der Leber ist der Tracer ausser in kleinen Stellen im Inneren ubiquitär verteilt. Auch konnte die höchste Aktivität in der Leber gemessen werden. Bei der Niere hingegen ist der Tracer nur in den äußeren Schichten, dem Kortex, zu finden, wohingegen in dem inneren Bereich, der Metula, kein Tracer gefunden wurde.

Die verschiedenen Tracer wurden von der Prostata auch unterschiedlich stark inkorporiert. Selen wurde ubiquitär in hohem Maß, Mangan nur in geringen Mengen in der Epithelschicht und Kupfer gar nicht aufgenommen.

#### 5.2.4. Einfluss von Metallen auf das Wachstum von humanen Prostatakarzinomzellen (Du145)

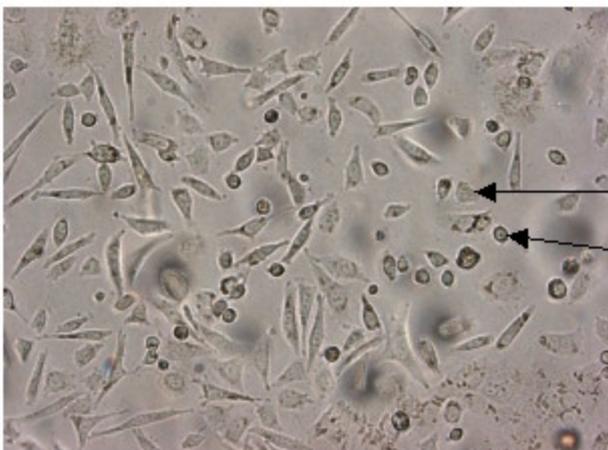
Die Zelllinie Du145 wurde, wie im Methodenteil beschrieben, in Zellkulturflaschen (150 ml Fassungsvermögen) kultiviert. Einen Tag nach der letzten Umsetzung der Zellen wurden dem Nährmedium, in dem die Zellen herangezogen wurden, eine Metallsalzlösung zugegeben. Den Zellen wurde entweder Cadmium, Nickel, Kobalt, Kupfer, Mangan oder Zink einzeln zugegeben. Die Endkonzentration der Metalllösungen betrug  $c = 0,5 \text{ mg/l}$ . Diese Konzentration wurde gewählt, damit sichergestellt ist, dass nicht der Großteil der Metallsalze durch das Medium gebunden wird. Nach einer Zellinkubationszeit von drei Tagen wurde das Wachstum der Zellen mit den verschiedenen zugesetzten Metallsalzlösungen unter dem Mikroskop (Axiovert 25, Zeiss) betrachtet.

Hierbei zeigten sich phänomenologische Veränderungen bei den Zellen, die unten dargestellt sind.



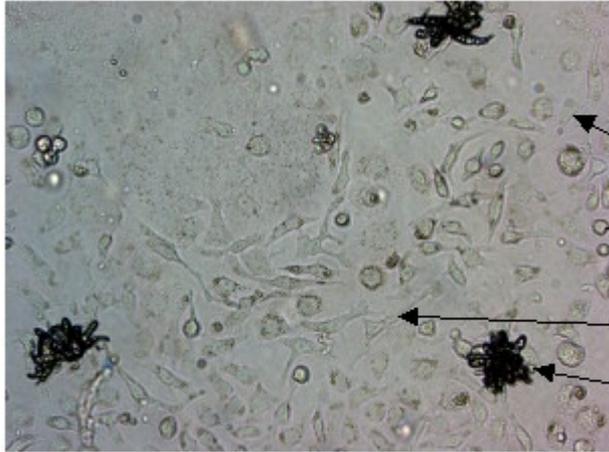
Graphik 36: Dieses Bild zeigt die Zelllinie Du145, die keinen Zusatz von metallhaltigen Lösungen bekam.

- normale Zelle / flächig
- tote Zelle / sphärisch



Graphik 37: Dieses Bild zeigt die Zelllinie Du145, die mit Ni im Medium herangezogen wurde.

- normale Zelle
- tote Zelle
- elongierte Zelle



Graphik 38: Dieses Foto zeigt die Zelllinie Du145, die Mn im Nährmedium enthält.

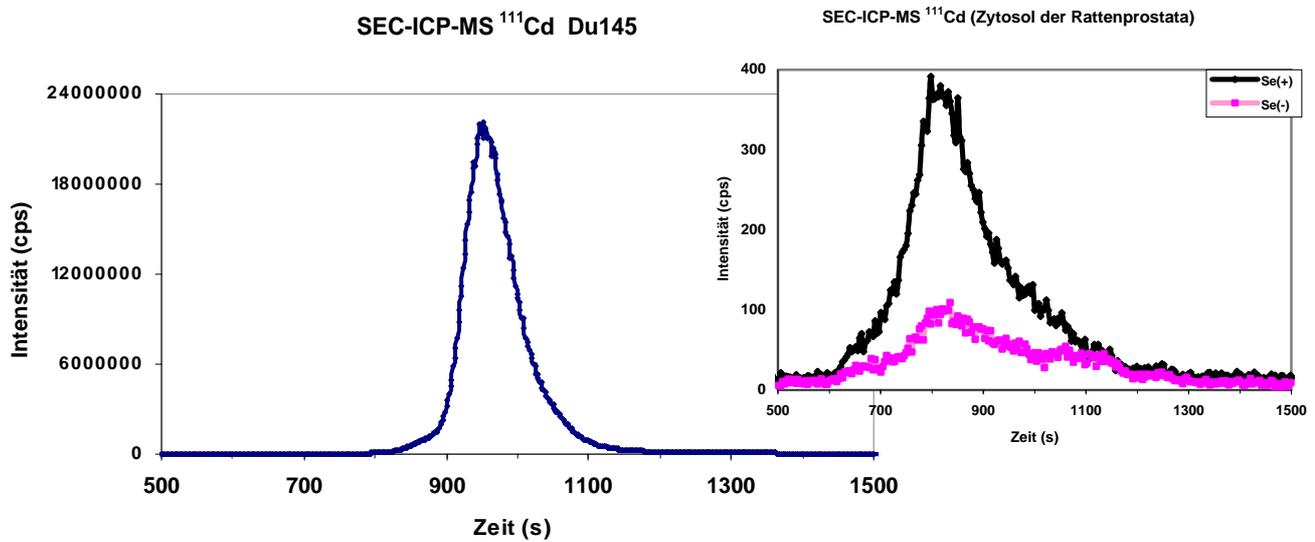
- normale Zelle
- tote Zelle
- elongierte Zelle
- Zellcluster

Die drei Bilder zeigen untereinander deutliche Unterschiede. Während bei dem Bild der Zellen ohne Zugabe von Metalllösungen ein dichter Rasen von flächigen Zellen mit nur sehr wenigen toten bzw. nicht entwickelten Zellen zu sehen ist, zeigt sich bei der Zugabe von Nickel ein anderes Bild, wo die Zellen nadelförmig elongiert, vereinzelt und mit sehr vielen toten Zellen vorliegen. Dieses Bild mit der Nickellösung ist repräsentativ auch für die mit Cadmium, Kobalt und Kupfer inkubierten Zellen. Die mit Zink versetzten Zellen zeigten hingegen keine äußeren Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollzellen, denen keine zusätzlichen Metalllösungen zum Nährmedium zugesetzt wurden. Eine auffällige Sonderstellung nehmen die mit Mangan inkubierten Zellen ein, da neben den normalen, elongierten und toten Zellen auch Cluster zu beobachten sind. Diese Cluster bestehen wahrscheinlich auch aus abgestorbenen denaturierten Zellen, da Mangan die Apoptose in Zellen einleiten kann.

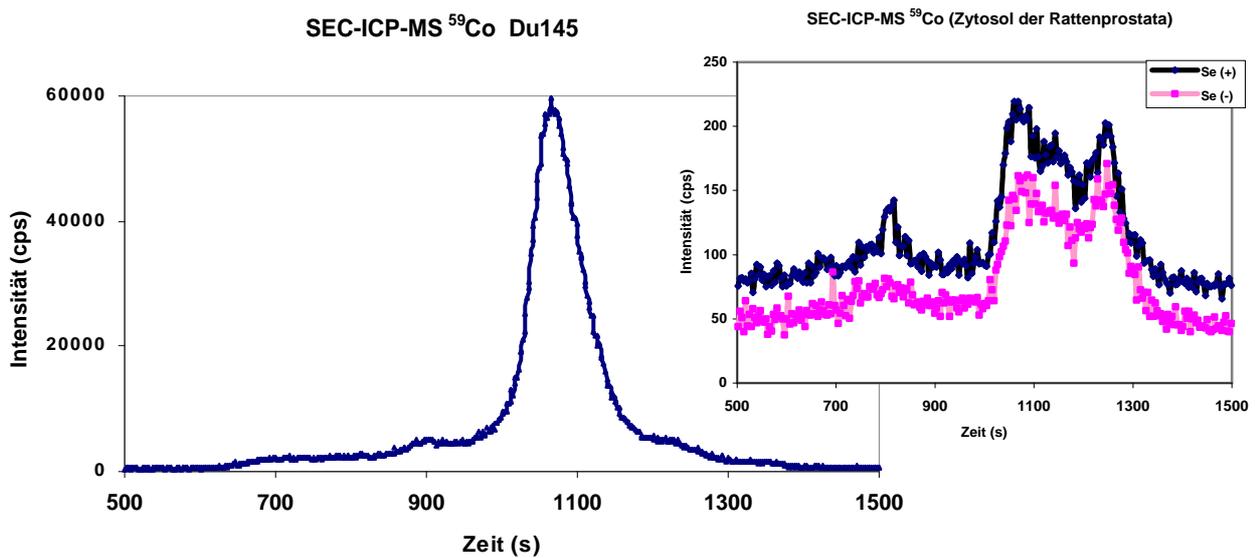
### 5.2.5. Detektion von Spurenelementproteinen in den Zytosolen der metallinkubierten Zellen der humanen Prostatakarzinomzelllinie Du145

Aus den inkubierten Zellen, die in Kapitel 5.2.4. herangezogen wurden, wurden Zytosole gewonnen, um diese mit der SEC-ICP-MS zu analysieren, wie dies in Kapitel 5.2.1. mit den Rattenzytosolen gemacht wurde. Die gesäuberten Zellen wurden in 50 mmol Tris-HNO<sub>3</sub> aufgenommen und im Ultraschallbecher homogenisiert, um im nachfolgenden Zentrifugiervorgang die Zellorganellen abzusondern und das Zytosol zu gewinnen.

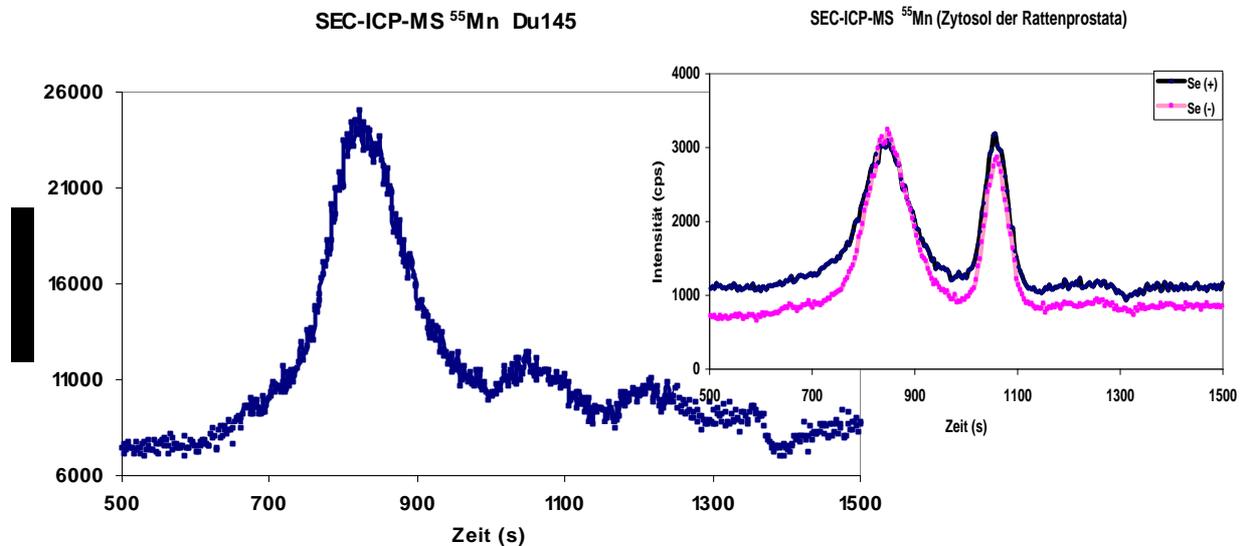
Diese Zytosole wurden dann unter identischen Bedingungen wie die Rattenzytosoale mit der SEC aufgetrennt und der ICP-MS analysiert. Die aus diesen Messungen erhaltenen Profile der gewonnenen Zytosole aus der Zelllinie Du145 wurden mit den Profilen der Rattenzytosoale verglichen und in den folgenden Graphiken dargestellt.



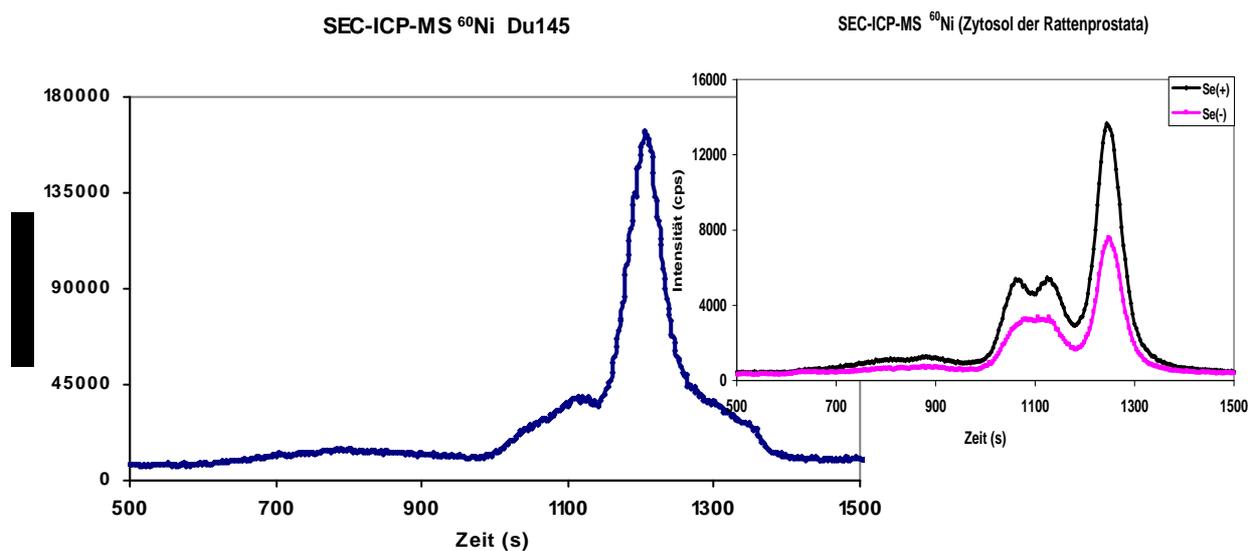
Graphik 39: Dieses Bild zeigt das chromatographische Cadmiumprofil des Zytosols der mit Cadmium inkubierten Zelllinie Du145. Rechts daneben sind zum Vergleich die Cadmiumprofile der Prostatazytosoale der Ratten abgebildet (Graphik 25; S. 51). Es gibt ein einziges Signal bei  $t = 950$  s.



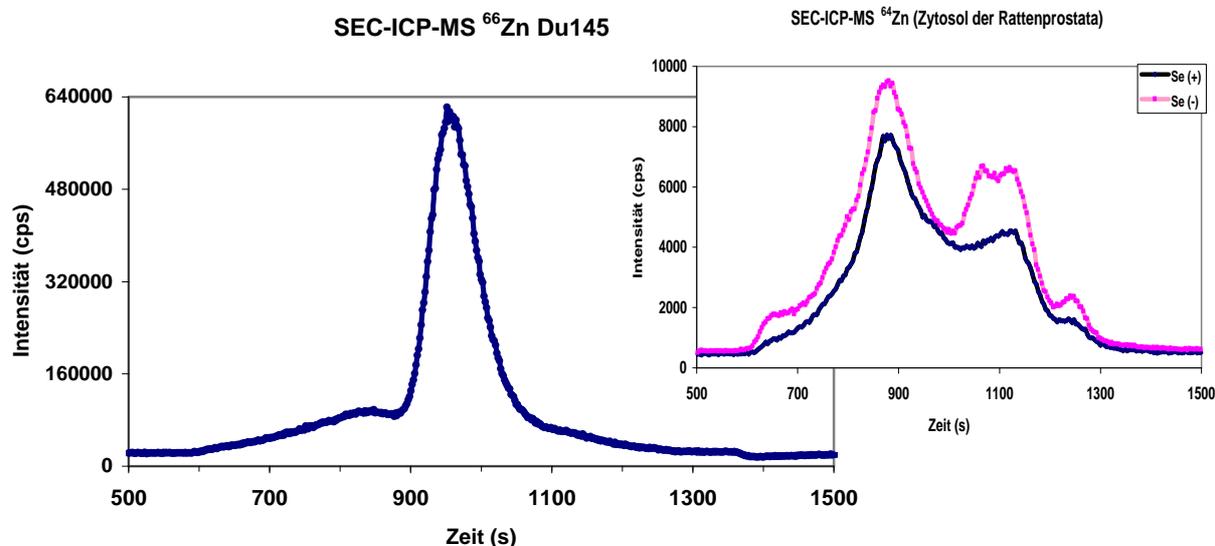
Graphik 40: Dieses Bild zeigt das chromatographische Kobaltprofil des Zytosols der mit Cadmium inkubierten Zelllinie Du145. Rechts daneben sind zum Vergleich die Kobaltprofile der Prostatazytosoale der Ratten abgebildet (Graphik 19; S. 48). Es können ein schwaches Signal bei  $t = 900$  s und ein starkes Signal bei  $t = 1080$  s beobachtet werden.



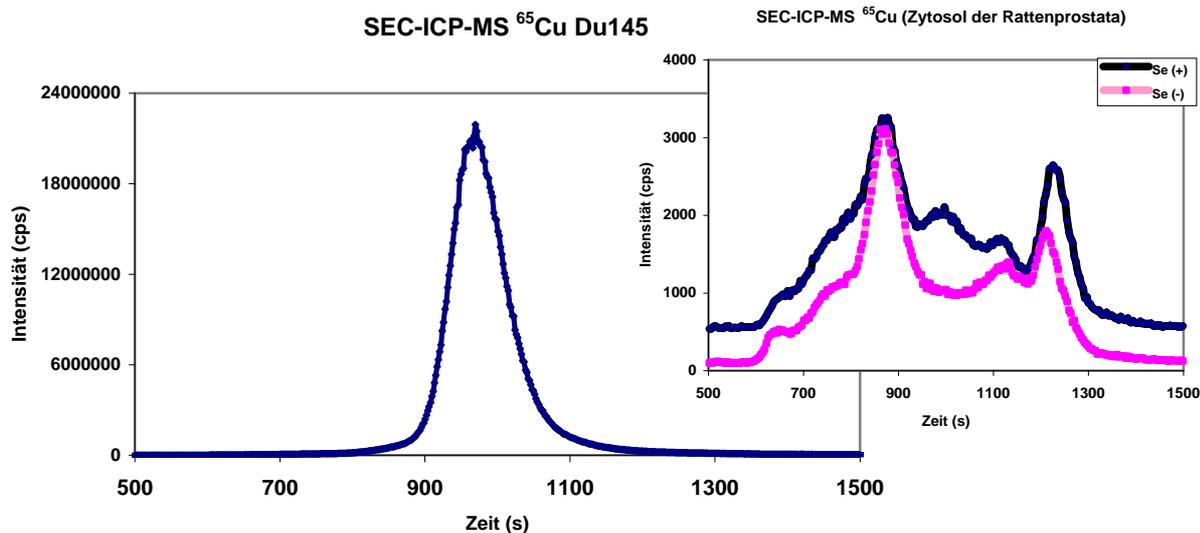
Graphik 41: Dieses Bild zeigt das chromatographische Manganprofil des Zytosols der mit Mangan inkubierten Zelllinie Du145. Rechts daneben sind zum Vergleich die Manganprofile der Prostatazytosele der Ratten abgebildet (Graphik 21; S. 49). Hier konnten die selben beiden Signale beobachtet werden, die auch schon in den Profilen der Rattenzytosele zu sehen waren. Diese liegen bei  $t = 820$  und  $1070$  s. Das niedermolekulare Signal ist vergleichsweise schwächer ausgeprägt als das höhermolekulare.



Graphik 42: Dieses Bild zeigt das chromatographische Nickelprofil des Zytosols der mit Nickel inkubierten Zelllinie Du145. Rechts daneben sind zum Vergleich die Nickelprofile der Prostatazytosele der Ratten abgebildet (Graphik 22; S. 50). Zwei schwache Signale sind bei  $t = 1060$  und  $1120$  s sowie ein starkes Signal bei  $t = 1240$  s zu beobachten.



Graphik 43: Dieses Bild zeigt das chromatographische Zinkprofil des Zytosols der mit Zink inkubierten Zelllinie Du145. Rechts daneben sind zum Vergleich die Zinkprofile der Prostatazytosole der Ratten abgebildet (Graphik 17; S. 47). Es können ein schwaches Signal bei  $t = 840$  s und ein starkes Signal bei  $t = 960$  s beobachtet werden.



Graphik 44: Dieses Bild zeigt das chromatographische Kupferprofil des Zytosols der mit Kupfer inkubierten Zelllinie Du145. Rechts daneben sind zum Vergleich die Kupferprofile der Prostatazytosole der Ratten abgebildet (Graphik 18; S. 48). Es kann hier nur ein starkes Signal bei  $t = 980$  s beobachtet werden.

Im Vergleich zu den Rattenzytosolen zeigen alle Zytosole der Zelllinie Du145 sehr deutliche Profile, jedoch mit geringerer Anzahl an Peaks. Die Unterschiede der Zytosole der humanen Karzinomzelllinie zu den Tierzytosolen sind wesentlich grösser als die zwischen den Tierzytosolen mit unterschiedlichem Selenstatus. Während ein Vergleich der Profile der Rattenzytosole größtenteils Proteinfractionen mit ähnlicher Molekularmasse aufwies, zeigen die Profile der Zelllinienzytosole Peaks von Proteinfractionen mit deutlich unterschiedlichen Molekularmassen.

Die einzelnen Elementprofile der Messungen der inkubierten Du145-Zytosole für Mangan, Kobalt und Nickel ähnelten stark denen der Tierzytosole. Es traten Peaks mit sehr ähnlichen Molekularmassen auf, die sich jedoch in ihren Intensitäten teilweise stark unterschieden.

Die drei Nickelprofile (Graphik 42; S.53) unterscheiden sich vor allem in der Intensität der nickelbindenden Proteinfractionen, zeigen aber ein sehr ähnliches Peakmuster. Die nickelbindenden Proteinfractionen scheinen unabhängig von Selenstatus oder Spezies gleich in den Prostatazellen vorhanden zu sein.

Für die Manganprofile (Graphik 41; S. 53) gilt, dass in allen Zytosolen Banden gefunden wurden, deren zugehörige Fractionen eine ungefähre Masse von 32 kDa und 12 kDa haben, jedoch ist die niedermolekulare Proteinfraction bei den Du145 wesentlich weniger stark ausgeprägt als bei den Tierprostatas.

Die Kobaltprofile (Graphik 40; S. 52) unterscheiden sich dadurch, dass bei dem Du145-Zytosol ein kleines Signal bei ca. 40 kDa fehlt oder durch den erhöhten Kobaltuntergrund überdeckt wird, dafür eine Schulter bei ca. 25 kDa vorliegt. Aber das Augenfälligste ist, dass die Proteinfraction bei ca. 12 kDa bei den Du145 in wesentlich stärkerem Maß vorkommt als bei den Tierzytosolen. Ob es sich hierbei um die gleichen Proteine handelt, wie bei den Manganuntersuchungen, wo sie bei den Du145 verringert vorkommen, konnte weder bestätigt noch widerlegt werden, da genauere Messungen nicht mehr durchgeführt werden konnten.

Die Profile der Zytosole der mit Zink, Cadmium und Kupfer inkubierten Zelllinie Du145 variierten erheblich von den Profilen der Tierzytosole. Keine der in den Tierzytosolen gefundenen Proteinfraction, die spurenelementbindend war, konnte in diesen Du145-Zytosolen wiedergefunden werden.

Bei den Tierzytosolen konnten bei der Cd-Messung drei Banden/Peaks bei ca. 85 kDa, 39 kDa und 6, kDa festgestellt werden, die alle bei den Du145 nicht zu finden waren. Dafür konnte eine Proteinfraction von ca. 20 kDa beobachtet werden, deren Intensität den höchsten gemessenen Wert erreichte. Hoher Wahrscheinlichkeit nach sind die bei den Tierzytosolen gefundenen

Fraktionen auch in den Du145-Zytosolen vorhanden, sind aber durch die hohe Intensität des neu gefundenen Peaks überdeckt worden.

Auch die Zinkmessungen der Zink inkubierten Du145-Zytosole ergaben ein vollkommen von den Tierzytosolen abweichendes Bild. Keine der 4 bis 5 Banden der Profile der Tierzytosole konnte im Profil der Du145-Zytosole nachgewiesen werden, wohingegen eine kleine Schulter bei 34 kDa und ein scharfer Peak bei 19 kDa erkennbar waren.

Das Kupferprofil des Du145-Zytosols unterscheidet sich deutlich von den komplexen Kupferprofilen der Rattenzytosole. Statt der 4 bis 5 Banden/Peaks bei den Tierzytosolen konnte nur ein einziger Peak bei den Du145-Zytosolen beobachtet werden, dessen Masse bei 17 kDa lag. Auch dieser Peak hat eine immens hohe Intensität und könnte andere Peaks überlagern. Kupfer scheint sich genauso wie Cadmium in Prostatakarzinomzellen anzureichern und speziell in der zytosolischen Fraktion um 17 kDa eine erhöhte Konzentration aufzuweisen.

### **Zusammenfassung von Kapitel 5.2: Chromatographisch-analytische Untersuchungen**

Durch die online-Kopplung der Größenausschlusschromatographie (SEC) mit der induktiv gekoppelten Plasmamassenspektrometrie (ICP-MS) konnten die Spurenelemente nachgewiesen werden, die proteingebunden in den Zytosolen der Rattenprostatas mit unterschiedlichem Selenstatus und der humanen Prostatakarzinomzelllinie Du145 vorlagen. Des Weiteren konnte durch diese Methode ein Molekularmassenbereich von Proteinfractionen angegeben werden, die Spurenelemente binden.

In diesem Zusammenhang wurden die Zytosole der Rattenprostatas auf die Proteinfractionen untersucht, die Se, Zn, Cu, Co, As, Mn, Ni, Fe, Sn oder Cd binden. Die Zytosole der Zelllinie Du145 wurden hingegen nur auf die Elemente überprüft mit denen die Zelllinie Du145 einzeln vorher inkubiert wurden (Zn, Cu, Co, Mn, Ni, Cd und Zn).

Die Profile der vom Selenstatus abhängigen Prostatazytosole der Ratten zeigten bis auf ein Profil (Selenprofil d. Se(-)-Rattenprostatazytosols) mindestens ein Signal einer metall- oder metalloidbindenden Proteinfraction.

Die Zinkprofile beider Zytosole [Se(+) und Se(-)] der Rattenprostata zeigen nahezu vier gleiche Signale (MW = 85 kDa, 28 kDa, 8 kDa und < 6 kDa) und ein Signal bei 12 kDa, welches beim Se(-)-Zytosol stärker ausgeprägt ist. Das mit Zink inkubierte Zelllinienzytosol zeigte keines der Signale, sondern stattdessen Signale bei MW= 34 kDa und 17 kDa.

Die Kupferprofile der Rattenprostatazytosole zeigen ebenfalls vier nahezu gleiche Signale bei (MW = 85 kDa, 32 kDa, 9 kDa und < 6 kDa) und ein Signal einer Proteinfraction von 17 kDa, welches im Se(+)-Zytosol wesentlich stärker ist. Dieses Signal bei 17 kDa konnte auch im Profil

des Cu-inkubierten Zytosols der Du145 wiedergefunden werden. Allerdings ist dieses Signal so stark, dass es wahrscheinlich andere Signale überlagert.

Beide Kobaltprofile der Rattenprostatazytosole zeigen die gleichen drei Signale ( MW= 40 kDa, 12 kDa und <6 kDa) und unterscheiden sich nicht signifikant. Im Profil des Zytosols der Du145 ist nur noch das Signal der 12 kDa-Fraktion zu sehen, welches mögliche andere Signale überdeckt.

Die Manganprofile der Prostatazytosole als auch das Manganprofil der Zelllinie zeigen jeweils zwei Signale von Fraktionen im Bereich von 32 kDa und 12 kDa, wobei nur das etwas schwächere Signal der 12 kDa-Fraktion der Zelllinie etwas von den anderen beiden Profilen abweicht.

Die drei Nickelprofile zeigen jeweils drei Signale im Bereich von 11 kDa, 9 kDa und <6 kDa. Sie unterscheiden sich nur in der Gesamtintensität, wobei die Signale der Profile der Zelllinienzytosole stärker sind als die der Prostatazytosole.

Die Cadmiumprofile der beiden Prostatazytosole zeigen jeweils drei Signale von Fraktionen im Bereich von 85 kDa, 39 kDa und 6 kDa. Hierbei waren die Signale der Se(-)-Prostatazytosole durchweg schwächer als die der Se(+)-Prostatazytosole. Das Cd-Profil der Zelllinienzytosols weist kein Signal auf, welches in den Profilen der Rattenprostata zu sehen war, sondern ein Signal einer Fraktion im Bereich von 20 kDa, welches eine sehr hohe Intensität hat und andere Signale überdecken könnte.

Die Eisenprofile wurden nur von den Rattenprostatazytosolen angefertigt und zeigen Signale von Fraktionen im Bereich von 81 kDa, 41 kDa, 25 kDa und 12 kDa, wobei alle Signale beim Se(-)-Zytosol stärker ausgeprägt sind bis auf das Signal bei 25 kDa.

Beide Arsenprofile der Rattenprostatazytosole zeigen ein Signal bei 27 kDa, und das Profil des Se(-)-Zytosols zusätzliche ein Signal bei 8 kDa.

Die beiden Zinnprofile der Rattenprostatazytosole zeigen jeweils nur ein Signal bei 12 kDa.

Der Selenstatus der Ratten beeinflusste die Metall- bzw. Metalloidgehalte einiger Proteinfractionen im Zytosol der Rattenprostata. Die stärksten Unterschiede waren für Zink (12 kDa), Kupfer (17 kDa), Arsen (8 kDa), Cadmium(39 kDa) oder Eisen (81 kDa, 41 kDa) erkennbar. Dabei bewirkte ein Selenmangel eine Erhöhung der Signalintensitäten für Eisen, Zink und Arsen und eine Verringerung für Kupfer, Nickel und Cadmium. Keinen Einfluss hatte der Selenstatus der Zytosole für Kobalt, Mangan und Zinn.

Nur die Nickel- und Manganprofile zeigen Ähnlichkeiten in den untersuchten Zytosolen der Rattenprostata und der Zelllinie. Bei den anderen vier verglichenen Profilen zeigte sich ein immenser Unterschied. Die benutzte Säule zeigt eine gewisse Ungenauigkeit bei der

Molmassenabschätzung für nicht ideale Proteinlösungen wie Zytosole, da die darin enthaltenen Proteine auch mit der Säulenmatrix wechselwirken könnten. Die hohen Konzentrationsunterschiede der Metallgehalte in den Tierzytosolen und den Zelllinienzytosolen erhöht die Ungenauigkeit der Messungen zusätzlich. In dieser Arbeit konnte deswegen nicht geklärt werden, ob dieser Unterschied in der Zusammensetzung der metallbindenden Proteinfractionen von der Spezies abhängt oder von dem Gesundheitszustand der Zellen.

Die inkubierten Zellen der Du145 zeigten nicht nur Unterschiede bezüglich der Verteilung der spurenelementbindenden Proteinfractionen, sondern auch im Aussehen der Zelllinie.

Die mikroskopische Untersuchung der inkubierten Zelllinie Du145 zeigte auch, dass es einen phänomenologischen Unterschied gab zu den Kontrollzellen. Die mit Cd, Ni, Co, Cu und Mn inkubierten Zellen zeigten eine verminderte Wachstumsrate und eine Degeneration in der Zellform. Die mit Mangan inkubierten Zellen zeigten zudem eine Art Cluster von Zellen.

Durch Markierungsversuche der Ratten *in vivo* konnte durch die Autoradiographie der Dünnschnitte gezeigt werden, dass die Spurenelemente Mangan und Selen unterschiedlich in der Ratteprostata verteilt sind. Während das Selen ubiquitär in der Prostata verteilt war, reichte sich das Mangan in der Epithelschicht der Prostata an. Ein dritter Markierungsversuch mit Kupfer zeigte, dass das Kupfer nach 12 Stunden nicht in der Prostata ausreichend metabolisiert wird, wohingegen es in der Leber und der Niere (vor allem im Kortex) metabolisiert wird. Durch die Auftrennung der markierten Prostatazytosole mit der SEC und der Messung der einzelnen Fractionen im Bohrlochdetektor konnte gezeigt werden, dass das Kupfer in der Leber auch proteingebunden vorliegt.

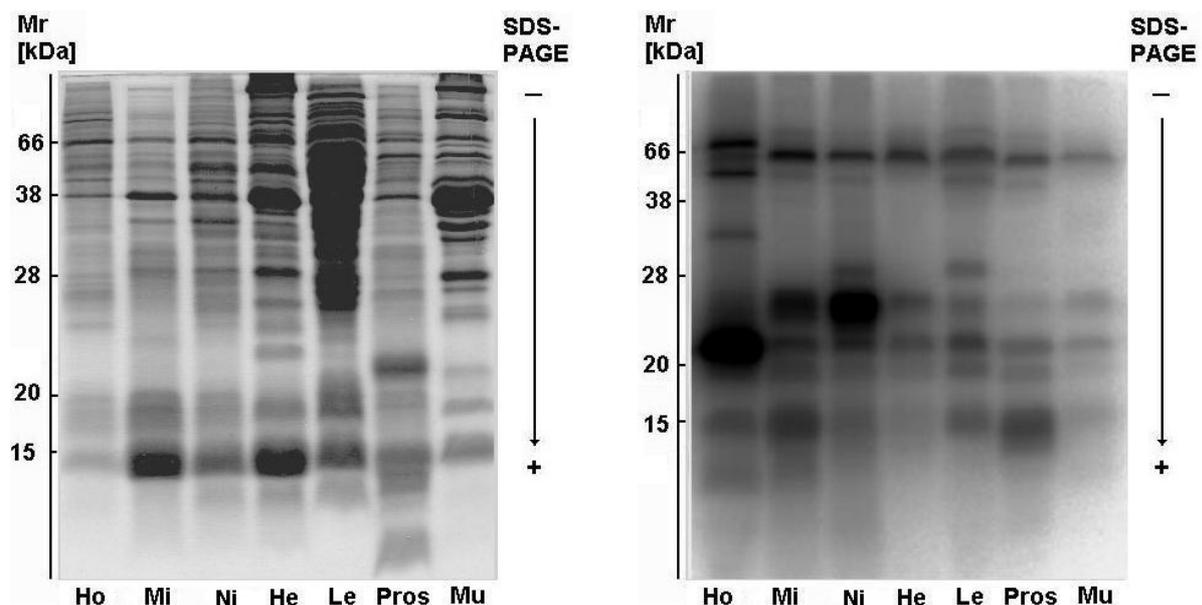
### 5.3. Biochemische Trennverfahren und Autoradiographie

#### 5.3.1. Auftrennung der <sup>75</sup>Se-Proteine in den Homogenaten und Zytosolen verschiedener Gewebe mittels SDS-PAGE und Detektion des Tracers durch Autoradiographie

Da Selen als eines der wenigen Spurenelemente kovalent in Form von Selenocystein oder Selenomethionin an Proteine gebunden ist, kann es auch nach der Auftrennung der selenhaltigen Proteine mittels SDS-PAGE autoradiographisch in Proteinbanden lokalisiert werden.

Für diesen Versuch wurden Ratten mit unterschiedlicher Selendiät herangezogen und mit <sup>75</sup>Se markiert. Nach der Tötung der Ratten durch Herzpunktion wurden die Organe entnommen und präpariert, um sie zu homogenisieren (Homogenatpuffer: 5 mM MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O, 20 mM Tris/HCl, pH 7,4 + Proteaseinhibitorcocktail). Ein Teil des Homogenates wurde zur weiteren Aufbereitung abgenommen und bei 100.000 g zentrifugiert, so dass Pellets aus Zellorganellen und Überstände aus löslichen Proteinen, dem Zytosol, entstanden.

Die Homogenate von Prostata, Hoden, Niere, Herz, Leber und Muskel und die Zytosole aus den Homogenaten dieser Organe wurden jeweils durch ein SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die getrockneten Gele wurden mit Hilfe von Imagerplatten für die Autoradiographie vorbereitet. Auf den folgenden Graphiken sind die 15 %-igen SDS-Gele der Homogenate und Zytosole von Se(-)- Tieren vergleichend nebeneinandergestellt.



Graphiken 45 & 46: Das linke SDS-Gel ( Graphik 45) zeigt die Proteinaufspaltung in den Homogenaten der verschiedenen Gewebe nach ihrer relativen Masse. Das rechte Autoradiogramm (Graphik 46) des SDS-Gels zeigt die mit <sup>75</sup>Se markierten Selenoproteine an.

(Ho = Hoden; Mi = Milz; Ni = Niere; He = Herz; Le = Leber; Pros = Prostata ; Mu =

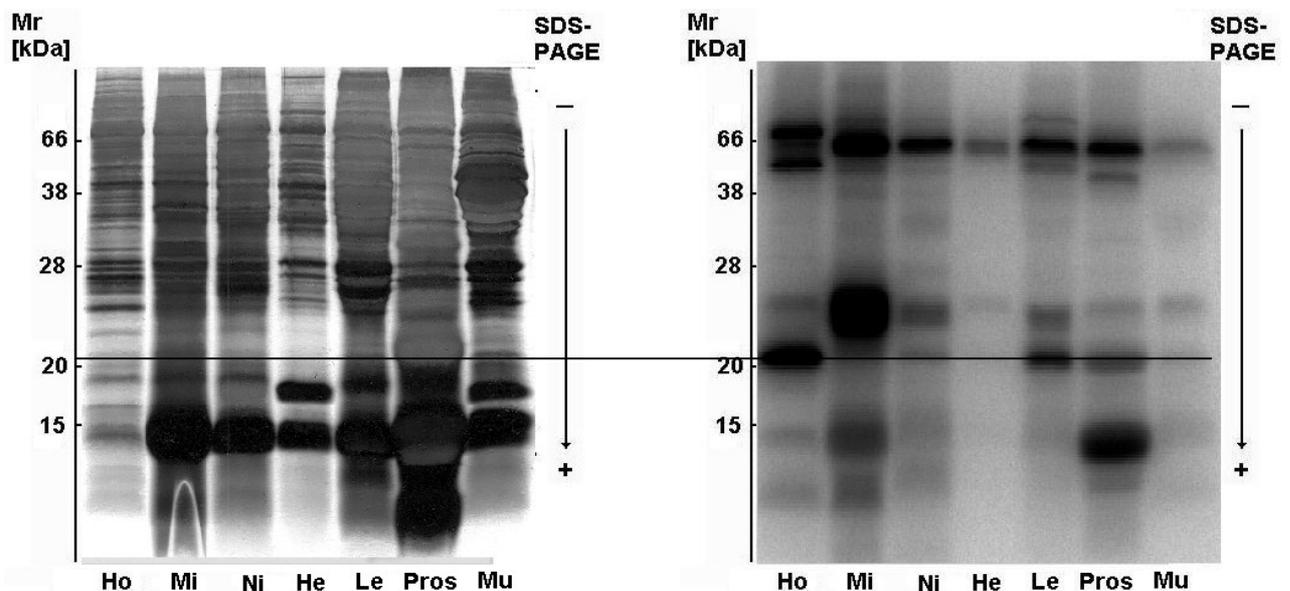
Das SDS-Gel zeigt die gesamten Proteine in einem Molekularmassenbereich von ca. 8 kDa bis ca. 200 kDa an. Jedes Gewebehomogenat zeigt hierbei eine andere Proteinzusammensetzung, bei der aber einige Proteinbanden in jedem Gewebe, wenn auch zum Teil in unterschiedlicher Stärke, vorhanden sind. Das Autoradiogramm zeigt, dass nur wenige Proteine, die im SDS-Gel zu sehen sind, Selenoproteine darstellen. Von den über 100 Banden des SDS-Gels je Homogenat sind nur 10 bis 15 Proteine als Selenoproteine zu erkennen. In der Prostata, dem Herz und den Muskeln ist die Aktivität der Selenoproteine vergleichsweise schwach. Jedoch ist in allen Homogenaten eine ungleichmäßige Verteilung der Selenoproteine zu erkennen, bei welcher im Bereich um 66 kDa drei bis vier Banden und im Bereich zwischen 15 kDa und 25 kDa mehrere Banden erkennbar sind.

Im Bereich knapp unter 66 kDa, bei ca. 58 kDa, ist bei allen Homogenaten eine stark ausgeprägte Bande zu erkennen, welche vermutlich das Selenoprotein P (SeP) darstellt. Bei relativ genau 66 kDa ist eine schwächere Bande bei allen Homogenaten zu beobachten, die wahrscheinlich vom Albumin stammt, welches unspezifisch Selen in Form von Selenomethionin einbaut.

Zwischen 15 kDa und 25 kDa befinden sich vier weitere Selenoproteine bei allen Homogenaten. Bei 15 kDa, 18 kDa, 20 kDa und 25 kDa sind diese vier Banden, die durch Anwendung entsprechender Antikörper gerichtet gegen diese Proteine identifiziert wurden, lokalisiert. Das saure 15-kDa-Selenoprotein, welches bereits in vielen Geweben gefunden wurde, taucht auch hier bei einer Molekularmasse von 15 kDa auf. Bei etwa 20 kDa scheint die Phospholipidhydroperoxy-glutathionperoxydase (PHGPx) eine scharfe Bande anzuzeigen, welche bei den Hoden besonders hervorsteht, da sie dort und in Spermatozoen stark exprimiert wird (75). Im Bereich zwischen 20 kDa und 25 kDa sind verschiedene Glutathionperoxydasen anzutreffen, deren Masse abhängig ist von ihrem Vorkommen im Plasma (Pl-GPx) oder Zytosol (cGPx). Da die Pl-GPx von vielen Organen exprimiert wird, tritt sie entsprechend nicht nur im Plasma, sondern in sehr vielen Organen auf. Dies ist besonders der Fall in der Niere und der Milz, wo die Pl-GPx-Bande am stärksten ausgeprägt ist (76).

Etwas über 30 kDa tritt nur bei den Hoden eine deutlich sichtbare Bande auf, die als das Protein sn-GPx identifiziert wurde und nur in den Spermienkernen vorkommt und dessen Masse bei 34 kDa bestimmt wurde (77).

Das SDS-Gel der Zytosole zeigt nur die löslichen Proteine der Organe.



Graphiken 47 & 48: Links ist das Elektropherogramm mit den nach ihrer Masse aufgetrennten Proteinen und rechts das dazugehörige Autoradiogramm dargestellt. Die mit  $^{75}\text{Se}$  markierten Zytosole der verschiedenen Gewebe zeigen deutliche schwarze Banden im Autoradiogramm. (Ho = Hoden; Mi = Milz; Ni = Niere; He = Herz; Le = Leber; Pros = Prostata ; Mu = Muskel)

Bei der Betrachtung der Auftrennung der Proteine auf dem SDS-Gel fällt auf, dass die Proteine unterhalb von ca. 20 kDa (siehe Trennlinie) eine wesentlich höhere Konzentration aufweisen als bei den höhermolekularen Proteinen, was bei dem SDS-Gel der Homogenate noch anders ist und die Proteine  $> 28$  kDa relativ gesehen höherkonzentriert vorliegen, was durch die starke Färbung mit Silber angezeigt wird.

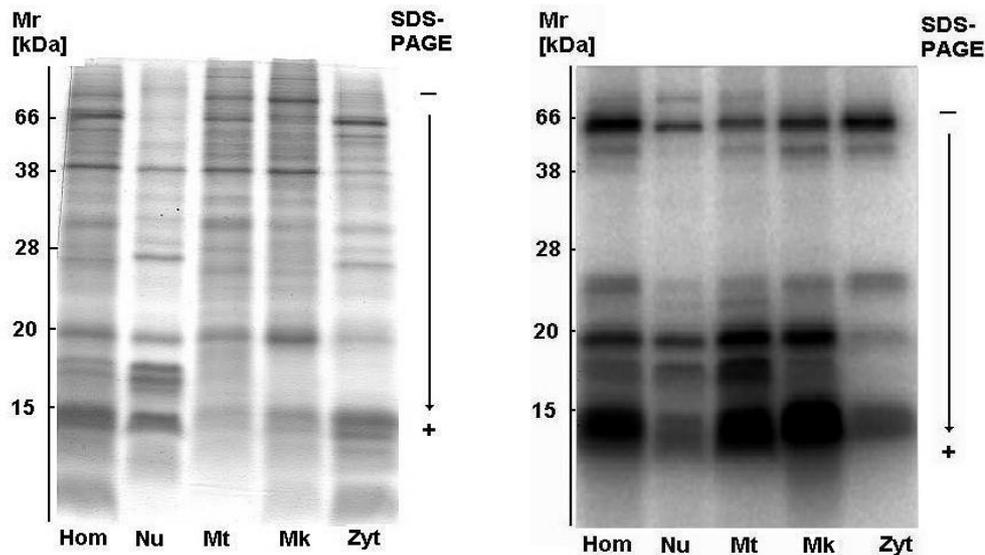
Bei den Autoradiogrammen fällt sofort auf, dass die sn-GPX in den Hoden und das Selenprotein bei ca. 18 kDa in allen Zytosolen gar nicht mehr vorhanden sind. Da die Kerne und andere Zellorganellen abgetrennt wurden, fehlen natürlich diejenigen Selenoproteine, die an diese Organellen gebunden vorlagen. Da im Bereich von 18-19 kDa das Selenprotein T vorkommt und es am Endoplasmatischen Retikulum (78, 51) gebunden vorliegt und dieses bei der subzellulären Fraktionierung entfernt wurde, war zu erwarten, dass das 18 kDa-Selenprotein nicht mehr zu finden ist.

### 5.3.2. Vergleich der Selenoproteinverteilung in den subzellulären Fraktionen der Prostata von Tieren mit unterschiedlicher Selendiät

Um die Verteilung der Selenoproteine in den subzellulären Fraktionen der Prostata der Ratte zu untersuchen, wurden je eine  $^{75}\text{Se}$ -markierte Prostata eines Se(+) und eines Se(-)-Tieres

homogenisiert und durch Zentrifugation bei unterschiedlichen Beschleunigungen in eine Kernfraktion (1000 x g), eine mitochondriale Fraktion (10.000 x g), eine mikrosomale Fraktion (100.000 x g) und ein zytosolische Fraktion voneinander separiert. Die Proteine der Fraktionen wurden dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch untersucht.

Das SDS-Gel und das Autoradiogramm des Se(+)-Tiers sind unten abgebildet.



Graphiken 49 & 50: Hier ist das <sup>75</sup>Se markierte SDS-Gel der subzellulären Fraktionen der Rattenprostata eines Se(+)-Tieres (x) neben dem dazugehörigen Autoradiogramm dargestellt. (Hom = Homogenat, Nu = Nukleare Fraktion/Kernfraktion, Mt = Mitochondriale Fraktion, Mk = Mikrosomale Fraktion, Zyt = Zytosolische Fraktion)

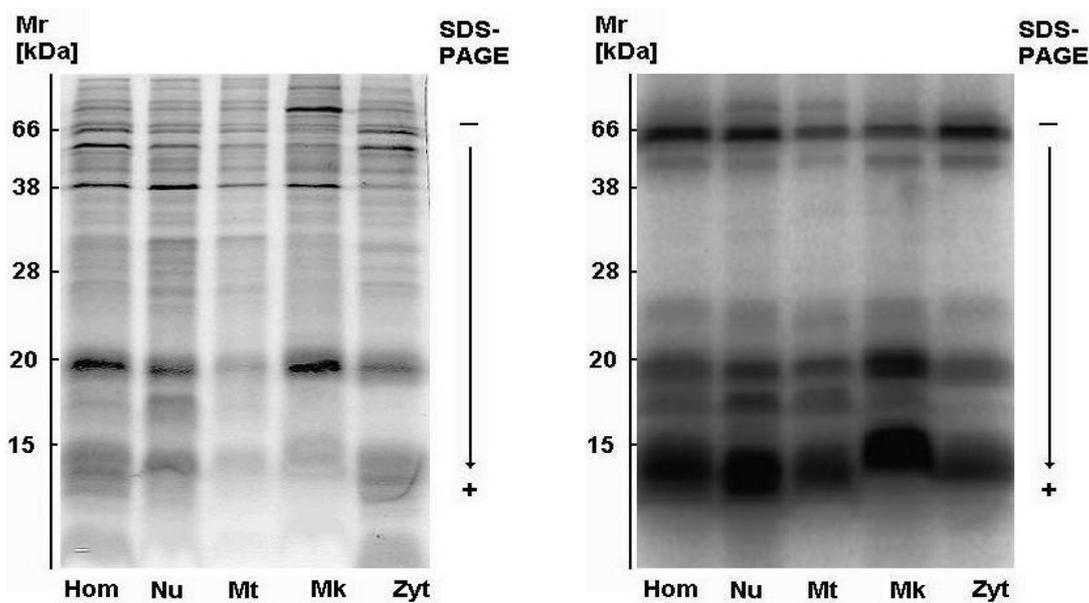
Im Autoradiogramm ist deutlich zu erkennen, dass im Homogenat die meisten Banden zu beobachten sind, was daher rührt, dass im Homogenat alle Proteine der Zelle vorhanden sind. Im Bereich  $\geq 38$  kDa sind vier Banden vorhanden, die durch Selenoproteine oder Selen-bindende Proteine entstanden sind und bei ca. 70 kDa, 58 kDa, 45 kDa und 38 kDa lokalisiert sind. Die Bande um ca. 70 kDa könnte das Albumin sein, welches das Selen unspezifisch bindet. Dieses Protein ist in dem Homogenat und auch in den subzellulären Fraktionen vorhanden, wo es am deutlichsten in dem Zytosol vorkommt. Des Weiteren ergibt sich bei ca. 58 kDa die markanteste Bande in diesem Bereich und stellt mit hoher Wahrscheinlichkeit das Selenoprotein P dar, welches ebenfalls ubiquitär in allen Fraktionen vorhanden ist. Die beiden Proteine bei 45 kDa und 38 kDa sind in allen Fraktionen vorhanden, aber in der mikrosomalen Fraktion und dem Zytosol besonders hervorgehoben, wovon die Proteinfraction von 45 kDa Isoformen des SeP darstellen (79).

Im Bereich unter 28 kDa, wo die anderen Selenoproteine lokalisiert sind, zeigen sich Banden im Homogenat bei ca. 25 kDa, 22 kDa, 20 kDa, 18 kDa und eine Doppelbande um die 15 kDa, bei

der keine Abgrenzung mehr zwischen den beiden Banden auszumachen ist. Jedoch ist eine Parallele zur Kernfraktion zu erkennen, bei der beide Banden auf Grund der geringeren Überlagerung durch die radioaktiven Proteine voneinander zu unterscheiden sind.

Die Banden bei 25 kDa, 20 kDa und bei um 15 kDa sind ubiquitär in allen subzellulären Fraktionen vorhanden, wenn auch zum Teil in unterschiedlich starker Ausprägung. Das Protein bei 22 kDa ist nur noch in der Kernfraktion und in der mitochondrialen Fraktion zu finden. Es ist möglich, dass dieses Protein am Endoplasmatischen Retikulum (ER) gebunden vorliegt, welches teils noch an der Kernfraktion und teils in der mitochondrialen Fraktion vorliegt. Das Protein mit der Molekularmasse von 18 kDa ist in allen Fraktionen, ausser in dem Zytosol, zu finden. Besonders stark ist die Ausprägung in der mitochondrialen Fraktion, was mit bereits erschienenen publizierten Daten übereinstimmt (47). Möglicherweise ist dieses Protein an eine bestimmte Zellorganelle in der Mitochondrialen Fraktion gebunden und nur deswegen in der Kernfraktion und der mikrosomalen Fraktion zu finden, weil bei der Zentrifugation zu geringen Teilen die Mikroorganellen der vorhergehenden und nachfolgenden Fraktion sedimentiert werden. In der zytosolischen Fraktion ist dieses Protein nicht vorhanden. Die beiden Proteine um 15 kDa sind vor allem in der mikrosomalen und mitochondrialen Fraktion zu finden, wo beide Proteinbanden sich überlagern. Nur in der Kernfraktion ist eindeutig zu erkennen, dass es sich hierbei um zwei Banden handelt. Auch im Zytosol überlagern sich beide Banden, sind aber nicht so stark ausgeprägt wie bei der mitochondrialen und mikrosomalen Fraktion. Da bekannt ist, dass es im Bereich von 15 kDa drei Selenoproteine (saures 15 kDa Selenoprotein (80), neutrales 15 kDa Selenoprotein (48) und prostataspezifisches Selenoprotein (49)) gibt, ist es möglich, dass in der mitochondrialen und mikrosomalen Fraktion eines dieser Proteine angereichert ist und in den anderen Fraktionen nicht vorkommt. Weiteren Aufschluss darüber geben die im folgenden Kapitel durchgeführten zweidimensionalen Gelelektrophoresen.

Das gleiche Experiment wurde auch mit dem SDS-Gel eines Se(-)-Tieres durchgeführt. Das Gel und das Autoradiogramm sind folgend abgebildet.



Graphiken 51 & 52: Hier ist das  $^{75}\text{Se}$  markierte SDS-Gel der subzellulären Fraktionen der Rattenprostata eines Se(-)-Tieres (x) neben dem dazugehörigen Autoradiogramm dargestellt. (Hom = Homogenat, Nu = Nukleare Fraktion/Kernfraktion, Mt = Mitochondriale Fraktion, Mk = Mikrosomale Fraktion, Zyt = Zytosolische Fraktion)

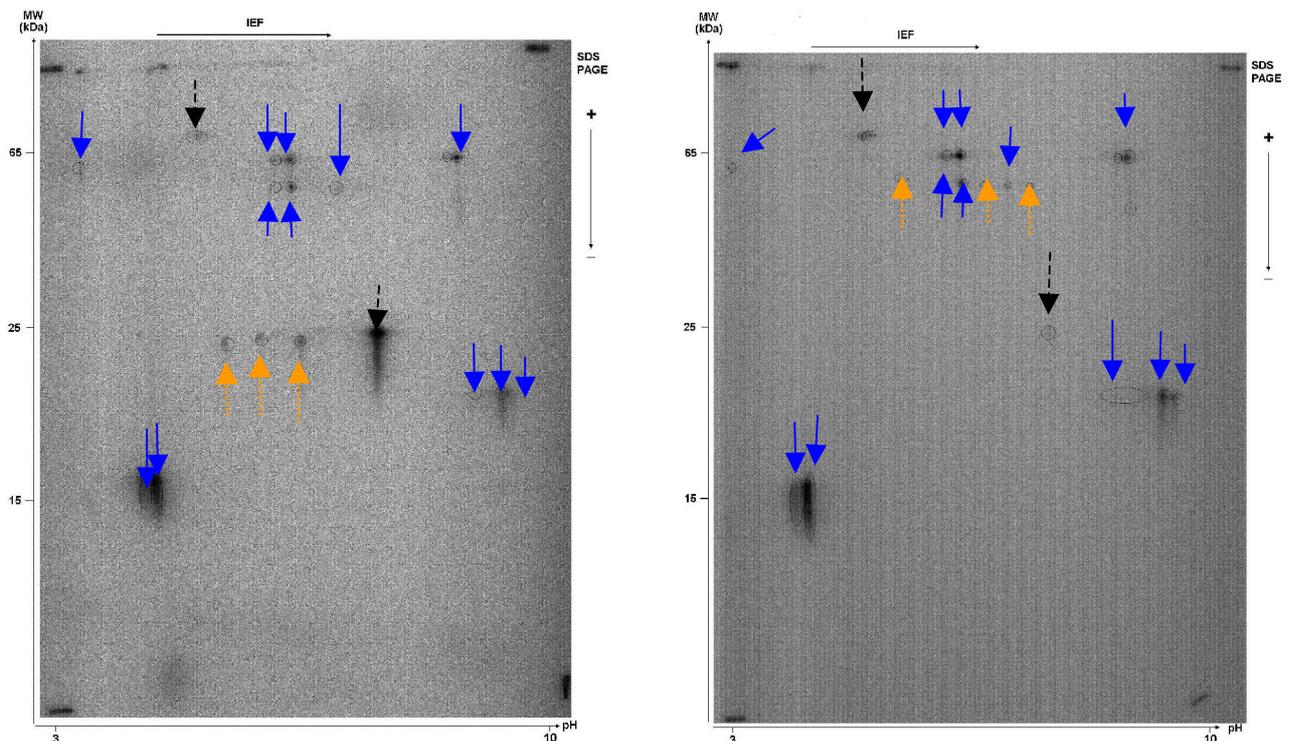
Das Autoradiogramm des Se(-)-Tiers zeigt grosse Ähnlichkeiten zu dem Autoradiogramm des Se(+)-Tieres und unterscheidet sich nur sehr wenig von diesem. Auch hier zeigt das Homogenat Banden bei ca. 70 kDa, 58 kDa und 45 kDa, jedoch keine Bande bei 38 kDa. Dafür sind zwei sehr schwache Banden bei ca. 30 kDa und 32 kDa zu erkennen, die besonders in der Kernfraktion angereichert sind. Im Bereich unter 30 kDa sind dieselben Banden wie bei dem Se(+)-Tier anzutreffen. Diese liegen bei ca. 25 kDa, 22 kDa, 18 kDa und bei 13-15 kDa. Weitere Unterschiede sind nur in der differentiellen Intensität einiger Banden auszumachen. So ist die besonders auffällige Bande bei ca. 18 kDa bei dem Se(+)-Tier wesentlich weniger stark ausgeprägt als bei dem Se(-)-Tier, was darauf schliessen lässt, dass dieses Protein in der Hierarchie der mit Selen zu versorgenden Proteine eine untergeordnete Position einnimmt, was daran liegen kann, dass das Selen unspezifisch in Form von Selenomethionin eingebaut wird. Andererseits kann auch der Selenmangel eine Expression dieses Proteins verringern. Ähnlich verhält es sich, wenn man die Proteine bei ca. 20 kDa und 25 kDa im Zytosol der beiden unterschiedlich mit Selen versorgten Tiere betrachtet. Während bei dem Se(+)-Tier die 25 kDa-Bande eine höhere Aktivität zeigt als die 20 kDa-Bande, ist es bei dem Se(-)-Tier genau umgekehrt. Es scheint so, als ob bei einem Selenmangel das Protein/die Proteine bei 20 kDa vorrangiger sind und wichtiger für den Organismus als das Protein/die Proteine bei 25 kDa. Da es sich bei diesen Proteinen um die PHGPx (ca. 20 kDa) und cGPx (ca. 25 kDa) handelt, ist es so,

dass beide Proteine ähnliche Funktionen haben und Peroxyde reduzieren. Jedoch steht die PHGPx in der Selenversorgung in der Hierarchie über der cGPx (36, 37, 81).

### 5.3.3. Untersuchungen zu der Selenoproteinverteilung in den subzellulären Fraktionen der Prostata mittels 2D-Gelelektrophorese und Autoradiographie

Um die Unterschiede in der Selenoproteinverteilung besser darzustellen, wurden von den Proben zweidimensionale Groß-Gele (200 x 300 x 0,9 mm ) angefertigt. Diese haben den Vorteil, dass die einzelnen Banden eines SDS-Gels noch nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt werden und somit die einzelnen Proteine und deren Isoformen zu Tage treten und besser bestimmbar sind. Der Nachteil ist, dass nur 1/10 der Probenmenge für eine SDS-PAGE aufgetragen werden kann und diese geringe Menge auf eine wesentlich grössere Fläche verteilt wird. Bei mit <sup>75</sup>Se markierten Proben hat man den Vorteil einer sehr hohen Auflösung der Proteine, aber den Nachteil, dass die Proteine teilweise zu geringe Signale (Schwärfungen) ergeben, die nicht so einfach mit der Autoradiographie nachgewiesen werden können.

Die Homogenate der Prostatas der beiden unterschiedlich mit Selen ernährten Ratten wurden mittels NEPHGE (82) aufgetrennt und ihre Verteilung autoradiographisch analysiert.



Graphiken 53 & 54: Diese beiden Autoradiogramme zeigen die Verteilung der Selenoproteine in den Homogenaten der Se(+)- und Se(-)-Ratte nach der NEPHGE. Bedeutung der Pfeile:

- ↓ In beiden Gelen vorhandene Proteine mit vergleichbarer Intensität;
- ↕ In beiden Gelen vorhandene Proteine mit unterschiedlicher Intensität ;
- ↑ nur in einem Gel vorhandenes Protein

Die Autoradiogramme der beiden durch die NEPHGE aufgetrennten Proteine in den Homogenaten der Rattenprostata zeigen eine ähnliche Verteilung der Selenoproteine.

So wurden in beiden Gelen, wie es zu erwarten war, Spots gefunden, die den Molekularmassen von 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 45 kDa, 58 kDa und 70 kDa entsprechen. Das sind diejenigen Molekularmassen, die auch in den Autoradiogrammen der SDS-Gele zu finden waren. Banden, die schwächer bei den eindimensionalen Autoradiogrammen zu sehen waren, sind im 2D-Autoradiogramm nicht zu erkennen, da die Aktivität nicht ausreichte, um ein Schwärzung hervorzurufen.

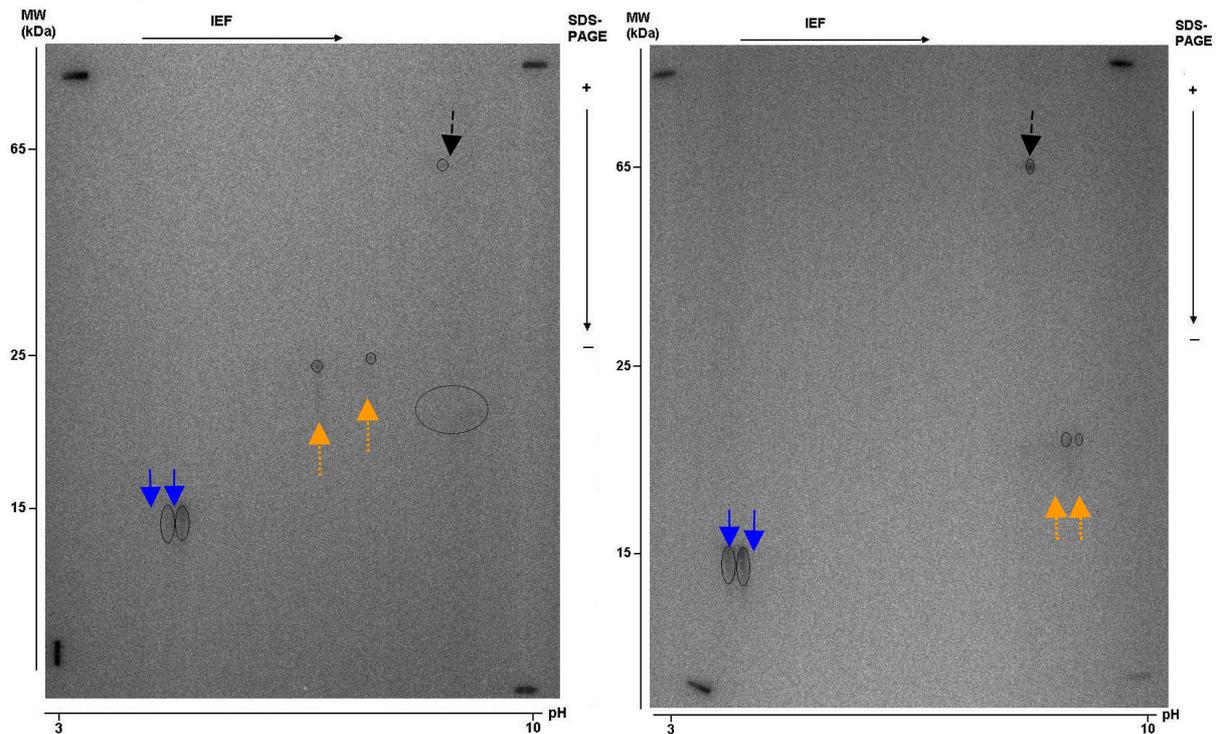
Der größte Unterschied zwischen den beiden Proteinspektren ist ein Spot bei ca. 25 kDa, der im Se(-)-Homogenat nur schwach auftritt, jedoch beim Se(+)-Homogenat die grösste Intensität hat. Drei weitere Spots mit einer etwas geringeren Molekularmasse um 22 kDa, jedoch im sauren IP-Bereich, treten des Weiteren nur im Se(+)-Homogenat auf. Im Gegenzug sind drei Spots im Molekularmassenbereich von ca. 20 kDa und einem IP von 8-9 etwas intensiver in ihrer Schwärzung im Se(-)-Homogenat zu beobachten. Diese Tatsache bestätigt die Aussage, die in Kapitel 12 über die Homogenate getroffen wurde, dass diese Proteine ähnliche Funktionen haben, aber die Proteine um ca. 20 kDa essentieller für den Organismus zu sein scheinen. Es ist wahrscheinlich, dass es sich bei den Spots um 20 kDa um verschiedene Formen der PHGPx handelt und bei den Spots um 25 kDa um unterschiedliche Formen der GPx (83).

Ein weiterer Unterschied zeigt sich in der Anzahl der Spots im Bereich zwischen 45 kDa und 70 kDa. In diesem Bereich zeigen sich drei schwächer geschwärmte Spots in dem Autoradiogramm des Se(-)-Homogenats, welche in dem anderen Autoradiogramm nicht zu finden sind. Die Nähe zu drei weiteren Spots des gleichen Molekularmassenbereichs lässt vermuten, dass es sich hierbei um Isoformen eines Proteins handelt, welches wahrscheinlich das Selenoprotein P ist.

Ein letzter augenfälliger Unterschied zeigt sich darin, dass das Autoradiogramm des Se(+)-Homogenats im Molekularmassenbereich von ca. 70 kDa einen sehr schwachen und wenig scharf abgegrenzten Spot zeigt, aber dass das Autoradiogramm des Se(-)-Homogenats an der gleichen Stelle zwei scharf voneinander abgegrenzte Spots zeigt, die sich nur geringfügig in ihrer Azidität unterscheiden. Vermutlich handelt es sich hierbei um Formen des Albumins, welches unspezifisch das Selen bindet (84).

Auch die <sup>75</sup>Se markierten Proteine in den einzelnen Organellen der Prostatazellen wurden mittels NEPHGE getrennt und autoradiographisch analysiert.

Die folgenden beiden Autoradiogramme zeigen die  $^{75}\text{Se}$  markierten Proteine in der Kernfraktion der Rattenprostata.



Graphiken 55 & 56: Diese beiden Autoradiogramme zeigen die Verteilung der Selenoproteine in den Kernfraktionen der Se(+)- und Se(-)-Ratte nach der NEPHGE. Bedeutung der Pfeile:

▼ In beiden Gelen vorhandene Proteine mit vergleichbarer Intensität; 
 ▼ In beiden Gelen vorhandene Proteine mit unterschiedlicher Intensität; 
 ▲ nur in einem Gel vorhandenes Protein

Die erhaltenen Autoradiogramme nach der NEPHGE der beiden Kernfraktionen zeigen weniger Spots als in den Autoradiogrammen der Homogenate. Des Weiteren ist die Schwärzung auf den Imagerplatten durch die Selenoproteine wesentlich weniger deutlich, was auf eine geringere Aktivität der Proteine schließen lässt. Es sind pro Gel nur noch jeweils fünf Spots zu sehen.

Von diesen fünf Spots sind nur zwei Spots in beiden Gelen identisch. Diese beiden Spots befinden sich im sauren Bereich bei ca. 15 kDa, so wie es auch in den Autoradiogrammen der Homogenate zu sehen war. Ein weiteres Protein ist außerdem noch bei beiden Autoradiogrammen zu beobachten, jedoch in unterschiedlicher Intensität. Im Molekularmassenbereich um 60 kDa und einem IP von 8 ist dieses Protein anzufinden. Bei der Se(+)-Kernfraktion ist dieses Protein im Vergleich zu der Se(-)-Kernfraktion nur sehr schwach zu sehen.

Der grösste Unterschied zwischen den beiden Autoradiogrammen sind jeweils zwei Spots, die in dem anderen Autoradiogramm nicht vorkommen. Hierbei handelt es sich um die bereits oben erwähnten Spots bei ca. 25 kDa im Se(+)-GEL und die Spots bei ca. 20 kDa im Se(-)-Gel.

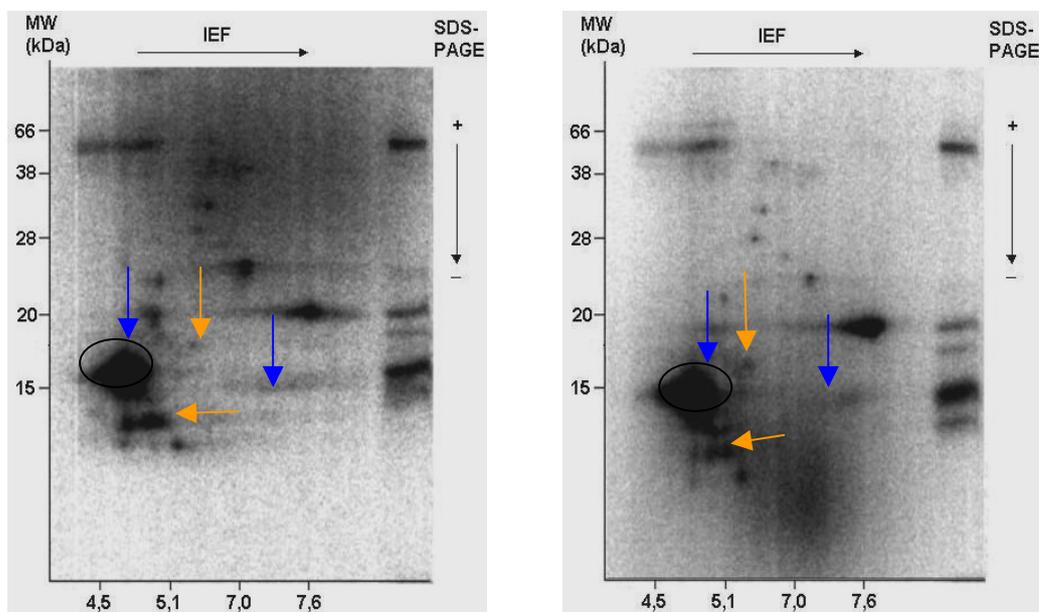
Die Autoradiogramme der NEPHGE der anderen subzellulären Fraktionen lieferten keine aussagekräftigen Resultate, da die selenhaltigen Proteine nicht in ausreichender Proteinmenge vorhanden waren.

Deswegen wurden kleinere 2D-Gele ( 140 x 120 x 1,2 mm) angefertigt, die grössere Probenvolumina aufnehmen können.

Der Vorteil dieser Methode ist eindeutig die Aufnahme einer grösseren Probenmenge und damit auch einer grösseren Aktivität, wodurch auch Proteine mit geringerer Aktivität sichtbar werden.

Die Nachteile liegen in einer viel geringeren Auflösung der Proteine, wodurch Überlagerungen von Proteinspots entstehen können und einzelne Proteine übersehen werden können.

Die Homogenate und subzellulären Fraktionen wurden zuerst durch die IEF nach ihren isoelektrischen Punkten (IP) auf Stripes aufgetrennt und dann per SDS-PAGE nach ihrer Masse aufgetrennt. Die jeweilige Fraktion wurde daneben als Markerprotein zum Vergleich aufgetragen, und die Gele autoradiographisch untersucht.



Graphiken 57 & 58 : Die beiden Autoradiogramme zeigen die Homogenate der Se(+)-Rattenprostata (links) und der Se(-)-Rattenprostata (rechts) nach ihrer Auftrennung nach IP und Masse.

Wie zu erwarten war, zeigen sich bei dieser Art der 2D-Elektrophorese mehr Spots, jedoch mit geringerer Auflösung als bei der NEPHGE. Auffällig hierbei sind vor allem einige Spots zwischen 25 kDa und 45 kDa, die in den NEPHGE-Autoradiogrammen gar nicht erkennbar waren und die sehr schlechte Aufspaltung der Selenoproteine im höheren Massenbereich.

Im Bereich um 15 kDa erkennt man deutlich, dass dort mehr als die in der NEPHGE beschriebenen zwei sauren Proteine vorkommen. Insgesamt sind es 11 Proteine mit einer Masse unterhalb von 20 kDa. Dominant sind die beiden Spots um 15 kDa mit einem IP von ca. 4,5, die

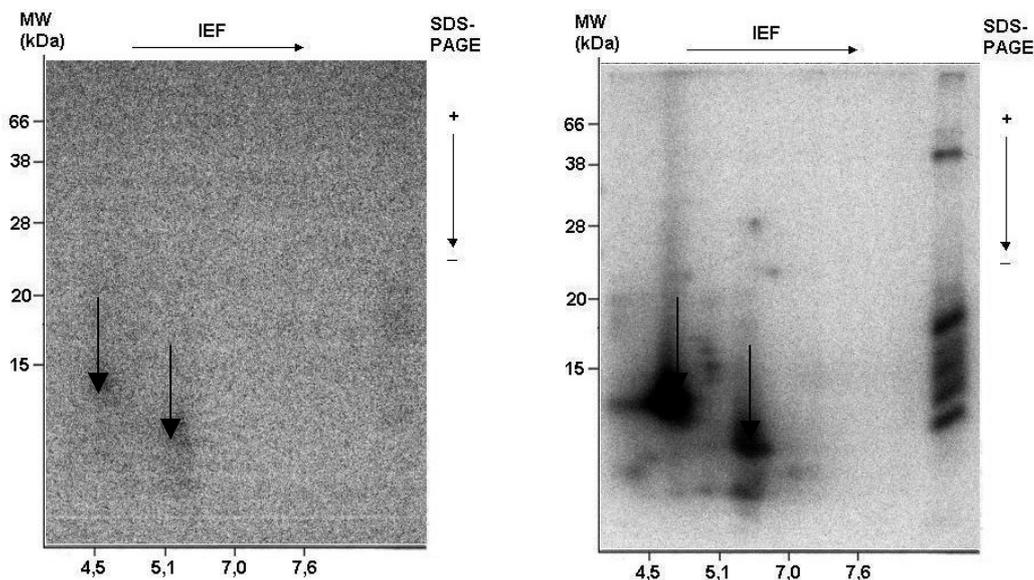
auf Grund ihrer sehr hohen Aktivität nicht mehr voneinander unterscheidbar sind und das saure 15 kDa-Selenoprotein darstellen könnten. Allerdings ist auch der Spot des neutralen 15 kDa-Selenoproteins gut bei einem IP von 7,3 zu erkennen, was mit bereits publizierten Ergebnissen übereinstimmt (48). Des Weiteren ist ein Protein um 18 kDa und einem IP von ca. 5,0 gut zu erkennen, bei dem es sich um das membrangebundene 18 kDa-Selenoprotein (47) handeln könnte. Im Massenbereich unter den dominanten 15 kDa Spots sind noch Spots erkennbar, bei denen es sich um Isoformen des Selenoproteins R (85) oder dem Selenoprotein M handeln könnte (86).

Die drei Spots der PHGPx im Bereich um 20 kDa und einem leicht basischen IP sind hier nur als ein langgezogenes Band zu erkennen. Im sauren Bereich um IP 4,6 zeigt sich eine weitere Isoform der PHGPx, die in den NEPHGE-Autoradiogrammen nicht zu sehen war.

Die drei Spots, die nicht in den NEPHGE-Autoradiogrammen zu sehen waren, gehören zu den Deiodinasen, die bereits in früheren Studien identifiziert wurden. Die Molekularmasse der Deiodinase I liegt bei 27 kDa (87). Auch hier ist gut zu erkennen, wie bei den Autoradiogrammen der NEPHGE, dass die GPx wesentlich stärker in den Se(+)-Homogenaten zu erkennen ist als in den Se(-)-Homogenaten. Genau umgekehrt verhält es sich bei der PHGPx, die stärker in den Se(-)-Homogenaten zu erkennen ist.

Weitere Informationen bezüglich der Zusammenhänge unter Berücksichtigung des Selenstatus wurden nicht erhalten.

Die Kernfraktionen wurden nach der NEPHGE ebenfalls autoradiographisch untersucht. Sie sind im Folgenden beschrieben.



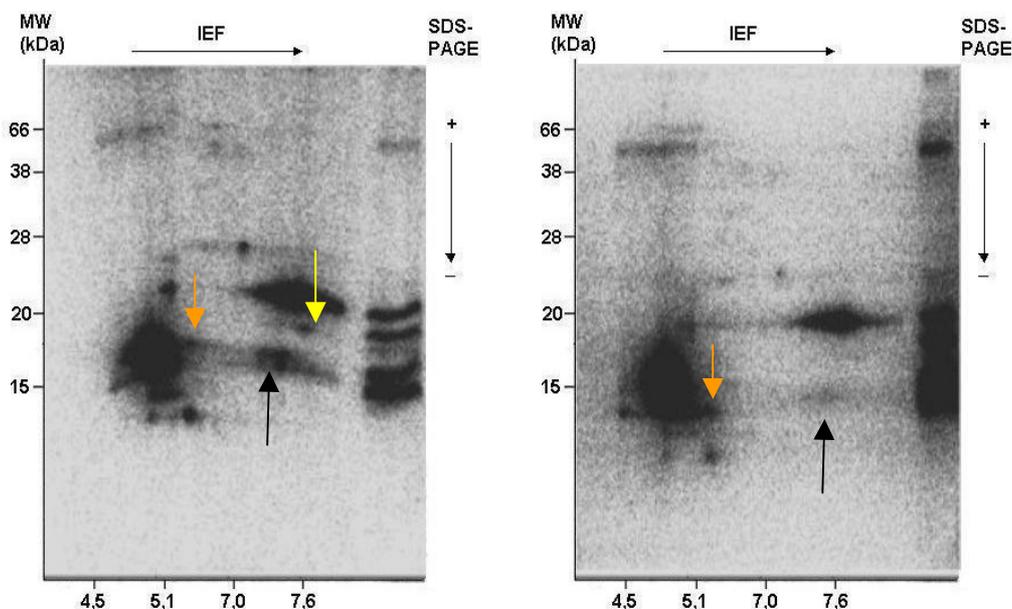
Graphiken 59 & 60: Diese beiden Autoradiogramme zeigen die Verteilung der Selenoproteine in der nuklearen Fraktion der Se(+)-Rattenprostata (links) und der Se(-)-Rattenprostata (rechts).

Die beiden Autoradiogramme unterscheiden sich erheblich in der Intensität der angezeigten Selenoproteine, was auf eine sehr geringe Radioaktivität in der Kernfraktion des Se(+)-Tieres im Vergleich zu der Kernfraktion des Se(-)-Tieres zurückzuführen ist. Auf Grund dessen würde ein direkter Vergleich zu unkorrekten Aussagen führen.

In beiden Autoradiogrammen ist jedoch zu sehen, dass das saure 15 kDa-Selenoprotein und zwei Proteine bei ca. 12 kDa und 8 kDa und einem IP von ca. 6 vorhanden sind.

Auffällig ist außerdem, dass Proteine mit einer höheren Molekularmasse als 30 kDa nicht gut vertreten sind.

Die  $^{75}\text{Se}$ -markierten Proteine der mitochondrialen Fraktion wurden ebenso wie die Proteine der Homogenate und der Kerne zweidimensional aufgetrennt und die Verteilung der markierten Proteine autoradiographisch untersucht.



Graphiken 61 & 62: Hier sind die Autoradiogramme der 2D-Gele der mitochondrialen Fraktion der Se(+)- (links) und Se(-)-Rattenprostata (rechts) dargestellt. Die  $^{75}\text{Se}$  markierten Proteine sind als Schwärzung zu sehen.

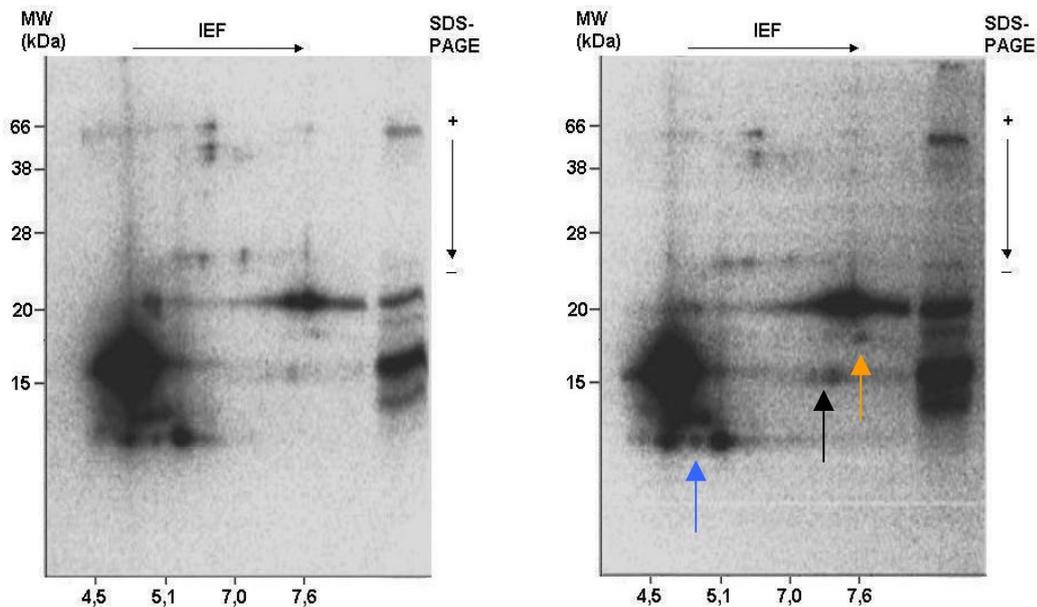
Die Autoradiogramme der mitochondrialen Proteinfraction zeigen einige Gemeinsamkeiten zu denen der Homogenate.

Zwischen den beiden Autoradiogrammen treten jedoch auch mehrere Differenzen auf, wie z.B. das Fehlen der Spots der Deiodinase. Dies liegt daran, dass diese mit den ER, die mit der Kernfraktion anhaften, ausfallen.

Im Molekularmassenbereich von ca. 13 kDa und einem IP von 5,3 ist ein Selenoprotein im Autoradiogramm der Se(-)-Ratte zu beobachten, welches nicht bei der Se(+)-Ratte vorhanden ist. Des Weiteren ist dieses Protein auch bei keiner weiteren Fraktion, ausser dem Homogenat, zu beobachten. Dies führt zu der Annahme, dass es sich um ein für diese Fraktion spezifisches Protein handelt. Dafür ist ein Selenoprotein mit der Molekularmasse von ca. 16 kDa und gleichem IP von 5,3 in der Se(+)-Ratte zu finden, welches bei der Se(-)-Ratte nicht vorkommt. Ähnlich verhält es sich bei dem neutralen 15 kDa-Selenoprotein, welches in beiden Tiergruppen stark exprimiert vorkommt, speziell in der Se(+)-Ratte. Nach der Synthese dieses Proteins im Zytosol ist es möglich, dass dessen anschliessender Transport zu den Kompartimenten der mitochondrialen Fraktion erfolgt.

Die Abhängigkeit der PHGPx bei ca. 20 kDa und den GPx bei ca. 25 kDa zwischen den beiden Rattengruppen entspricht den Aussagen, die schon für das Homogenat getroffen wurden (S. 63). Besonders interessant ist die Beobachtung eines neutralen (IP = 7,0) Selenoproteins mit der Molekularmasse von ca. 18 kDa in der mitochondrialen Fraktion der Se(+)-Ratte, bei dem es sich um das Selenoprotein T handeln könnte.

Die Verteilung der <sup>75</sup>Se-markierten Proteine in den mikrosomalen Fraktionen der Se(+) und Se(-)-prostata wurden nach der Auftrennung der Proteine mit der zweidimensionalen Elektrophorese autoradiographisch detektiert.



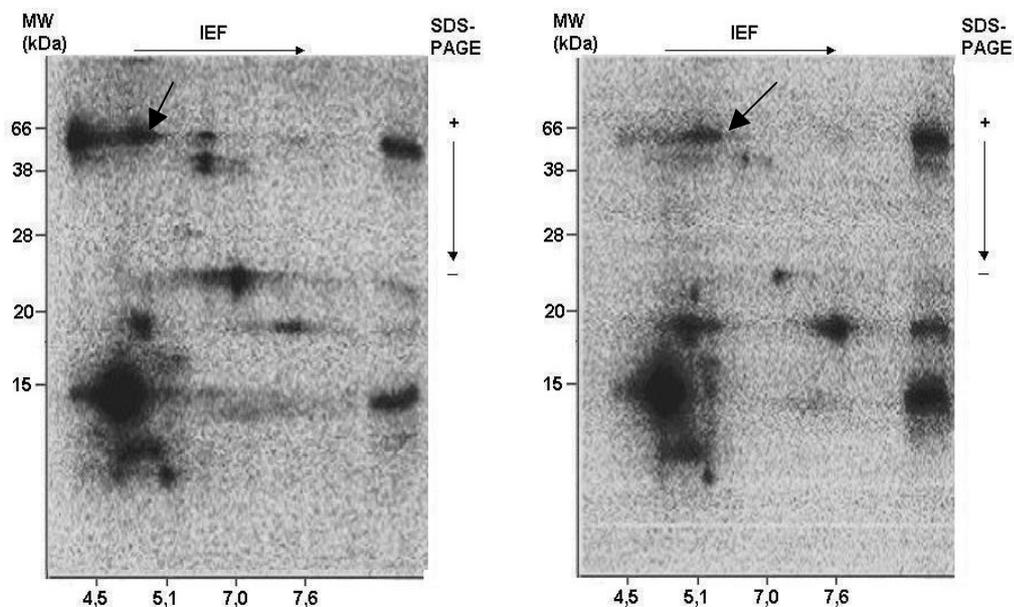
Graphiken 63 & 64: Diese beiden Autoradiogramme der <sup>75</sup>Se-markierten Proteine in den der mikrosomalen Fraktion der Se(+)- und Se(-)-Rattenprostata wurden von den jeweiligen 2D-Gelen aufgenommen. Die <sup>75</sup>Se-markierten Proteine sind als Schwärzung zu sehen.

Die Verteilung der Selenoproteine in diesen beiden Autoradiogrammen zeigt, wie in den anderen Autoradiogrammen zuvor auch, die Abhängigkeit der PHGPx und der cGPx vom Selenstatus.

Das neutrale 15 kDa-Selenoprotein kommt in beiden Autoradiogrammen vor, jedoch zeigt sich diesmal eine umgekehrte Verteilung wie bei den mitochondrialen Fraktionen. Das Selenoprotein im Massenbereich von 18 kDa und einem IP von 7,0, welches wahrscheinlich das Selenoprotein T ist, bindet am ER und kommt somit auch in der mitochondrialen Fraktion vor.

Ein Selenoprotein, welches nur in den mikrosomalen Fraktionen zu finden ist, zeigt sich bei 10 kDa und einem IP von ca. 4,9. Es befindet sich zwischen zwei Selenoproteinen mit identischer Masse und den IPs von 4,7 und 5,1, die jedoch auch in den Homogenaten und den mitochondrialen Fraktionen ebenfalls zu finden waren. Dieses Protein mit dem IP von 4,9 scheint jedoch ausschliesslich in der mikrosomalen Fraktion zu finden zu sein.

Auch die löslichen Proteine der Zytosole wurden mit der 2D-Elektrophorese aufgetrennt und anschliessend autoradiographisch analysiert.



Graphiken 65 & 66: Diese beiden Autoradiogramme zeigen die Verteilung der mit <sup>75</sup>Se markierten Selenoproteine in der zytosolischen Fraktion der Se(+)-Rattenprostata (links) und der Se(-)-Rattenprostata (rechts) nach der Auftrennung mit der 2D-Elektrophorese.

Beim Betrachten der beiden Autoradiogramme fällt als Erstes auf, dass im Molekularmassenbereich über 38 kDa die meisten Selenoproteine im Vergleich zu den anderen subzellulären Fraktionen anzufinden sind.

Im Bereich um 58 kDa, wo das Selenoprotein P anzufinden ist, erkennt man deutlich einen Unterschied zwischen den beiden Rattengruppen mit unterschiedlicher Selendiät. Das Zytosol der Se(+)-Ratte enthält deutlich mehr Selenoprotein P als das Zytosol der Se(-)-Ratte.

Die Ausprägung des Einflusses der Selendiät auf die Proteine PHGPx und GPx ist hier am deutlichsten zu beobachten.

Das Selenoprotein mit der Molekularmasse 10 kDa und dem IP von 4,9 ist in keinem der beiden Autoradiogramme zu beobachten, was die Annahme bestätigt, dass es sich um ein spezifisch in der mikrosomalen Fraktion vorhandenes Protein handelt. Bei diesem Protein handelt es sich wahrscheinlich um das Selenoprotein W (88, 89), welches immunologisch nicht detektiert werden konnte auf Grund veralteter SelW-Antikörper.

Das benachbarte Protein mit der gleichen Molekularmasse und dem etwas saureren IP bei 4,7 ist im selenadäquat ernährten Tier wiederzufinden, jedoch nicht im mangelernährten Tier.

### **Zusammenfassung von Kapitel 5.3: Biochemische Trennverfahren und Autoradiographie**

In Kapitel 5.3.2. konnte gezeigt werden, dass mit <sup>75</sup>Se markierte Ratten den Radiotracer auch in der Prostata inkorporieren. Aus diesem Grund wurden die selenhaltigen Proteine in verschiedenen Gewebekomponenten und in den subzellulären Fraktionen der Prostata untersucht. Die selenhaltigen Proteine in den markierten Rattenorganen wurden mit der SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch untersucht.

Es zeigte sich durch die Autoradiographie, dass etwa 10 bis 15 Banden in den SDS-Gelen der Homogenate der verschiedenen Organe Selenoproteine sind. Jedes Gewebekomponente zeigte dabei eine andere spezifische Zusammensetzung der Selenoproteine, die sich größtenteils in der Konzentration der einzelnen Selenoproteine zueinander unterschieden. Es gab vier Selenoproteine, die ausser in dem Prostatahomogenat auch bei allen anderen Homogenaten gefunden wurden und den Selenoproteinen: Selenoprotein P (58 kDa), cGPx (20-25 kDa), PHGPx (20kDa) und dem sauren 15 kDa-Selenoprotein (15 kDa) zugeordnet.

Der Vergleich der Autoradiogramme der mit der SDS-PAGE aufgetrennten Gewebekomponente mit denen der verschiedenen Gewebezytosole zeigte, dass im Zytosol die höhermolekularen (über 28 kDa) Selenoproteine abgereichert und die niedermolekularen Selenoproteine angereichert wurden. Ein Selenoprotein im Bereich von 18 kDa fehlte in den Autoradiogrammen der Zytosole als Bande.

Die eindimensionale Auftrennung der Proteine in den einzelnen subzellulären Fraktionen der Prostata (Nuklei, mitochondriale Fraktion, mikrosomale Fraktion und Zytosol) unter Berücksichtigung des Selenstatus mit der SDS-PAGE und die anschliessende Autoradiographie zeigten die unterschiedliche Verteilung der Selenoproteine in diesen Fraktionen. Im Homogenat der Se(+)-Prostata, wo alle Zellbestandteile der Prostata vorhanden sind, konnten die meisten Banden beobachtet werden, die im Bereich von 70 kDa, 58 kDa, 45 kDa, 38 kDa, 25 kDa, 22

kDa, 20 kDa, 18 kDa und zwei Banden um 15 kDa lagen. Die Banden im Molekularmassenbereich von 25 kDa, 20 kDa und 15 kDa sind in allen Fraktionen ubiquitär verteilt. Andere Selenoproteine sind nur in bestimmten Fraktionen zu finden, wie das Selenoprotein dessen Bande bei 22 kDa fokussiert, das ausser im Homogenat noch in den Nuklei und der mitochondrialen Fraktion zu finden. Das Selenoprotein im Molekularmassenbereich von 18 kDa ist in allen Fraktionen ausser dem Zytosol zu finden, da es ein membrangebundenes Protein ist, wie es in früheren Studien belegt wurde (47). Die ubiquitär verteilten Proteine um 15 kDa sind am stärksten in der mitochondrialen und der mikrosomalen Fraktion vertreten. Der Vergleich des Autoradiogramms der SDS-Gele mit den subzellulären Fraktionen der Se(+)-Prostata mit der Se(-)-Prostata zeigt, dass das Protein bei 38 kDa nicht in dem Autoradiogramm der Se(-)-Prostata zu finden ist. Dafür sind zwei Selenoproteine mit geringer Konzentration in der Se(-)-Prostata im Molekularmassenbereich von 30 kDa und 32 kDa erkennbar, die vor allem in den Nuklei angereichert sind. Weitere Unterschiede gibt es nur in der unterschiedlichen Intensität der einzelnen Selenoproteine. Die grössten Unterschiede in den Intensitäten der Selenoproteinbanden sind im Bereich von 25 kDa und 18 kDa, die in der Se(-)-Prostata schwächer ausgeprägt sind, sowie im Bereich von 20 kDa, die in der Se(-)-Prostata stärker ausgeprägt ist, zu erkennen.

Die Autoradiogramme der mit der NEPHGE erstellten 2D-Gele, zeigen nur für die beiden Homogenate mit unterschiedlichem Selenstatus aussagekräftige Resultate. Die Autoradiogramme der NEPHGE-Gele mit den subzellulären Fraktionen, waren wegen zu niedriger Konzentrationen der Selenoproteine auf den Gelen nicht aussagekräftig. Die Autoradiogramme der vom Selenstatus abhängigen Homogenate, zeigen ein unterschiedliches Spotspektrum an Selenoproteinen. Das Autoradiogramm der Se(+)-Homogenats zeigt im Bereich von 25 kDa drei Spots der cGPx, die in dem Autoradiogramm des Se(-)-Homogenats nur schwach oder gar nicht erkennbar sind. Dafür sind im Autoradiogramm des Se(+)-Homogenats die Spots der PHGPx und des SeP in ihrer Intensität stärker zu erkennen. Spots im Bereich von 15 kDa und niedrigen IP, sowie im Bereich von ca. 55-70 kDa sind in etwa gleicher Intensität zu erkennen.

Die Autoradiogramme der kleinen 2D-Gele aller subzellulären Fraktionen der Se(+)- und Se(-)-Prostata zeigen im Vergleich zu den Groß-Gelen der NEPHGE mehr Spots der Selenoproteine in geringerer Auflösung. Vor allem zeigt sich der Unterschied zwischen den Autoradiogrammen der großen und kleinen Gelen darin, dass im Molekularmassenbereich unter 20 kDa statt nur zwei Spots 11 Spots zu beobachten sind. Ausser dem dominanten Spot des sauren 15 kDa-Selenoproteins (IP 4,5) konnten der Spot des neutralen 15 kDa-Selenoproteins (IP 7,3) und mehrere Spots um 12 kDa und einem IP 4,5 – 5,2 erkannt werden. Die Deiodinase I kann im

Molekularmassenbereich von 27 kDa wiedergefunden werden. Der Unterschiedliche Selenstatus zeigt sich auch hier vor allem in den Intensität der Spots der cGPx und der PHGPx. Die cGPx ist im Autoradiogramm des Se(+)-Homogenats stärker und die PHGPx schwächer exprimiert als im Autoradiogramm des Se(-)-Homogenats.

Ein Vergleich des Autoradiogramms der Se(+)-Kerne mit dem Autoradiogramm der Se(-)-Kerne ist auf grund mangelndes Radiotracers in den Se(+)-Kernen nicht möglich. In beiden Autoradiogrammen kann das saure 15 kDa-Selenoprotein sowie ein 12kDa- und ein 8 kDa-Selenoprotein mit einem IP von 6 beobachtet werden.

In den Autoradiogrammen der mitochondrialen Fraktionen zeigt sich, dass zwei Selenoproteine von 16 kDa und einem IP von 5,3 sowie 18 kDa und einem IP von 7,0 nur und das neutrale 15 kDa-Selenoprotein vorwiegend in der Se(+)-Ratte zu finden sind. Dafür ist ein Selenoprotein von 13 kDa und einem IP von 5,3 nur in dem Autoradiogramm der Se(-)-Ratte fokussiert.

Die Autoradiogramme der mikrosomalen Fraktion ähneln stark denen der mitochondrialen Fraktion. Auch hier können das Selenoprotein im Bereich von 18 kDa und einem IP von 7,0 sowie das neutrale 15 kDa-Selenoprotein detektiert werden. Ein Selenoprotein bei 10 kDa und einem IP von ca. 4,9 kommt unabhängig vom Selenstatus nur in der mikrosomalen Fraktion vor.

Die autoradiographisch untersuchten Gele der beiden Zytosole zeigen, dass eindeutig mehr SeP und cGPx in dem Se(+)-Zytosol als im Se(-)-Zytosol enthalten sind. Die PHGPx ist dafür stärker in dem Se(-)-Zytosol enthalten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit Hilfe der 2D-Gele, unabhängig davon ob es sich um grosse NEPHGE-Gele oder kleine 2D-Gele mit Stripes handelt, die Proteinbanden, welche in den 1D-Gelen zu sehen waren und wenig aufschlussreich waren, gut aufgespreizt wurden, um sie sehr deutlich zu erkennen.

Mit den kleinen 2D-Gelen konnten hervorragend sehr viele Spots dargestellt werden, auch wenn deren Aktivität nur gering war, allerdings mit einer weniger guten Auflösung wie bei den NEPHGE-Gelen. Die NEPHGE-Gele wiederum zeigten eine hervorragende Auflösung der Proteine mit hoher Aktivität, wodurch Spots unterschieden werden konnten, die in den kleinen Gelen als ein verschmierter großer Spot zu sehen war. Mit dieser Methode konnten allerdings nur Proteine mit hoher Aktivität gut beobachtet werden, wohingegen Selenoproteine geringer Aktivität nicht mehr erfasst werden konnten.

## 5.4. Proteinexpressionsunterschiede im Rattenprostataproteom in Abhängigkeit vom Selenstatus: Lokalisation und Identifizierung

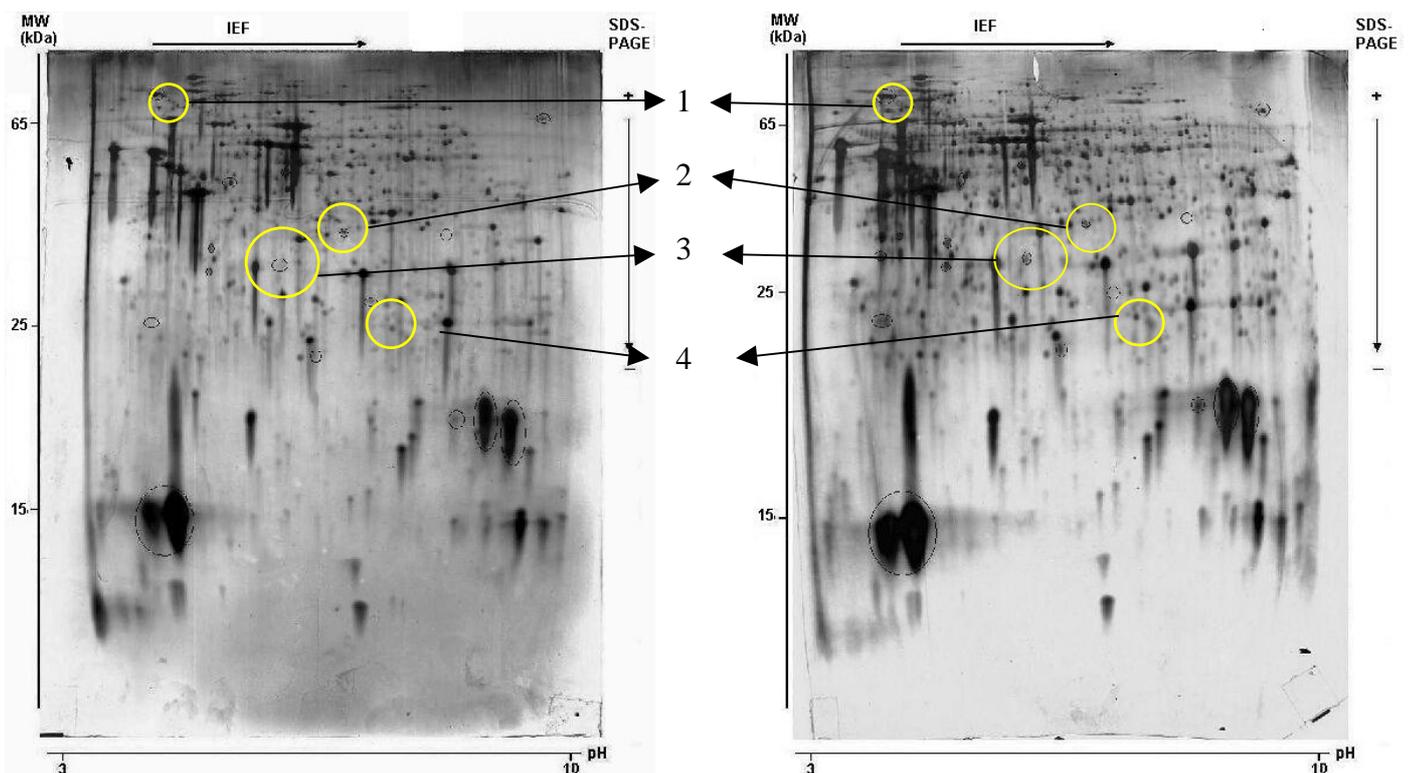
### 5.4.1. Untersuchung der Proteinexpression in den subzellulären Fraktionen der Rattenprostata abhängig von der Selendiät mittels NEPHGE

Die Groß-Gele der NEPHGE, mit denen auch die Autoradiogramme angefertigt wurden, eignen sich auf Grund ihrer hohen Auflösung hervorragend zum Vergleich der exprimierten Proteine in den subzellulären Fraktionen der Se(+)- und Se(-)-Ratte. Die mit Silber angefärbten NEPHGE-Gele zeigen ungefähr 2000 Spots.

Für den Vergleich zwischen den Se(+)-Ratten und den Se(-)-Ratten wurden die beiden Gele der Homogenate verglichen und die beiden Gele der Zytosole auf Unterschiede untersucht.

Die Gele wurden mit der Proteinanalyse-Software Proteomweaver™ ausgewertet und es wurde im Proteom nach Spots gesucht, welche Expressionsunterschiede zwischen selenmangel- und selenadäquater Ernährung zeigen.

Die beiden NEPHGE-Gele der beiden Rattenhomogenate sind folgend angeführt.

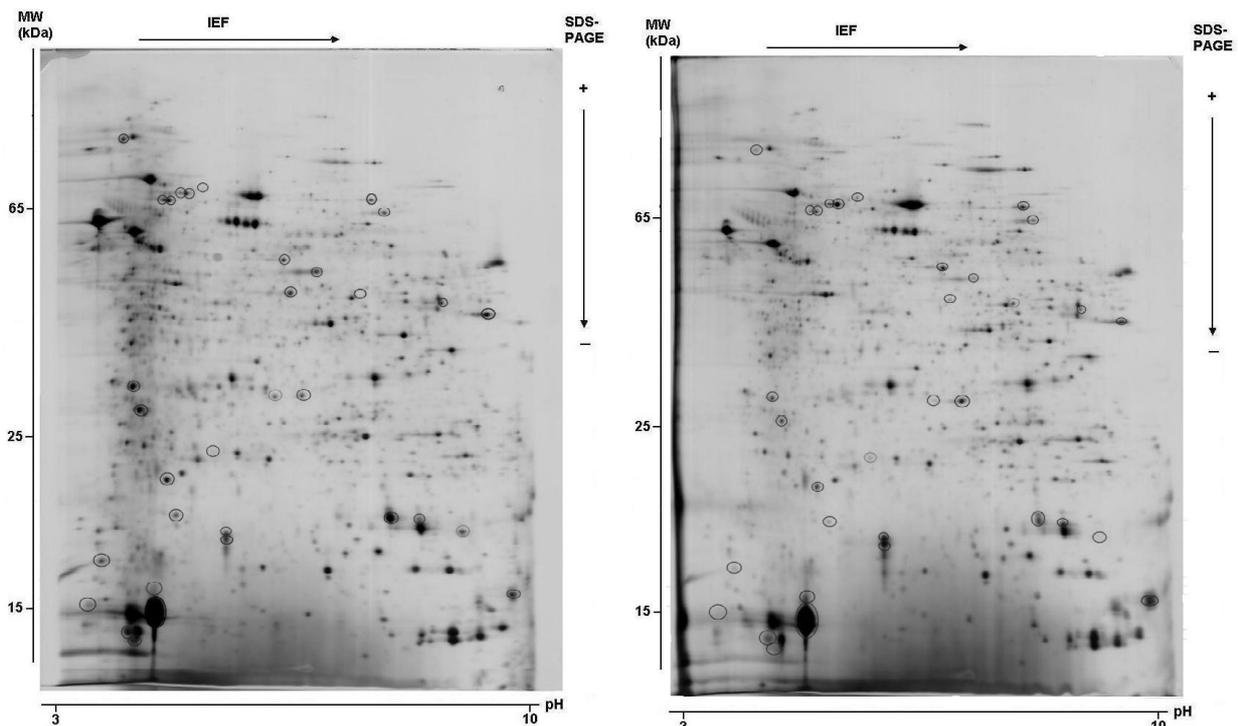


Graphiken 67 & 68: Diese beiden NEPHGE-Elektropherogramme zeigen die Proteinverteilungen in den Rattenhomogenaten der Se(+)-Ratten (X links) und der Se(-)-Ratten (Y rechts). Unterschiede in der Proteinexpression sind durch dunkle Kreise markiert. Die für die MALDI ausgestochenen Spots wurden zusätzlich hell markiert.

Unter Zuhilfenahme des Programms Proteomweaver konnten in den beiden NEPHGE-Elektropherogrammen 42 Spotpaare gefunden werden, die sich signifikant in ihrer Intensität unterscheiden. Hierbei fällt auf, dass bei den Se(+)-Ratten mit 28 Spots mehr Spots eine höhere Intensität haben als bei den Se(-)-Ratten. Die meisten Unterschiede lassen sich im IP-Bereich zwischen 5 und 8 und dem Molekularmassenbereich zwischen 15 kDa und 20 kDa erkennen. Im sauren Bereich um IP 4,5-5 und dem Molekularmassenbereich um 15 kDa treten die meisten Spots auf, die bei den Se(-)-Rattenhomogenaten stärker exprimiert sind als bei den Se(+)-Rattenhomogenaten. Ein Protein mit der Molekularmasse von ca. 40 kDa wurde bei den Se(+)-Homogenaten und vier Proteine wurden bei den Se(-)-Homogenaten im Massenbereich von 18- 30 kDa nicht exprimiert.

Vier Spotpaare bei denen deutliche Unterschiede in der Expression aufgetreten sind, wurden mit der MALDI im folgenden Kapitel untersucht.

Nach der Abtrennung sämtlicher unlöslicher Proteine aus den Homogenaten der Se(+)-Ratten und Se(-)-Ratten durch die Zentrifugation wurden, wie bereits beschrieben, die Zytosole gewonnen. Deren Proteine wurden dann ebenfalls mit der NEPHGE aufgetrennt und mit der Proteomweaver-Software verglichen.



Graphiken 69 & 70: Diese beiden NEPHGE-Elektropherogramme zeigen die Proteinverteilungen in den Rattenzytosolen der Se(+)-Ratten (69 links) und der Se(-)-Ratten (70 rechts). Unterschiede in der Proteinexpression sind durch Kreise markiert.

In den NEPHGE-Gelen der Se(+)- und Se(-)-Zytosole konnten nur noch etwa 33 Spotpaare gefunden werden, die sich in ihrer Intensität ausreichend stark unterscheiden. Das Se(+)-Gel weist 17 Spots auf, die in ihrer Intensität höher sind als bei den Spots des Se(-)-Gels. Ein Spot mit der Molekularmasse von ca. 18. kDa und einem IP von 7,8 ist im Gel des Se(-)-Zytosols gar nicht zu sehen. Zwei Spots im Massenbereich von ca. 40 kDa, einem IP von 6,3 und 22 kDa und einem IP von 5,2 konnten in dem Se(-)-Zytosol gefunden werden, aber nicht in dem Se(+)-Zytosol. Diese Spots wurden auch in den Gelen der Gesamtprostata nicht gefunden, was darauf deutet, dass es sich um rein zytosolische Spots handelt, die in den Homogenaten in zu niedriger Konzentration vorliegen, als dass sie detektiert werden könnten.

Aus den Resultaten der Vergleiche der NEPHGE-Elektropherogramme der Homogenate (Graphiken 67 & 68) und der Zytosole (Graphiken 69 & 70) zeigt sich eine eindeutige Abhängigkeit der Proteinverteilung von dem Selenstatus. Der Selenmangel wirkt sich vor allem darin aus, dass Selenoproteine in geringerem Maß exprimiert werden.

#### **5.4.2. Analyse der vom Selenstatus abhängigen Proteine der Rattenprostata mittels MALDI-MS**

Die in den Graphiken 67 und 68 dargestellten NEPHGE-Elektropherogramme zeigen die Proteinaufspaltung von Rattenhomogenaten abhängig von ihrem Selenstatus. Vier Unterschiede in den Proteinverteilungen der Homogenate sind in diesen Graphiken besonders hervorgehoben (helle Kreise). Diese markieren die Spots, die für die Analyse mit der MALDI-MS ausgewählt wurden. Hierbei wurden jedoch die Proteinspots der Spotpaare ausgewählt, die stärker im jeweiligen Gel exprimiert waren, da eine hohe Proteinmenge die Erfolgchancen der Identifizierung der Proteine erhöht.

Die Proteine wurden mit Hilfe der Datenbank NCBI (National Center for Biotechnology Information) identifiziert, soweit sie in der Proteindatenbank vorhanden waren. Für die Suche nach weiteren Informationen zu den einzelnen Proteinen wurde der ExPASy (Expert Protein Analysis System) Proteomics-Server des Schweizer Instituts für Bioinformatik genutzt.

Die Analyse des ausgewählten Spots 4 ergab eine 34 %-ige Übereinstimmung der ermittelten Fragmente mit dem Selenoprotein cGPx 1 der Wanderratte (*Rattus norvegicus*). Die durch die MALDI-MS ermittelte Molekularmasse betrug 22,2 kDa und hatte einen IP von 7,66.

Es konnten sieben Massen von Peptiden ermittelt werden, die nahezu identische Massen haben wie Peptide aus der cGPx-Aminosäuresequenz.

Die ermittelten Massen wurden folgenden Peptiden zugeordnet:

Masse der Peptide (kDa)	entsprechende Aminosäuresequenz des Peptids
1655.85	VLLIENVASLCGTTTR
1957.92	YVRPGGGFEPNFTLFEK
2717.28	YVRPGGGFEPNFTLFEKCEVNGEK
1101.57	AHPLFTFLR
1207.53	YIIWSPVCR
1155.59	FLVGPDPVVR
1311.63	FLVGPDPVVR

Tabelle 6: In dieser Tabelle sind die durch die MALDI-MS ermittelten Peptidmassen mit den entsprechenden Aminosäuresequenzen abgebildet.

Diese Aminosäuresequenzen wurden mit der Sequenz der cGPx 1 aus der Datenbank verglichen und ergaben folgende Übereinstimmungen.

```

1 MSAARLSAVA QSTVYAFSAR PLAGGEPVSL GSLRGKVLLI ENVASLCGTT
51 TRDYTEMNDL QKRLGPRGLV VLGFPNCFG HQENKNEEI LNSLKYVRPG
101 GGFEPNFTLF EKCEVNGEKA HPLFTFLRNA LPAPSDDPTA LMTDPKYIIW
151 SPVCRNDISW NFEKFLVGPDPVVRYSRR FRTIDIEPDI EALLSKQPSN
201 P

```

Tabelle 7: Hier ist die Aminosäuresequenz der cGPx 1 der Wanderratte abgebildet. Die grau markierten Sequenzen entsprechen den durch die MALDI-MS ermittelten Sequenzen. Die schwarz markierten Sequenzen konnten nicht ermittelt werden.

Allerdings wurden auch 21 Massen ermittelt, deren Peptide nicht mit der angegebenen Sequenz übereinstimmen.

Durch den Antikörpertest in Kapitel 5.5 konnte die cGPx in der Prostata der Ratte nachgewiesen werden.

Die Analyse des Spotpaares 3 durch die MALDI-MS identifizierte dieses Protein, welches ähnlich der Carbonyl- Reduktase 3 (Cbr 3) der Maus (mus musculus) ist. Dieses Protein hat die berechnete Molekularmasse von 30,9 kDa mit einem IP von 6,15 (90, 91).

Die ermittelten Peptidmassen und deren apparente Aminosäuresequenzen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Masse der Peptide (kDa)	entsprechende Aminosäuresequenz des Peptids
1192.61	KFSGDVVLTAR
1064.62	FSGDVVLTAR
1467.67	AAVQQLQAEGLSPR
1935.00	KEYGGLNVLVNNAGIAFR
1806.88	EYGGLNVLVNNAGIAFR
1794.85	NVCTELLPIMKPHGR
1502.60	FVEDTKNEVHER
3002.73	TVEEGAETPVYLALLPPDATEPHGQLVR

Tabelle 8: In dieser Tabelle sind die durch die MALDI-MS ermittelten Peptidmassen, die nach dem Trypsinverdau des Proteins von Spot 3 gemessen wurden, mit den entsprechenden Aminosäuresequenzen abgebildet.

Diese acht Peptidsequenzen konnten auch in der Proteinsequenz der Cbr 3 aus der Maus wiederentdeckt werden. Es gibt eine Übereinstimmung von 35 %.

```

1  MSSCSRVALV TGANKGIGFA ITRDLCRKFS GDVVLTARDE ARGRAAVQQL
51  QAEGLSPRFH QLDIDDPQSI RALRDFLRKE YGGLNVLVNN AGIAFRMDDP
101 TPFDIQAEVT LKTNFFATRNVCTELLPIMK PHGRVVNISS LQGLKALENC
151 REDLQEKFRC DTLTEVDLVD LMKKFVEDTK NEVHEREGWP DSAYGVSKLG
201 VTVLTRILAR QLDEKRRADR ILLNACCPGW VKTDMARDQG SRTVEEGAET
251 PVYLALLPPD ATEPHGQLVR DKVVQTW

```

Tabelle 9: Hier ist die Aminosäuresequenz der Cbr 3 aus der Maus abgebildet. Die grau markierten Sequenzen entsprechen den durch die MALDI-MS ermittelten Sequenzen. Die schwarz markierten Sequenzen konnten nicht ermittelt werden.

Die anderen gefundenen Molekularmassen und deren apparenten Sequenzen konnten nicht in der Proteinsequenz wiedergefunden werden.

Als Vorstufe des Proteins Disulfid-Isomerase (PDI; protein disulfide-isomerase homolog P5 precursor) konnte das Protein, welches als Spot 2 im NEPHGE-Gel bezeichnet wurde, identifiziert werden (92, 93).

Trotz einer höheren Übereinstimmung der gemessenen Molekularmassen der Peptide mit einem anderen Protein, musste dieses Protein ausgeschlossen werden, da es sich um das Protein einer anderen Spezies handelt und nicht um ein Protein der Wanderratte.

Die gefundenen Molekularmassen der Peptide, die mit den Peptiden des PDI übereinstimmen, sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Masse der Peptide (kDa)	entsprechende Aminosäuresequenz des Peptids
2571.48	VGAVNADKHQSLGGQYGVQGFPTIK
1816.77	HQSLGGQYGVQGFPTIK
1163.52	NKPEDYQGGR
1386.57	TGEAIVDAALSALR
1854.77	TGEAIVDAALSALRQLVK
1527.64	LAAVDATVNQVLASR
1667.62	IFQKGESPVDYDGGGR
1151.49	GESPVDYDGGGR
2704.59	TCEEHQLCVVAVLPHILDTGATGR

Tabelle 10: In dieser Tabelle sind die durch die MALDI-MS ermittelten Peptidmassen, die nach dem Trypsinverdau des Proteins von Spot 2 gemessen wurden, mit den entsprechenden Aminosäuresequenzen abgebildet.

Mit einer Übereinstimmung von 24 % konnten die neun Peptidsequenzen in der Aminosäuresequenz des PDI Proteins wiedergefunden werden.

```

1  SCTFFLAVSA LYSSSDDVIE LTPSNFNREV IQSDSLWLVE FYAPWCGHCQ
51  RLTP EWKAA SALKDVVKVG AVNADKHQSL GGQYGVQGF TIKIFGANKN
101 KPEDYQGGRT GEAIVDAALS ALRQLVKDRL GGRSGGYSSG KQGRGDSSSK
151 KDVVELTDDT FDKNVL DSED VWMVEFYAPW CGHCKNLEPE WAAAATEVKE
201 QTKGKVKLAA VDATVNQVLA SRYGIKGFPT IKIFQKGESP VDYDGGRTS
251 DIVSRALDLF SDNAPPELL EIINEDI AKK TCEEHQLCVV AVLPHILDTG
301 ATGRNSYLEV LLKLADKYKK KMWGWLWTEA GAQYELENAL GIGGFYYPAM
351 AAINARKMKF ALLKGSFSEQ GINEFLRELS FGRGSTAPVG GGSFPNITPR
401 EPWDGKDGEL PVEDDIDLSD VELDDLEKDE L

```

Tabelle 11: Hier ist die Aminosäuresequenz der PDI aus der Ratte abgebildet. Die grau markierten Sequenzen entsprechen den durch die MALDI-MS ermittelten Sequenzen. Die schwarz markierten Sequenzen konnten nicht ermittelt werden.

Weitere 11 Massen von Peptiden konnten detektiert werden, jedoch konnten sie nicht in der Sequenz des PDI Proteins eingeordnet werden.

Die Zuordnung des Proteins, welches im NEPHGE-GEL als Spot 1 bezeichnet wurde, gestaltete sich schwieriger als bei den anderen drei ausgesuchten Spots, da sieben Proteine verschiedener Spezies eine gute Übereinstimmung mit den Peptidsequenzen hatten. Alle Proteine, die nicht von einem Nagetier stammen, wurden ausgeschlossen, so dass dieses Protein höchstwahrscheinlich der Vorläufer des endoplasmatische Retikulumproteins 99 oder das Tumor-Abwehr Antigen gp 96 der Maus ist, welches zwei verschiedene Namen des gleichen Proteins darstellen (95, 96).

Masse der Peptide (kDa)	entsprechende Aminosäuresequenz des Peptids
1785.79	EEEAIQLDGLNASQIR
1081.49	FAFQAEVNR
963.65	LIINSLYK
1544.65	ELISNASDALDKIR
2030.01	LISLTDENALAGNEELTVK
1187.54	SILFVPTSAPR
1015.49	GLFDEYGSK
1485.57	GVVDSDDLPLNVS
1139.48	LGVIEDHSNR
2250.06	FQSSHHSTDITSLDQYVER
1031.49	IYFMAGSSR
1047.47	IYFMAGSSR
1175.42	IYFMAGSSRK
1278.48	KEAESSPFVER
1150.44	EAESSPFVER
1119.42	FQNVAKEGVK
949.62	ESREATEK
1004.56	KTFEINPR
979.52	AYGDRIER

Tabelle 12: In dieser Tabelle sind die durch die MALDI-MS ermittelten Peptidmassen, die nach dem Trypsinverdau des Proteins von Spot 1 gemessen wurden, mit den entsprechenden Aminosäuresequenzen abgebildet.

16 Peptidsequenzen konnten nicht zugeordnet werden. Dafür stimmten die gefundenen Sequenzen zu 22 % überein mit der Proteinsequenz aus der Datenbank. Obwohl es sich hier nicht um die gleiche Spezies, sondern um Maus und Wanderratte handelt, stimmen die Sequenzen gut überein.

1	MRVLWVLGLC	CVLLTFGFVR	ADDEVVDVGT	VEEDLGKSRE	GSRTDDEVVQ
51	R <b>EEEAIQLDG</b>	<b>LNASQIRE</b> LR	EKSEK <b>FAFQA</b>	<b>EVNRMMKLI</b>	<b>NSLYK</b> NKEIF
101	LR <b>ELISNASD</b>	<b>ALDKIRLISL</b>	<b>TDENALAGNE</b>	<b>ELTVK</b>	IKCDK EKNLLHVTDT
151	GVMTREELV	KNLGTIAKSG	TSEFLNKMTE	AQEDGQSTSE	LIGQFGVGFY
201	SAFLVADKVI	VTSKHNNDTQ	HIWESDSNEF	SVIADPRGNT	LGRGTTITLV
251	LKEEASDYLE	LDTIKNLVRK	YSQFINFPIY	VWSSKTETVE	EPLEEDEAAK
301	EEKEESDDEA	AVEEEEEEEK	PKTKKVEKTV	WDWELMNDIK	PIWQRPSKEV
351	EEDEYKAFYK	SFSKESDDPM	AYIHFTAEGE	VTFK <b>SILFVP</b>	<b>TSAPRGLFDE</b>
401	<b>YGS</b> KSDYIK	LYVRRVFITD	DFHDMMPKYL	NFVK <b>GVVDS</b>	<b>DLPLNVS</b> RET
451	LQQHKLLKVI	RKKLVRKTLT	MIKKIADEKY	NDTFWKEFGT	NIK <b>LGVIEDH</b>
501	<b>SNR</b> TRLAKLL	<b>RFQSSHHSTD</b>	<b>ITSLDQYVER</b>	MKEKQDK <b>IYF</b>	<b>MAGSSRKEAE</b>
551	<b>SSPFVER</b> LLK	KGYEVIYLTE	PVDEYCIQAL	PEFDGKR <b>FQN</b>	<b>VAKEGVK</b> FDE
601	SEKTK <b>ESREA</b>	<b>TEKEFE</b> PLLN	WMKDKALKDK	IEKAVVSQRL	TESPCALVAS
651	QYGWSGNMER	IMKAQAYQTG	KDISTNYYAS	QK <b>KTFEINPR</b>	HPLIRDMLRR
701	IKEDEDDKTV	MDLAVVLFET	ATLRSGYLLP	DTK <b>AYGDRIE</b>	<b>RMLR</b> LSLNID
751	PEAQVEEPE	EEPEDTSEDA	EDSEQDEGEE	MDAGTEEEEE	ETEKESTEDK
801	EL				

Tabelle 13: Hier ist die Aminosäuresequenz der gp 96 aus der Maus abgebildet. Die grau markierten Sequenzen entsprechen den durch die MALDI-MS ermittelten Sequenzen. Die schwarz markierten Sequenzen konnten nicht ermittelt werden.

Dieses Protein ist auch unter dem Namen 94 kDa glucose-regulated protein (GRP 94) bekannt und hat eine Molekularmasse von 94 kDa und einem IP von 4,8. Es gehört zu den Hitzeschockproteinen bzw. den Chaperonen.

#### **Zusammenfassung von Kapitel 5.4. Proteinexpressionsunterschiede im Rattenprostataproteom in Abhängigkeit vom Selenstatus: Lokalisation und Identifizierung**

Die zweidimensionalen Groß-Gele der NEPHGE zeigten bis zu 2000 Proteinspots an. Der Vergleich des Groß-Gels des Se(+)-Rattenprostatahomogenats mit dem Gel des Se(+)-Rattenprostatahomogenat und der Vergleich des Gels des Se(-)-Rattenprostatazytosols mit dem Gel des Se(+)-Rattenprostatazytosols zeigte Unterschiede in der Expression einzelner Proteine.

Beim Vergleich der Gele des Se(+)-Homogenats mit dem Se(-)-Homogenat sind 42 Spotpaare gefunden worden, die sich signifikant unterscheiden, von denen 28 Spots in dem Se(+)-Homogenat stärker exprimiert vorkommen. Beim Vergleich des Gels des Se(+)-Zytosols mit dem Gel des Se(-)-Zytosols konnten nur noch 33 Spotpaare gefunden werden, die sich in der Expression deutlich unterscheiden. Davon sind 17 Spots stärker im Se(+)-Zytosol exprimiert.

Vier Spots, die sich beim Vergleich der NEPHGE-Gele der Homogenate zeigten und die deutliche Unterschiede in der Expression aufwiesen, wurden mit der MALDI-MS identifiziert. Jeder mit der MALDI-MS untersuchte Spot war schwächer oder gar nicht in dem Se(-)-Homogenat exprimiert. Es wurden nur Proteinspots des Gels von dem Se(+)-Homogenat mit der MALDI-MS untersucht, jedoch keine Spots von Gelen der Zytosole.

Der Spot 4 wurde als cGPx 1 der Wanderratte mit der MALDI bestimmt. Dieses Protein mit der angegebenen Molekularmasse von 22 kDa und einem IP von 7,66 stimmt ungefähr mit dem in dem NEPHGE-Gel gefundenen Wert überein. Die Fragmente des untersuchten Spots stimmten zu 34 % mit der Proteinsequenz der cGPx 1 überein.

Als ein der Carbonyl-Reduktase 3 verwandtes Protein der Maus wurde Spot 3 identifiziert. Die berechnete Molekularmasse von 30,9 kDa und einem IP von 6,15 dieses Proteins stimmt annäherungsweise mit der Fokussierung des untersuchten Spots überein. Trotz des Unterschiedes der Spezies zwischen Ratte und Maus konnte eine Übereinstimmung von 35 % erzielt werden.

Als Vorstufe der Proteins Disulfid-Isomerase konnte Spot 3 identifiziert werden. Die Übereinstimmung der Fragmente des untersuchten Spots mit der Aminosäuresequenz dieses Proteins liegt bei nur 24 %.

Noch geringer liegt die Übereinstimmung der Fragmente des letzten untersuchten Spots 1 (22 %) mit dem des zugeordneten Proteins, des Tumor-Abwehr Antigen gp 96. Andere Proteine

die eine höhere Übereinstimmung gehabt hätten scheiden wegen der Abstammung aus einer anderen Spezies aus.

Die vier Unterschiede in der Proteinexpression der NEPHGE-Elektropherogramme der Rattenprostatahomogenate konnten mit Hilfe der MALSDI-MS und dem Datenbankvergleich vier Proteinen zugeordnet werden. Andere auch untersuchte Spotpaare, die sich in den beiden Gelen unterschieden haben, wurden als Rattenkeratin, welches durch Verunreinigungen vor allem bei der Probenentnahme in die Probe gelangte, identifiziert. Die vier identifizierten Proteine waren die cytosolische Glutathionperoxidase 1, ein der Carbonyl-Reduktase 3 ähnliches Protein, eine Vorstufe des Proteins Disulfid-Isomerase und das Tumor-Abwehr Antigen 96. Die Aussagen hinsichtlich der Expression von cGPx, die in Kapitel 5.3 getroffen wurden, bestätigt werden. Die cGPx wird in den Se(-)-Ratten in wesentlich geringerer Konzentration exprimiert als bei den Se(+)-Ratten.

## **5.5. Detektion und Lokalisation von Spurenelementproteinen mittels Immunotests**

Nach den durchgeführten Analysen durch die INAA, AAS oder SEC-ICP-MS, wurde nachgewiesen, dass Selen und andere Spurenelemente in der Prostata enthalten und an Proteine gebunden sind. Durch Markierungsversuche mit Radioisotopen wie <sup>75</sup>Se konnten die Selenoproteine nachgewiesen werden und zum Teil charakterisiert werden. Für die Markierung anderer Spurenelementproteine konnten Versuche mit Radionukliden nicht angewendet werden, da die Metalle sich während der SDS-PAGE von den hierbei denaturierten Proteinen ablösten, wie es bei meinen Versuchen mit der SDS-PAGE herausgefunden wurde, deren Halbwertszeiten zu kurz waren um Analysen durchzuführen oder der Umgang mit einigen Isotopen stark reglementiert wurde.

Um zu überprüfen ob einige spurenelementgebundene Proteine in der Prostata vorhanden sind, wurden immunologische Tests durchgeführt bei denen Antikörper an die entsprechenden Proteine binden und sie sich dadurch nachweisen lassen. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden vier Selenoproteine (die cytosolische Glutathionperoxidase (cGPx), das Selenoprotein P (SeP), das saure 15 kDa-Selenoprotein und das Selenoprotein T (Sel T)) und vier Metalloproteine (die Superoxid dismutase (SOD), die Lysyl oxidase (LOX), das Dermatopontin (DPT) und das Metallothionein (MT)) untersucht.

Als Proben dienten drei Prostatagewebe von Se(+)-Ratten, die humane Karzinomzelllinie Du145 und, je nach zu untersuchendem Protein, Vergleichsgewebe von Herz, Leber oder Niere und die jeweiligen Reinproteine.

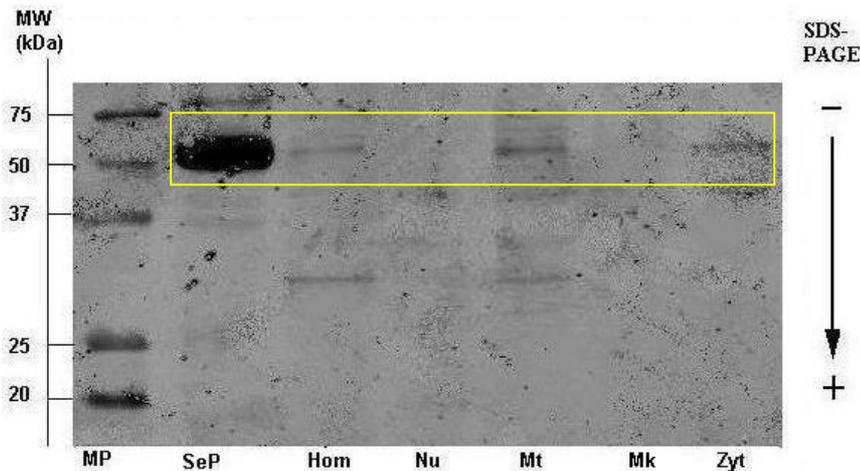
Nach der Auftrennung der Proteine in den subzellulären Fraktionen der Prostata mittels SDS-PAGE wurden die Proteine auf Nitrocellulose-Membranen im semi-dry Verfahren geblottet, mit Milch in PBS-Puffer geblockt und danach mit den jeweiligen Antikörpern für ca. 15 Stunden inkubiert. Um die Antikörper dann detektierbar zu machen, wurden sie mit fluoreszierenden Sekundärantikörpern inkubiert und anschliessend mit einem IR-Fluoreszenz-Scanner der Marke Odyssey verarbeitet und ausgewertet.

### **5.5.1. Immunologischer Nachweis von Selenoprotein P (SeP) in der Rattenprostata**

Das erste untersuchte Protein war das Selenoprotein P, welches vor allem im Blutplasma vorkommt. Es ist das einzige Selenoprotein, von dem bekannt ist, dass es mehr als einen Selenocysteinrest enthält (bei humanem SeP 10 SeCys; bei Ratten 12 SeCys (96)) und eine relative Masse von 57 kDa hat (97, 98, 99, 100). Die genaue Funktion dieses glycolysierten Selenoproteins ist nicht bekannt, aber man vermutet, dass SeP ein Transportprotein für Selen

ist oder in Redoxprozessen involviert ist (101, 102). Der hier benutzte Peptidantikörper ist sowohl für SeP aus der Ratte und als auch humanes SeP geeignet, was die Spezifität des Antikörpers ein wenig herabsetzt.

Die analysierte Blotmembran ist nachfolgend dargestellt und beschrieben.

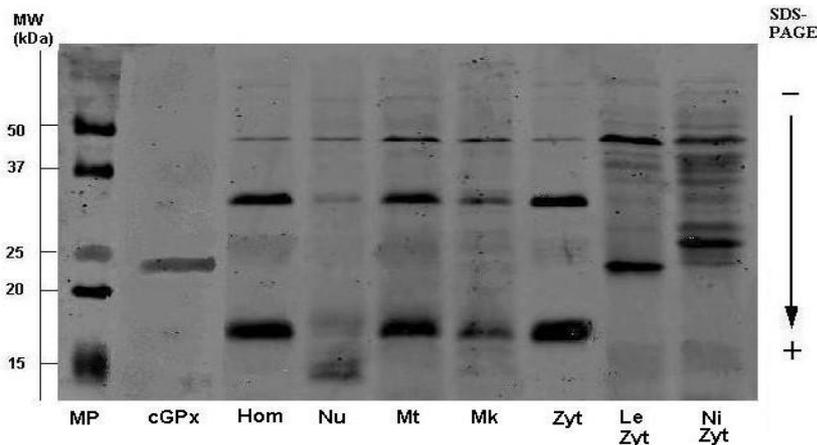


Graphik 71: Auf dieser Blotmembran wurden die subzellulären Bestandteile der Rattenprostata auf das Vorhandensein des SeP untersucht. Als Vergleich diente aus Humanplasma gewonnenes SeP. MP = Markerproteine; SeP = humanes SeP; Hom = Homogenat; Nu = Nuclei ; Mt = mitochondriale Fr.; Mk = Mikrosomale Fr.; Zyt = Zytosol

Der Antikörpertest zeigt eindeutig die Präsenz des Selenoproteins P in dem Homogenat, der mitochondrialen Fraktion und dem Zytosol. In der Kernfraktion und der mikrosomalen Fraktion konnte kein SeP nachgewiesen werden.

### 5.5.2. Immunologischer Nachweis von cGPx in der Rattenprostata

Ein weiteres oben in den Autoradiogrammen benanntes Protein ist die cytosolische Glutathionperoxidase (GPx). Sie wurde vor allem bei adäquater Selenzufuhr angezeigt. Die Funktion der cGPx ist eine essentielle, da sie für den Körper schädliche Peroxide, die bei der Energiegewinnung der Zelle entstehen, reduzieren kann (103) und dadurch entgiftet. Bei einer Molekularmasse von 23 kDa ist die GPx auf der Blotmembran nach der SDS-PAGE anzufinden. Der immunologische Test der Blotmembran mit den subzellulären Fraktionen der Rattenprostata auf die cGPx sieht wie folgt aus:

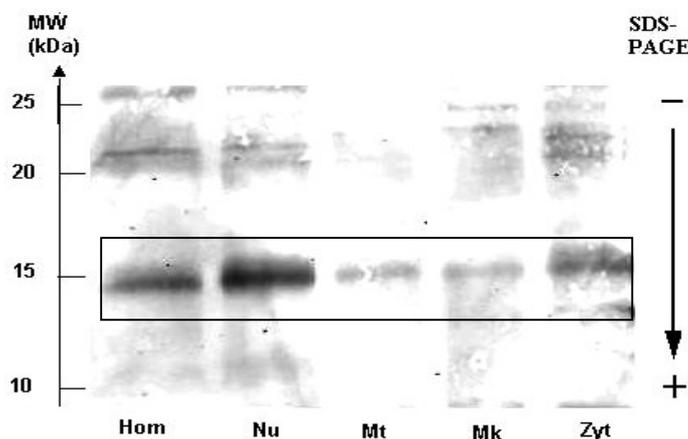


Graphik 72: Auf dieser Blotmembran wurden die subzellulären Bestandteile der Rattenprostata auf das Vorhandensein der cGPx untersucht. Als Vergleich dienten Zytosole aus Leber und Niere und das Reinprotein. MP = Markerproteine; cGPx = cGPx; Hom = Homogenat; Nu = nukleare Fraktion; Mt = mitochondriale Fr.; Mc = Mikrosomale Fr.; Zyt = Zytosol; Le = Leber; Ni = Niere

Der Antikörpertest auf cGPx zeigt eine Präsenz des Proteins bei einer Molekularmasse von ca. 23 kDa in allen untersuchten Fraktionen. Besonders stark war dieses Signal allerdings nur in den Vergleichsproben und nur sehr leicht in den einzelnen Fraktionen der Prostata zu finden. Es ist gut bekannt, dass polyclonale Antikörper wie der hier benutzte Antikörper keine sehr hohe Spezifität zeigen, so dass auch andere Proteine markiert wurden.

### 5.5.3. Immunologischer Nachweis des sauren 15 kDa-Selenoproteins in der Rattenprostata

In den vorangegangenen Autoradiogrammen wurden Spots im Bereich von ca. 15 kDa und einem sauren IP ermittelt. Da es sich dabei wahrscheinlich um das saure 15 kDa-Selenoprotein handelt, wurden die subzellulären Fraktionen der Prostata immunologisch auf dieses Selenoprotein untersucht. Der durchgeführte Immunotest zeigt folgendes Ergebnis:



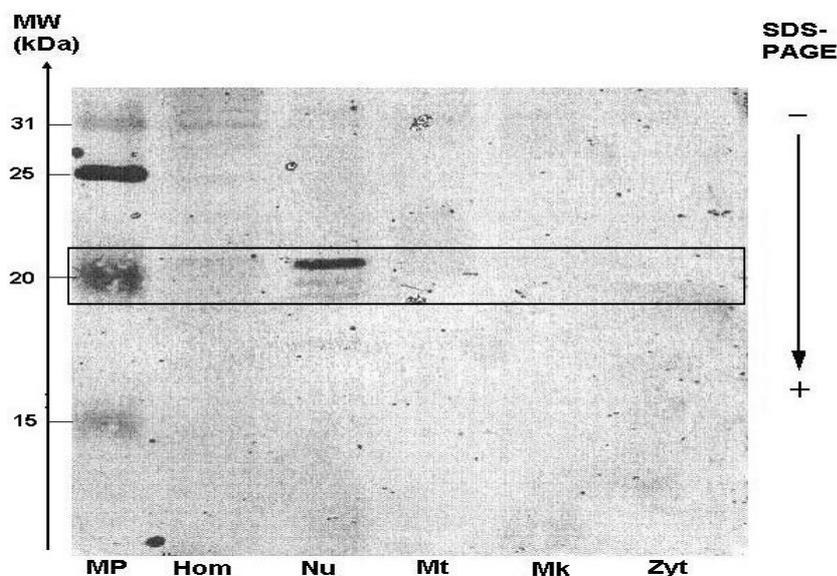
Graphik 73: Diese Blotmembran zeigt den Antikörpertest der subzellulären Fraktionen der Rattenprostata auf das saure 15-kDa-Selenoprotein. MP = Markerproteine; Hom = Homogenat; Nu = Nuklei; Mt = mitochondriale Fr.; Mk = Mikrosomale Fr.; Zyt = Zytosol; 15kDa-SP = 15-kDa-Selenoprotein

Bei ca. 15 kDa zeigt sich in allen untersuchten Fraktionen ein positives Signal des Antigen-Antikörper-Komplexes. Die stärksten Signale sind in dem Homogenat, den Nuklei und dem Zytosol zu finden. In den Fraktionen, die die Mitochondrien und Mikrosomen enthalten, sind nur schwache Signale erkennbar.

#### 5.5.4. Immunologischer Nachweis von Selenoprotein T (Sel T) in der Rattenprostata

Ein sehr wenig beschriebenes Protein ist das Selenoprotein T (Sel T). Es ist größtenteils im Endoplasmatischen Retikulum durch eine hydrophobe Domäne lokalisiert. Von diesem Selenoprotein, dessen Molekularmasse in der SDS-PAGE bei ca. 21 kDa liegt, ist keine genau Funktion bekannt, jedoch gibt es Berichte über den Zusammenhang zwischen der Konzentration von Sel T und der Kalziumkonzentration in Zellen (78, 104).

Der Immunotest der einzelnen subzellulären Fraktionen der Rattenprostata auf das Sel T zeigt folgendes Bild:



Graphik 74: Diese Blotmembran zeigt den Antikörpertest der subzellulären Fraktionen der Rattenprostata auf das Selenoprotein T mit einer Molekularmasse von 15 kDa.  
 MP = Markerproteine; Hom = Homogenat; Nu = Nuklei; Mt = mitochondriale Fr.; Mk = Mikrosomale Fr.; Zyt = Zytosol;

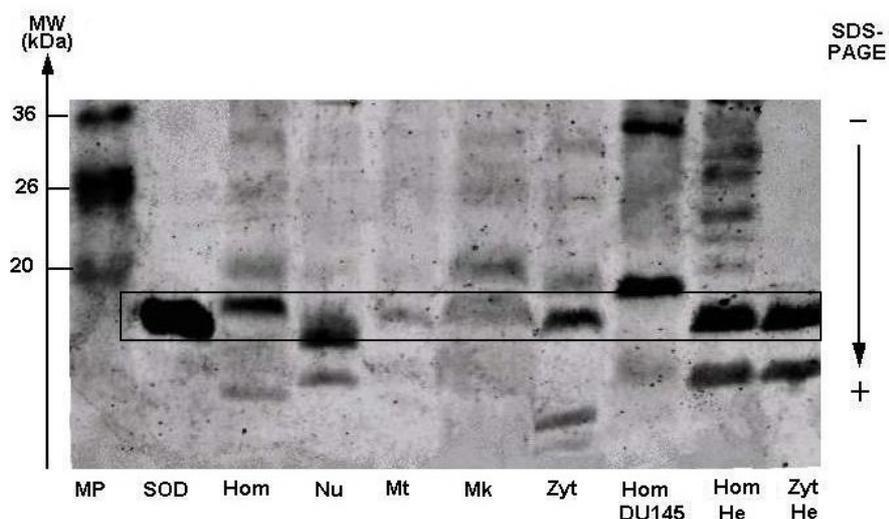
Die Blotmembran zeigt einen positiven Antikörpertest der Proben auf das Selenoprotein T, welches durch die Arbeitsgruppe SF6 des HMI isoliert wurde und den Antikörper gegen dieses Protein entwickelte. Nur im Homogenat und besonders in der Kernfraktion ist dieses Protein wiederzufinden. Die anderen Fraktionen zeigen keinen positiven Nachweis. Zwar werden in allen Fraktionen Proteine erkannt, aber nur in den besagten Fraktionen ist ein

Nachweis bei ca. 21 kDa zu erkennen. Die Erkennung anderer Proteine, außer dem Sel T, rührt daher, dass es sich bei dem benutzten Antikörper um einen nicht sehr sauberen polyclonalen Antikörper gehandelt hat.

### 5.5.5. Immunologischer Nachweis von Superoxid dismutase (SOD) in der Rattenprostata

Außer den Selenoproteinen wurden auch Metalloproteine in den subzellulären Fraktionen der Prostata nachgewiesen, wie z.B. das wichtige Metalloprotein ,die Superoxid dismutase, welche eine immens wichtige Funktion in den Zellen erfüllt. Die bei der Energiegewinnung in den Mitochondrien anfallenden schädlichen Superoxidradikale werden durch die SOD in Superoxide durch Reduktion umgewandelt. Zusammen mit der GPx und der Katalase wandelt die SOD für den Organismus sehr schädliche Superoxidradikale in Sauerstoff und Wasser um. Je nach Vorkommen der SOD enthält sie in ihren aktiven Zentren entweder Mangan oder Kupfer und Zink. Die Mangan bindende SOD (ca. 21 kDa) kommt in den Mitochondrien vor und die Cu/Zn-bindende SOD (ca. 16 kDa) im Zytosol vor (105).

Hier wurden die subzellulären Fraktionen der Prostata auf die Cu/Zn-bindende SOD untersucht, da hier die von der Arbeitsgruppe SF6 produzierten Antikörper gegen dieses Protein verwendet wurden.



Graphik 75: Dieser Antikörpertest zeigt den Nachweis von SOD(Cu/Zn) in den subzellulären Fraktionen der Rattenprostata und einigen Herzfraktionen zum Vergleich. MP = Markerproteine; Hom = Homogenat; Nu = Nuklei; Mt = mitochondriale Fr.; Mk = mikrosomale Fr.; Zyt = Zytosol; Du 145 = humane Prostatakarzinomzelllinie; He = Herz

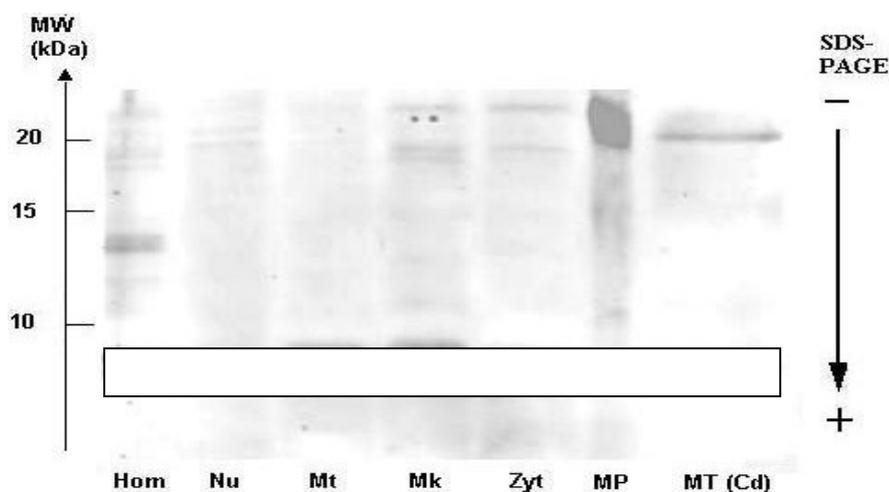
Der Antikörpertest zeigt eine positive Präsenz der SOD im Homogenat, in der mitochondrialen Fraktion, in der mikrosomalen Fraktion und besonders deutlich im Zytosol,

sowie in den Vergleichsfraktionen aus dem Herz. In der Kernfraktion konnte die SOD nicht gefunden werden.

Eine weitere vom Antikörper gut erkannte Bande zeigt sich im Homogenat der humanen Prostatakarzinomzelllinie Du145 bei einer Molekularmasse von ca. 20 kDa.

### 5.5.6. Immunologischer Nachweis von Metallothionein (MT) in der Rattenprostata

Ein Metalloprotein, welches verschiedene Metallionen binden kann, ist das Metallothionein. Das niedermolekulare cysteinreiche Metallothionein hat nicht nur eine Funktion als Metallionen-transporter, sondern dient auch als Radikalfänger für reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (106, 107). Die Molekularmasse des Metallothioneins liegt bei ca. 7 kDa. Die folgende immunologische Untersuchung der subzellulären Fraktionen der Prostata auf das Metalloprotein MT zeigt folgenden Antikörpertest.



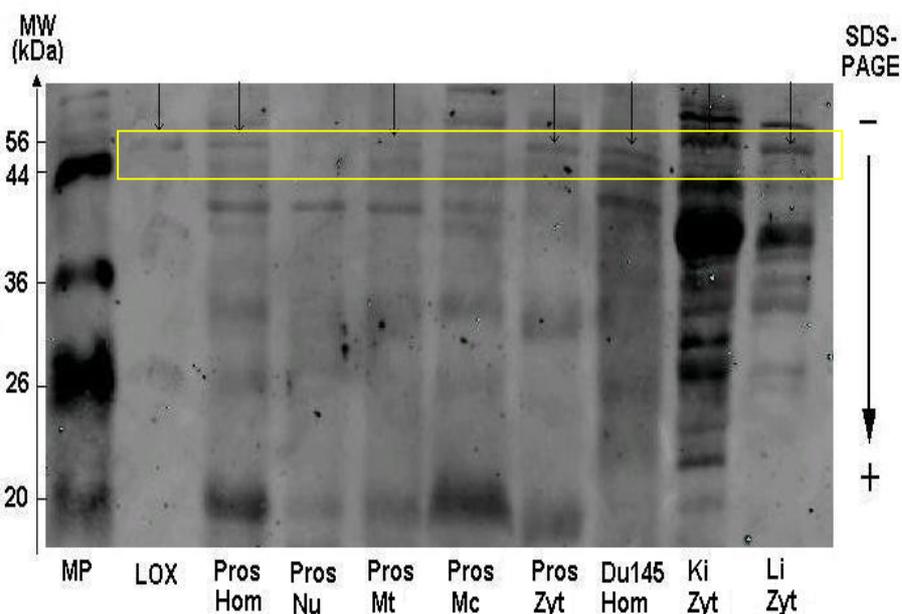
Graphik 76: Dieser Antikörpertest zeigt den Nachweis von MT in den subzellulären Fraktionen der Rattenprostata; MP = Markerproteine; Hom = Homogenat; Nu = Nuklei; Mt = mitochondriale Fr.; Mk = mikrosomale Fr.; Zyt = Zytosol;

Der Antikörpernachweis in den Proteinen der subzellulären Fraktionen der Prostata auf Metallothionein verlief positiv für das Homogenat, die mitochondriale Fraktion, die mikrosomale Fraktion und vor allem für das Zytosol. Es gibt kein erkennbares Signal für die Nuklei.

### 5.5.7. Immunologischer Nachweis von Lysyl oxidase (LOX) in der Rattenprostata

In der Prostata drüse laufen viele Redox-Prozesse ab, bei denen Reduktasen und Oxidasen beteiligt sind, die Metallionen enthalten. Ein gut untersuchtes Metalloprotein ist die Lysyl oxidase, die in ihrem aktiven Zentrum Kupfer bindet (108, 109). Da dieses Protein bislang nicht in der Prostata untersucht wurde, wurde dies im Rahmen dieser Arbeit erledigt. Dieses Protein ist dafür zuständig die Seitenkette von Peptidyl-lysin zu oxidieren. Dadurch ist erst eine Vernetzung von Collagen und Elastin möglich, welche für den Organismus essentiell ist. Die LOX besitzt eine ungefähre Molekularmasse von 47 kDa.

Auch auf dieses Protein wurden die Subzellulären Fraktionen der Rattenprostata untersucht und mit den Proteinen der humanen Karzinomzelllinie Du145 und den Zytosolen aus Leber und Nieren verglichen.



Graphik 77: Dieser Antikörpertest zeigt den Nachweis von LOX in den subzellulären Fraktionen der Rattenprostata im Vergleich zur humanen Prostatakarzinomzelllinie und den Zytosolen aus Nieren und Leber. MP = Markerproteine; Hom = Homogenat; Nu = nukleare Fraktion; Mt = mitochondriale Fr.; Mc = Mikrosomale Fr.; Zyt = Zytosol; Du 145 = humane prostatakarzinomzelllinie; Ki = Niere; Li = Leber

Dieser Antikörpernachweis zeigt im Molekularmassenbereich von ca. 47 kDa das Vorhandensein der LOX im Homogenat der Rattenprostata, der mitochondrialen Fraktion und den Zytosolen von Prostata, Leber und Nieren, sowie in dem Homogenat. Da die LOX ein membrangebundenes Protein ist, wurde sie wie zu erwarten in der mitochondrialen Fraktion

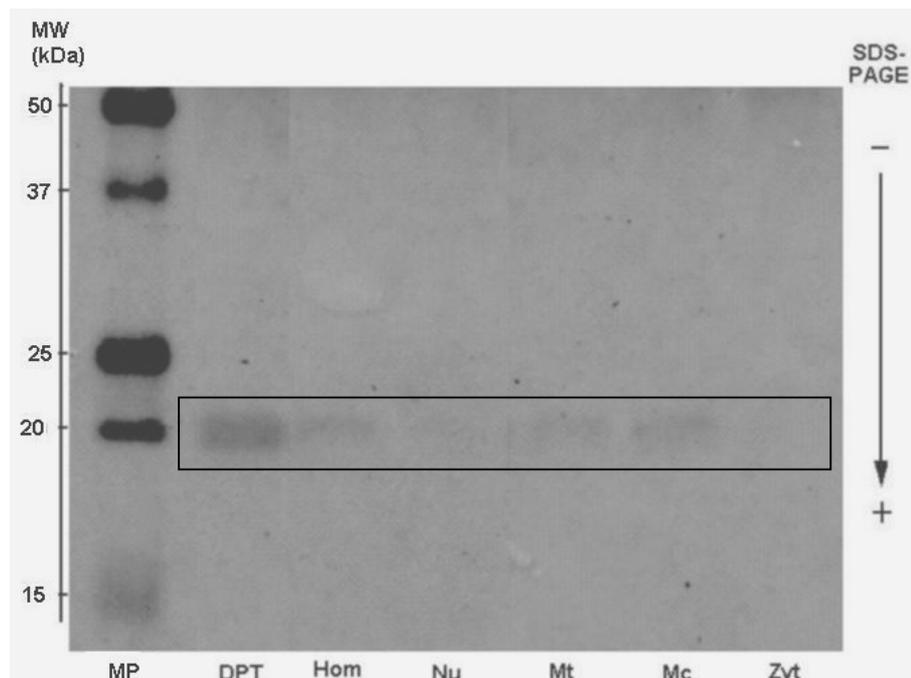
wiedergefunden. Neu ist die Tatsache, dass die LOX auch in dem Zytosol gefunden wurde, wo sie möglicherweise in Transportprozesse involviert ist.

### 5.5.8. Immunologischer Nachweis von Dermatopontin (DPT) in der Rattenprostata

Bei der Fraktionierung der LOX aus der Prostata und auch anderen Geweben wurde beobachtet, dass die LOX in einer engen Beziehung zu einem anderen Protein steht. Nach einer Reihe von Untersuchungen (s. Kapitel 5.6.) wurde das Protein von mir als Dermatopontin identifiziert.

Das Protein Dermatopontin, welches eine Molekularmasse von ca. 22 kDa hat, ist in seiner Funktion noch nicht genau beschrieben, aber es wird vermutet, dass es ein extrazelluläres Matrixprotein ist, welches in der Pathogenese der Prostata eine gewisse Relevanz zu haben scheint. Das auch als TRAMP ( tyrosine-rich acidic extracellular matrix protein) bezeichnete Dermatopontin wurde von mir in dem folgenden Kapitel näher untersucht und ist ein Kupfer bindendes Enzym.

Aus diesem Grund wurden auch die subzellulären Fraktionen der Prostata auf die Präsenz von DPT überprüft.



Graphik 78: Dieser Antikörpertest zeigt den Nachweis von DPT in den subzellulären Fraktionen der Rattenprostata MP = Markerproteine; Hom = Homogenat; Nu = nukleare Fraktion; Mt = mitochondriale Fr.; Mc = Mikrosomale Fr.; Zyt = Zytosol

Der Immunologische Test der subzellulären Fraktionen der Rattenprostata zeigte ein positives Ergebnis auf das Vorhandensein des kupferbindenden Proteins DPT im Homogenat, der

mitochondrialen Fraktion und der mikrosomalen Fraktion. In der Kernfraktion und dem Zytosol scheint kein DPT angezeigt zu werden, was die Angaben in der Literatur zu bekräftigen scheinen, wo es als Matrixprotein beschrieben wird. Es wird hier in dem Antikörpertest ein wenig unter der angegebenen Molekularmasse von 22 kDa detektiert.

### **Zusammenfassung des Kapitels 5.5. Detektion und Lokalisation von Spurenelementproteinen mittels Immunotests**

Mit Hilfe von immunochemischen Untersuchungen konnten mit spezifischen Antikörpern bestimmte spurenelementhaltige Proteine in den subzellulären Fraktionen der Rattenprostata identifiziert werden.

Die subzellulären Fraktionen der Rattenprostata und eine mit Selenoprotein P angereicherte Fraktion aus aufgereinigtem humanem Plasma, welche als Referenz diente, wurden immunologisch auf das Vorhandensein von Selenoprotein P untersucht. Der Antikörpertest zeigt am deutlichsten das Vorhandensein des Selenoproteins P in der Referenz. Aber auch in dem Homogenat, der mitochondrialen Fraktion und dem Zytosol der Rattenprostata konnte das SeP im Molekularmassenbereich von 57 kDa nachgewiesen werden.

Das Selenoprotein cGPx konnte ebenfalls in den subzellulären Fraktionen der Rattenprostata wiedergefunden werden. Die detektierten Banden bei 23 kDa waren jedoch nur sehr schwach zu erkennen im Gegensatz zu den Referenzen aus Rattenleberzytosol und Rattennierenzytosol, bei denen deutlichere Signale zu sehen waren.

Das saure 15 kDa-Selenoprotein konnte in allen subzellulären Fraktionen der Rattenprostata detektiert werden. Die deutlichsten Signale wurden im Homogenat, dem Zytosol und in den Kernen detektiert.

Auch das Selenoprotein T konnte in der Rattenprostata nachgewiesen werden. Es gab aber nur ein schwaches positives Signal im Homogenat und ein deutliches Signal in den Nuklei. Allerdings wurde es nicht bei 18 kDa sondern bei ca. 21 kDa detektiert.

Auch das Zink und Kupfer bindende Protein SOD konnte in einigen Fraktionen der Rattenprostata und als Referenz im Homogenat und Zytosol des Rattenherzens gefunden werden. Bis auf die Nuklein konnten alle untersuchten Fraktion positiv getestet werden. Besonders hohe Konzentrationen der SOD waren in dem Homogenat und dem Zytosol sowie den Referenzen zu finden. In der Zelllinie Du145 konnte statt der Cu/Zn-SOD die Mn-SOD detektiert werden.

Das Metalloprotein Metallothionein mit der Molekularmasse von 6 kDa wurde ebenfalls in allen subzellulären Fraktionen der Rattenprostata bis auf die Nuklei gefunden. Besonders

intensive Signale wurden im Homogenat, der mikrosomalen Fraktion und dem Zytosol detektiert.

Die Lysyl oxidase, die ein kupferbindendes Protein ist, hat eine Molekularmasse von 47 kDa und wurde im Homogenat der Rattenprostata sowie der Zelllinie Du145, der mitochondrialen Fraktion und dem Zytosol der Rattenprostata sowie den Zytosolen der Niere und der Leber detektiert. Die Detektion der LOX in den Zytosolen stellt eine neue Erkenntnis dar und wurde bisher nicht in der Literatur erwähnt.

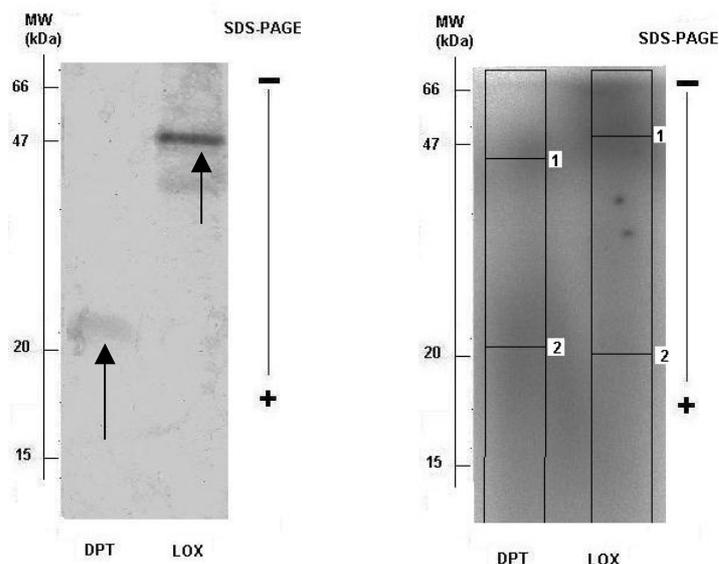
Auch das Kupfer bindende Protein Dermatoportun, welches eine Molekularmasse von 22 kDa besitzt, in dem Homogenat, der mitochondrialen Fraktion und der mikrosomalen Fraktion Nachgewiesen werden.

Insgesamt konnten vier Selenoproteine (SeP, Sel T, cGPx und das saure 15 kDa-Selenoprotein) sowie vier Metalloproteine (MT, DPT, LOX und SOD) in mindestens einer subzellulären Fraktion der Rattenprostata detektiert werden.

## 5.6. Identifizierung und Charakterisierung des Proteins Dermatopontin als kupferbindendes Protein

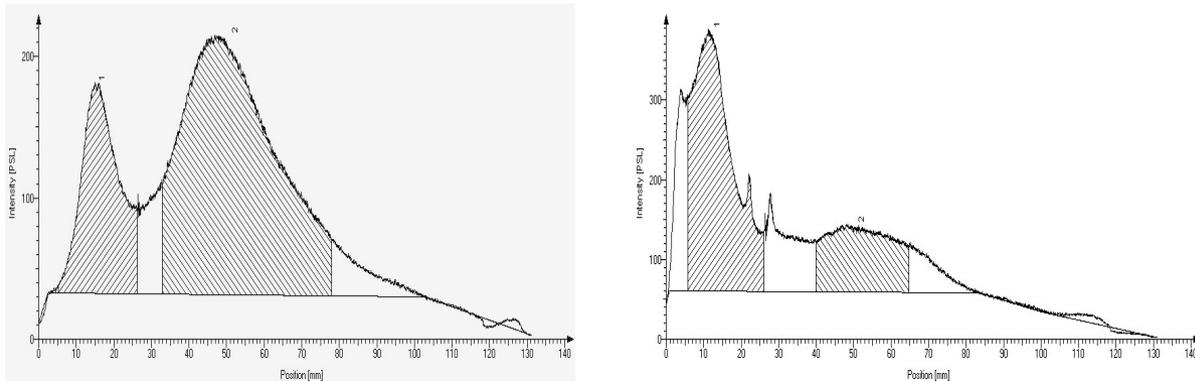
In Kapitel 5.5. wurde mit Hilfe der Immuntests nachgewiesen, dass sowohl das Dermatopontin als auch die Lysyl-oxidase in mindestens einer subzellulären Fraktion der Prostata vorhanden ist. Mittels DEAE Ionen-Austausch-Chromatographie konnte aus der Haut des Schweins eine Fraktion gewonnen werden, die das Dermatopontin in hoher Konzentration enthält (110). Aus der Aorta des Schweins konnte ebenfalls mit Hilfe der DEAE Ionen-Austausch-Chromatographie eine Fraktion mit hoher Lysyl oxidase- Konzentration gewonnen werden (111). Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Co-Aufreinigung beider Proteine zu beobachten ist (112).

Es konnte mit der AAS gezeigt werden, dass in beiden isolierten Fraktionen hohe Kupferkonzentrationen vorliegen (DPT = 79 µg/l; LOX = 156 µg/l). Durch die Dialyse beider Proteinfractionen gegen einen EDTA-Puffer [0,1 mol EDTA; 0,1 mol Tris-HCl (pH = 7,4)] konnte ein Großteil der Kupferionen aus den Fraktionen entfernt werden (DPT < 2 µg/l; LOX < 2µg/l). Daraufhin wurden beide Fraktionen mit <sup>64</sup>Cu beladen und anschliessend mit der SDS-PAGE aufgetrennt, um die daraus entstehenden SDS-Gele autoradiographisch zu untersuchen. Das Elektropherogramm beider Proteinfractionen und dessen Autoradiogramm sind folgend abgebildet. Das Autoradiogramm wurde zur Verdeutlichung der Banden mit erhöhter <sup>64</sup>Cu-Konzentration mit dem Programm Aida densitometrisch analysiert (Graphiken 81 & 82).



Graphiken 79 & 80: Das linke SDS-Gel zeigt die Auftrennung der Proteinfractionen von Dermatopontin und Lysyl-oxidase nach der SDS-PAGE. Das rechte Autoradiogramm zeigt wo das <sup>64</sup>Cu in den beiden Proteinfractionen gebunden vorliegt. Die mit dem Programm Aida digital ausgewerteten Spalten des Autoradiogramms sind durch Balken markiert. Die Stellen im Autoradiogramm mit erhöhter <sup>64</sup>Cu-Konzentration sind mit Ziffern durch das Programm angegeben.

Das Autoradiogramm zeigt nur sehr undeutlich, wo das  $^{64}\text{Cu}$  lokalisiert ist. Zur besseren Lokalisierung des  $^{64}\text{Cu}$  wurden folgende densitometrische Profile erstellt. Diese zeigen sehr deutlich wo das Autoradiogramm erhöhte  $^{64}\text{Cu}$ -Konzentrationen detektiert hat.



Graphiken 81 & 82: Hier sind die Profile für die Spalten des mit  $^{64}\text{Cu}$  markierten DPT ( links) und des mit  $^{64}\text{Cu}$  markierten LOX (rechts) dargestellt, die das Programm Aida erstellt hat. Beide Profile zeigen jeweils zwei Banden mit erhöhter  $^{64}\text{Cu}$ -Konzentration an. Diese Stellen wurden auf das Autoradiogramm (Graphik 80) übertragen und sind als Markierungen (Ziffern) kenntlich gemacht.

Die Autoradiogramme der SDS-Gele mit den aufgetrennten und  $^{64}\text{Cu}$ -markierten Proteinfractionen zeigen jeweils zwei Banden von kupferbindenden Proteinen. Es zeigt sich, dass beide Banden im Molekularmassenbereich von ca. 20-25 und 45-50 kDa. Diese beiden Banden entsprechen den Banden des DPT und der LOX (113, 114) .

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die LOX als auch das DPT kupferbindend sind und dass beide Proteine eine enge Bindung zueinander haben.

Dieses Ergebnis wurde erstmalig erzielt.

## **6. Diskussion der Ergebnisse**

Spurenelemente sind essentiell für die Gesundheit und Entwicklung von Säugetieren. Viele dieser Spurenelemente liegen proteingebunden vor. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte die biologische Relevanz einiger Spurenelemente im Organismus und speziell in der Prostata drüse geklärt werden. Der qualitative und quantitative Nachweis von Spurenelementen in der Prostata war Teil dieser Arbeit. Des Weiteren sollte der Einfluss des Spurenelements Selen auf die Konzentrationen anderer Spurenelemente und auf die Expression spurenelementbindender Proteine in der Prostata überprüft werden. Selenoproteine und selenhaltige Proteine werden am stärksten vom Selenstatus in der Prostata drüse beeinflusst, aber auch andere Proteine sind in ihrer Expression vom Selenstatus abhängig. Einige Selenoproteine und Metalloproteine konnten in der Prostata nachgewiesen werden durch immunochemische Untersuchungen.

### **Diskussion zur Spurenelementanalyse**

Die INAA gilt unter den benutzten drei Analysemethoden in ihrer Handhabung als diejenige mit der geringsten Kontamination, da die Probenaufbereitung vergleichsweise einfach ist und in unseren Laboren routinemäßig durchgeführt wird. Trotz dessen sind Kontaminationen nicht vollständig vermeidbar gewesen, weil bei der Prostataentnahme aus den Versuchstieren erfahrungsgemäß immer Kontaminationen auftreten, obwohl ständig mit geeigneten Instrumenten gearbeitet wurde. Für bestimmte Elemente wie das Eisen oder Zink sind die angegebenen Daten nur mit einer gewissen Fehlertoleranz zu betrachten.

Da die Prostata gut durchblutet ist, befindet sich in der Prostata drüse viel gebundenes Eisen im roten Blutfarbstoff Hämoglobin. Die Entfernung sämtlicher Blutgefäße aus den Proben war nicht möglich, so dass der Unterschied zwischen den Eisenkonzentrationen der Se(+)-Prostata und der Se(-)-Prostata auf den unterschiedlichen Erfolg die Blutgefäße zu beseitigen zurückzuführen ist.

Es ist sehr schwierig für das Element Zink sehr genaue Konzentrationen zu bestimmen, da das Zink in der Umwelt in verschiedener Form vorliegt und die Proben dadurch leicht kontaminationsanfällig sind, was allgemein bekannt ist. Es ist trotzdem wahrscheinlich, dass die Unterschiede bei der Bestimmung der Zinkkonzentrationen in den Se(+)-Prostatas und Se(-)-Prostatas vom Selenstatus abhängen, da Selen Einfluss auf die Expression von zinkbindenden Proteinen haben könnte. Weitergehende Untersuchungen zu diesem interessanten Thema konnten aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden.

Auch die hohen Schwankungen der Einzelwerte bei der Bestimmung der Mangankonzentration innerhalb der beiden untersuchten Gruppen mit unterschiedlicher Diät, lässt eine vollkommene Sicherheit über den Einfluss von Selen nicht zu, aber die Tendenz zeigt, dass Selen bzw. die Selenoproteine einen positiven Einfluss auf die Expression von manganhaltigen Proteinen ausüben.

Das Element Rubidium ist nicht an Proteine gebunden, weshalb es auch keinen Einfluss durch Selen oder Selenoproteine geben kann, was man daran sieht, dass sich die Rubidiumkonzentrationen der beiden Gruppen nur innerhalb der Fehlertoleranz unterscheiden.

Da sich die INAA-Werte für die Elemente Chrom, Kobalt und Cäsium der beiden unterschiedlich mit Selen versorgten Rattengruppen nicht unterscheiden, hat Selen keinen Einfluss auf die Inkorporation dieser Elemente in der Rattenprostata.

Auf Grund dessen, dass mit der INAA keine Konzentrationen für Kupfer und Cadmium bestimmt werden konnten, wurden zusätzlich Spurenelementgehaltsbestimmungen mit der ICP-MS und der AAS vorgenommen, um für diese beiden Elemente Konzentrationen angeben zu können und für Selen, Mangan und Arsen die Konzentrationsangaben zu bestätigen.

Die Bestimmungen der Spurenelementkonzentrationen mit Hilfe der AAS und der ICP-MS bestätigten im Wesentlichen die Resultate, die durch die INAA gewonnen wurden.

Die Kupfer- und Cadmiumkonzentrationen, die durch die AAS ermittelt wurden, zeigten keine Unterschiede zwischen Se(+)-Prostatas im Vergleich zu den Se(-)-Prostatas. Im Vergleich zu den INAA-Messungen, konnte zumindest für die Se(-)-Prostatas eine Arsenbestimmung vorgenommen werden. Die Bestimmung der Arsenkonzentrationen mit der ICP-MS zeigte, dass in beiden Proben Arsen enthalten ist, aber höhere Arsenwerte bei den Se(-)-Prostatas als bei den Se(+)-Prostatas gemessen wurden, was auch in der Literatur erwähnt wird (115). Arsen ist dem Selen und dem Schwefel in seinen Eigenschaften relativ ähnlich ist, weshalb es möglich ist, dass das Arsen anstatt von Schwefel oder Selen in Proteine eingebaut werden kann. Besonders Proteine die einen gewissen Anteil an nicht spezifisch gebundenem Schwefel in Form von Methionin haben, könnten Arsen einbauen. Es ist bekannt, dass Methionin wahlweise Selen oder Schwefel einbaut. Daher liegt die Vermutung nahe, dass diese Aminosäure auch Arsen einbauen könnte. Da in den Se(+)-Tieren der Selengehalt hoch ist, ist die Wahrscheinlichkeit kleiner, dass Arsen inkorporiert wird als bei den Se(-)-Tieren, wo der Selengehalt fast um den Faktor 100 niedriger ist.

Beim Vergleich der mit der AAS gemessenen Spurenelementkonzentrationen in den Zytosolen mit den aufgeschlossenen Proben aus der gesamten Prostata fiel auf, dass alle

Spurenelementkonzentrationen in den Zytosolen verringert waren, was vermutlich durch eine höhere Verdünnung der Zytosole hervorgerufen wurde.

Bei den Messungen der Elemente in den Prostatazytosolen mit der AAS zeigte sich eine höhere Mangankonzentration in den Se(+)-Prostatazytosolen im Vergleich zu den Se(-)-Prostatazytosolen, was bedeuten könnte, dass die Selenkonzentration den Mangangehalt beeinflusst. Des Weiteren fiel auf, dass die Cadmiumkonzentrationen in beiden Zytosolen deutlich über den Cadmiumkonzentrationen beider Aufschlüsse der ganzen Prostata lag. Es scheint, als ob der größte Teil des Cadmiums im Zytosol vorlag. Da Cadmium ein giftiges Spurenelement ist, ist es möglich, dass dieses Element im Zytosol durch bestimmte Proteine gebunden wird und aus der Zelle transportiert wird, um eine Schädigung der Zellorganellen durch das Cadmium zu verhindern, wie in der Literatur berichtet wird (116,117,118).

### **Diskussion zu den Chromatographisch-analytischen Untersuchungen**

Die Profile aus den Messungen der gekoppelten SEC mit der ICP-MS zeigten, dass die untersuchten Spurenelemente im Zytosol proteingebunden vorliegen. Die Angabe der Molekularmassen der metallbindenden Proteine in den Fraktionen ist nicht sehr genau, da die Säule mit einzelnen globulären Proteinen kalibriert wurde. Allerdings liegen die Proteine im Zytosol als Gemisch vor und sind teilweise nicht globulär.

Es konnte gezeigt werden, dass in den Zink-, den Kupfer-, den Cadmium-, den Arsen- und den Eisenprofilen Unterschiede zwischen beiden vom Selengehalt abhängigen Zytosolen der Rattenprostata in mindestens einer metallbindenden Proteinfraction zu erkennen ist. Dabei bewirkte ein Selenmangel eine Erhöhung der Metallkonzentration in mindestens einer Fraktion der Elemente: Eisen, Zink und Arsen und eine Verringerung für Kupfer, Nickel und Cadmium. Keinen Einfluss hatte der Selenstatus auf die in den Zytosolen vorkommenden Kobalt-, Mangan- und Zinnproteine.

Es ist möglich, dass diejenigen Proteine, die in den Se(-)-Zytosolen in geringeren Mengen vorhanden sind, Selenoproteine oder andere von Selen abhängige Proteine benötigen, um normal exprimiert zu werden. Andererseits scheint es, dass diejenigen metallhaltigen Proteine, die stärkere Signale in den Profilen der Se(-)-Zytosole zeigen, deshalb verstärkt exprimiert werden, um Funktionen derjenigen Proteine zu übernehmen, die durch den Selenmangel weniger exprimiert werden.

Die Profile der mit verschiedenen Metallen inkubierten Zelllinie Du145 zeigen im Allgemeinen weniger metallhaltige Proteine aber dafür stärkere Signale als die Profile der Proteine in den Rattenzytosolen. Dieses liegt daran, dass wahrscheinlich zu viel von der Metalllösung zugegeben

wurde, da nicht abschätzbar war, wie viel von den Metalllösungen durch das Nährmedium der Zelllinie absorbiert wird und der Zelllinie zur Verfügung steht. Deshalb wäre es möglich, dass einige schwächere Signale in den Profilen der Du145 von den stärkeren Signalen überdeckt sind. Nur die Nickel- und Manganprofile der untersuchten Rattenprostatazytosole und der Zelllinienzytosole zeigen Ähnlichkeiten. Bei den anderen vier (Cd, Co, Cu, Zn) verglichenen Profilen der Rattenprostatazytosole und der Zelllinienzytosole zeigte sich ein immenser Unterschied.

Hierbei spielen neben der unterschiedlichen Intensität der Peaks auch der Speziesunterschied und mit Sicherheit der Zustand der Zellen eine Rolle.

Während bei den Kobalt inkubierten Du145-Zellen im Vergleich zu den Rattenprostatazytosolen nur die Intensität eines Peaks verstärkt wurde (wahrscheinlich durch ein unspezifisch Metallionen bindendes Protein), scheinen die mit anderen Metallionen inkubierten Du145-Zellen einen drastischen Unterschied im Metabolismus entwickelt zu haben. Dieser Unterschied im Proteinmetabolismus kann daran liegen, dass es sich zum einen um gesunde bzw. Karzinomzellen handelt oder dass der Metabolismus von Mensch und Ratte in dieser Hinsicht unterschiedlich ist. Das Cadmiumprofil der Zelllinie zeigte von allen untersuchten Profilen die höchsten Intensitäten. Es scheint so, als ob eine Anreicherung von Cadmium in den Karzinomzellen stattfindet, was den Literaturangaben (119,120, 121) entspricht. Eine genauere Aussage könnte durch die Untersuchung von Prostatazytosolen aus humanen Biopsien und aus Karzinomzelllinien der Rattenprostata nicht getroffen werden. Beides konnte aus Sicherheitsgründen (möglicherweise mit Papillomaviren kontaminierte Rattenzelllinien) oder Probleme der Beschaffung innerhalb dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

Die Dünnschnitte der Organe aus den mit verschiedenen Radiotracer markierten Ratten zeigten, dass vor allem in der Epithelschicht die Radiotracer angereichert sind. Da vor allem die Epithelschicht gegen äußere Einflüsse wie reaktive Sauerstoffspezies anfällig ist, ist es möglich, dass Proteine, die Mangan und Selen binden und redoxaktiv sind, genau dort lokalisiert sind, um diese schädigenden Einflüsse unschädlich zu machen.

### **Diskussion zu den biochemischen Trennverfahren und der Autoradiographie**

Die Autoradiogramme der eindimensional aufgetrennten Proteine in den Homogenaten von mit <sup>75</sup>Se-markierten Rattenorganen zeigten je Homogenat eine unterschiedliche Verteilung von Selenoproteinen. Vier Selenoproteine konnten in allen Homogenaten, wenn auch in zum Teil stark variierenden Konzentrationen, in allen Organen wiedergefunden werden. Diese Resultate

stimmen mit den Ergebnissen früherer Arbeiten überein (122). Diese Proteine sind die cGPx, die PHGPx, das SeP und das saure 15 kDa-Selenoprotein. Von den beiden Peroxidasen ist bekannt, dass sie die Zellen vor reaktiven Sauerstoffspezies schützen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch das SeP und das saure 15 kDa-Selenoprotein eine für jede Zelle notwendige Funktion haben, die aber für beide Proteine noch unbekannt ist. Andere Selenoproteine, die nur in bestimmten Organen vorkommen, scheinen organspezifische Funktionen zu haben.

Die Autoradiogramme der eindimensional aufgetrennten Proteine in den subzellulären Fraktionen der Prostata zeigten, dass Proteinbanden im Molekularmassenbereich der cGPx, PHGPx und des sauren 15 kDa-Selenoproteins in allen subzellulären Fraktionen vorhanden sind. Andere Selenoproteine waren nur in bestimmten Fraktionen vorhanden und in anderen Fraktionen nicht. In der eindimensionalen Auftrennung der subzellulären Fraktionen der Rattenprostata konnte kein großer Unterschied zwischen der Se(+)-Prostata und Se(-)-Prostata festgestellt werden. Auf Grund dessen wurde die sensitive 2D-Elektrophorese durchgeführt.

In den Autoradiogrammen der aufgetrennten Proteine mittels IEF und SDS-PAGE aus den vom Selenstatus abhängigen Homogenaten der Rattenprostata konnten den Proteinen: Selenoprotein P (58 kDa), Deiodinase I (27 kDa), cGPx (22 kDa), pl-GPx (25 kDa), PHGPx (20 kDa), saures 15-kDa-Selenoprotein und neutrales 15-kDa-Selenoprotein eindeutig Spots zugeordnet werden.

Das Selenoprotein P trat in allen Fraktionen auf, jedoch am stärksten in dem Zytosol. Da es als extrazelluläres Protein gilt, ist das verstärkte Vorkommen in dem Zytosol zu erwarten und bestätigt die Vermutungen in der Literatur, dass das Selenoprotein P ein Transportprotein darstellt (123).

Das in allen Fraktionen dominierende saure 15-kDa-Selenoprotein wird in der Literatur als Protein erwähnt, das am häufigsten in den Endoplasmatischen Retikuli (ER) anzufinden ist. In den gewonnenen subzellulären Fraktionen befinden sich die ER in der mikrosomalen Fraktion und den Nuclei. In den Autoradiogrammen der 2D-Elektropherogramme zeigte sich das saure 15-kDa-Selenoprotein am stärksten in den Nuclei und der mikrosomalen Fraktion. Dieses Protein soll zusammen mit dem Glycoprotein Glucosyltransferase (UGTR) interagieren, von dem bekannt ist, dass es eine Rolle in der Proteinfaltung als Transportprotein spielt (124).

Die PHGPx ist ein membrangebundenes und zytosolisches Protein, dessen Funktion der Schutz der Zellorganellen durch reaktive oxydative Spezies (ROS) zugeschrieben wird (125). Dadurch, dass dieses Protein in die Mitochondrien eingeschleust wird, ist auch dort eine erhöhte Anwesenheit des Proteins, wie in den Autoradiogrammen gezeigt wird. Auch in den Autoradiogrammen der mikrosomalen Fraktionen war eine besonders starke Ausprägung dieses

Proteins zu beobachten, was nicht verwunderlich ist, da sich in dieser Fraktion viele Membranen befinden.

Die Wirkungen der Selendiäten zeigten eine Hierarchie der einzelnen Selenoproteine auf, was durch Behne et al. Bereits gezeigt wurde (36, 37). So wird die cGPx in den Autoradiogrammen der Se(+)-Ratte sehr stark angezeigt, wohingegen die cGPx in der Se(-)-Ratte in sehr geringen Mengen vorkommt. Dies zeigt, dass andere Selenoproteine bevorzugt mit Selen versorgt werden und die cGPx in der Hierarchie der Selensupplementation eine untergeordnete Rolle spielt (36). Dieser Verlust der cGPx-Aktivität wird durch andere antioxidative Proteine ausgeglichen, um einen Schutz der Zellen zu gewährleisten. Dies erklärt die erhöhte Konzentration der PHGPx in den selenunterversorgten Tieren, da die PHGPx eine ähnliche Funktion wie die cGPx hat. Daher wurde die PHGPx in den Autoradiogrammen der selenunterversorgten Ratte in höheren Konzentrationen angefundenes als in den der Se(+)-Ratte. Das zeigt die übergeordnete Position der PHGPx gegenüber der cGPx in der Selensupplementation.

Die von Behne et al. beschriebene Hierarchie der Selenoproteine bei Selenmangel konnte dadurch bestätigt werden.

### **Diskussion zu den Proteinexpressionsunterschieden im Rattenprostataproteom in Abhängigkeit vom Selenstatus**

Die mit bloßem Auge und dem Programm Proteomweaver entdeckten Spots von den Homogenaten der Se(+)-Prostata und der Se(-)-Prostata in den Groß-Gelen der NEPHGE wurden auf Unterschiede in der Expression einzelner Proteine zwischen den beiden Gelen untersucht. Es konnten 44 Spotpaare entdeckt werden, die sich in ihrer Intensität unterscheiden. Vier Spots mit deutlich unterschiedlichen Intensitäten konnten mit Hilfe der MALDI-MS als cGPx1, Carbonyl-Raduktase 3, Vorstufe der Disulfid-Isomerase und als Tumor-Abwehr Antigen 96 identifiziert werden. Drei weitere Spots mit deutlichen Expressionsunterschieden wurden durch die MALDI-MS als Rattenkeratin identifiziert. Ob von den anderen Spots mit unterschiedlicher Intensität auch einige darunter sind, die ebenfalls Formen von Keratin darstellen, ist unbekannt.

Die cGPx1, die Cbr 3, sowie die Vorstufe der PDI konnten mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit identifiziert werden. Bei der gp96 gab es eine etwas geringere Übereinstimmung der durch die MALDI-MS erhaltenen Fragmente mit der Aminosäuresequenz der gp96 aus der Datenbank. Trotz höherer Übereinstimmung der ermittelten Fragmente mit Aminosäuresequenzen anderer Proteine als der gp96, konnten andere Proteine ausgeschlossen werden, da sie anderen Spezies angehörten.

### **Diskussion zu den Immunochemischen Untersuchungen:**

Es konnten mit Hilfe immunochemischer Tests die Selenoproteine SeP, Sel T, cGPx und saures 15 kDa-Selenoprotein sowie die Metalloproteine SOD, MT, DPT und LOX in den subzellulären Fraktionen der Prostata detektiert werden.

Bei der immunochemischen Detektion des SeP fiel auf, dass dieses Protein nur im Homogenat, der mitochondrialen Fraktion und dem Zytosol zu finden ist. Es kann gesagt werden, dass das SeP in Transportprozessen zwischen den Mitochondrien und dem extrazellulären Raum beteiligt ist, was in der Literatur bereits angedeutet wurde (123). Das könnte erklären, warum in den Mitochondrien mehr SeP gefunden wird als im Zytosol, wo es synthetisiert wird. Andererseits ist es möglich, dass das SeP ubiquitär anzufinden ist und die Empfindlichkeit der Methode nicht ausreichte, um das SeP in anderen subzellulären Fraktionen zu detektieren.

Die cGPx ist ein ubiquitäres Protein, das in allen subzellulären Zellbestandteilen wieder gefunden wurde, was durch die Autoradiogramme gezeigt wurde. Die nur sehr schwache Präsenz in den Prostataprobe n erklärt sich vor allem durch die nicht ausreichende Proteinmenge, die beim Blotten übertragen wurde. Jedoch wurde bestätigt, dass die höchste Konzentration an cGPx im Vergleich zu anderen Organen in der Leber zu finden ist.

Die von Korotkov (124) dokumentierten Ergebnisse, dass das saure 15 kDa-Selenoprotein am stärksten in den Endoplasmatischen Retikuli (ER) konzentriert ist, konnten bestätigt werden. Das gefundene starke Signal in der Kernfraktion kann eventuell durch das Haften der Kerne an den ER erklärt werden. Da dieses Protein am zweitstärksten in dem Zytosol wiedergefunden wurde, zeigt dies, dass dieses Protein im Zytosol synthetisiert wird und von dort in andere Zellorganellen transportiert wird. Die Signale in der mikrosomalen und der mitochondrialen Fraktion könnten von Kontaminationen von Zytosol in den Fraktionen stammen.

Dass das Sel T in den Kernen wiedergefunden wurde, liegt an der Tatsache, dass die Nuklei und die ER aneinander hafteten. Diese Untersuchung bestätigt die Aussagen von Grumolato (78), dass es sich beim Sel T um ein ausschliesslich am ER lokalisiertes Protein handelt.

Das Metallothionein konnte in allen subzellulären Fraktionen, ausser in den Kernen, der Prostata detektiert werden. Im Molekularmassenbereich von 6-8 kDa zeigten sich bei allen Fraktionen der Prostata Doppelbanden, was auf zwei Isoformen dieses Proteins schliessen lässt. In den Fraktionen, in denen das MT detektiert wurde, wurde auch bei ca. 20 kDa das MT detektiert, welches ein Trimer des MT sein könnte.

Im Falle der Antikörpertests zur Detektion der SOD war der Antikörper nicht so spezifisch, dass er die SOD(Mn) von der SOD(Cu/Zn) unterscheiden konnte, da sowohl die mitochondriale Fraktion als auch das Zytosol eine eindeutige positive Präsenz anzeigten. Die Anwesenheit der SOD in der mikrosomalen Fraktion deutet auf eine Kontamination durch die Fraktionen der Mitochondrien und des Zytosols hin. Eine neue Erkenntnis durch diesen Antikörpertest wurde für die humane Prostatakarzinomzelllinie Du145 gewonnen. Die Mangan-bindende SOD, mit einer Molekularmasse von ca. 21 kDa, konnte als besonders intensives Signal wiedergefunden werden, wohingegen die Cu/Zn-SOD nicht detektiert wurde.

Da die Prostata auch Bindegewebe enthält, wie es in allen Organen mit einem gewissen Anteil an Muskelgewebe so ist, sollte das Enzym LOX auch in der Prostata detektiert werden. Die LOX scheint allerdings ihre enzymatische Aktivität im Zytosol zu haben, von wo aus das oxydierte Peptidyl-lysin in den extrazellulären Raum befördert wird. Auch in der Zelllinie Du145 scheint sich eine feste Struktur zu bilden (s. Graphik 77 in Kapitel 5.5), die durch Collagen gebunden scheint, da auch hier die LOX in veritabler Konzentration vorkam.

Da die LOX auch in den Zytosolen der Vergleichsorgane gefunden wurde, scheint sich die Vermutung über den Ort der Wirkung der LOX in der Zelle zu bestätigen.

Nur in den festen Kompartimenten der Zelle, wie den Nuklei, der mitochondrialen und der mikrosomalen Fraktion konnte das Protein DPT gefunden werden, was vermuten lässt, dass es sich bei der DPT um ein matrixgebundenes bzw. membrangebundenes Protein handelt.

Zusammenfassend konnte die Präsenz der Selenoproteine cGPx, SeP, SeT und saures 15-kDa-Selenoprotein nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der immunochemischen Untersuchungen der Selenoproteine ergänzen sich sehr gut mit den Untersuchungen zu den <sup>75</sup>Se-markierten Proteinen der Autoradiogramme nach der zweidimensionalen Elektrophorese. Darüber hinaus konnten die Kupfer bindenden Proteine SOD, MT, sowie erstmalig das Enzym LOX und das Protein DPT in der Prostata nachgewiesen werden. Die Präsenz von Dermatopontin in der Prostata wurde bisher von anderen Autoren nicht beschrieben.

Eine Kombination von geblotteten 2D-Gelen mit den immunochemischen Tests scheitert daran, dass die übertragenen Proteinmengen auf die Blotmembran zu gering waren, um sie mit den Antikörpern detektieren zu können.

## 7.0. Zusammenfassung

Die durchgeführten Experimente und die daraus gewonnenen Ergebnisse dieser Arbeit sind der Prostata-drüse, einem Organ dessen Krankheitsgrad in den letzten Jahren stark gestiegen ist, gewidmet.

Hierfür wurden analytische und biochemische Methoden sowie Verfahren der Immunchemie angewendet. Mit Hilfe der INAA wurde der Gehalt der Spurenelemente Se, Mn, As, Zn, Fe, Cr, Co, Sb und Rb in der Prostata von Laborratten unter Berücksichtigung des Selenstatus der Versuchstiere untersucht. Mit den beiden Methoden AAS und ICP-MS wurden die Konzentrationen der Elemente Se, Mn, As, Cd und Cu bestimmt. Durch den Vergleich der gemessenen Elementgehalte, zeigte sich ein deutlicher Einfluss (As-Konzentration steigt bei abnehmender Se-Konzentration) von Se auf As. Der Se-Einfluss auf die Gehalte von Zn und Fe war gering. Bei den anderen untersuchten Elementen konnte kein eindeutiger Se-Einfluss festgestellt werden. Festgestellt wurde aber, dass jede der drei verwendenden Methoden nur für bestimmte Elemente geeignet ist, jedoch die INAA als eine Multielementbestimmungsmethode zuerst angewendet werden sollte.

Durch die online- Kopplung der Größenausschlusschromatographie (SEC) mit der induktiv gekoppelten Plasmamassenspektroskopie (ICP-MS) wurden zuerst die Proteine in den Prostatazytosolen von Ratten mit unterschiedlichem Selenstatus und in dem Zytosol der humanen Prostatazelllinie Du145 mit Hilfe der SEC fraktioniert und anschliessend die in den Proteinen enthaltenen Elemente mittels Massenspektroskopie bestimmt. Die aus den Messungen der Rattenprostatazytosole gewonnenen chromatographischen Profile von Se, Zn, Cu, As, Co, Mn, Ni, Fe, Sn und Cd weisen darauf hin, dass alle untersuchten Elemente proteingebunden vorliegen. Die Zytosole der Zelllinie Du145 wurden hingegen auf die Elemente Zn, Cu, Mn, Ni, Cd und Co überprüft, mit denen die Zelllinie Du145 vorher einzeln inkubiert wurde. Dabei zeigten die chromatographischen Profile auch, dass diese Elemente proteingebunden vorliegen. As, Cu, Fe, Mn, Se und Zn sind bekannt als essentielle Bausteine von vielen redox aktiven Enzymen sind. Erstmals wurden Co, Ni, und Sn in den Prostatazytosolen detektiert. Durch diese Resultate liegt der Verdacht nah, dass diese Elemente auch Bestandteile bisher nicht identifizierter Proteine sind.

Die mikroskopisch untersuchten Zellen der Zelllinie Du 145 zeigten nach der Inkubation mit den einzelnen Elementen im Vergleich zu den Kontrollzellen eine verminderte Wachstumsrate, was daran liegt, dass diese Elemente in dieser Konzentration ohne zusätzliche Zugabe von Selen toxisch für die Zellen sind.

Durch in vivo Markierungen von Ratten mit unterschiedlichem Selenstatus mit <sup>75</sup>Se konnten Selenoproteine nach der Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE und anschliessender

Autoradiographie in den Homogenaten und den subzellulären Fraktionen (Nuklei, mitochondriale Fraktion, mikrosomale Fraktion und Zytosol) identifiziert werden. Dabei wurden sowohl in den Homogenaten der Se(+)-Tiere als auch in den Homogenaten der Se(-)-Tiere im Molekularmassenbereich zwischen 10 kDa und 70 kDa alle Selenoproteinbanden gefunden, wohingegen in den subzellulären Fraktionen und Zytosolen die Verteilung der Selenoproteinbanden von Organell zu Organell unterschiedlich war. Mit Hilfe der 2D-Elektrophorese wurden sowohl in den Homogenaten als auch in den Zytosolen die Selenoproteine bestätigt und durch eine sehr gute Aufspreizung der Proteinbanden mit IP-Werten zwischen 3,5 und 9,0 und Molekularmassen zwischen 10 kDa und 80 kDa eindeutig detektiert.

Die Analyse der Proteinexpression in den Homogenaten der Se(+)- und Se(-)-Tiere mittels des dafür geeigneten Computerprogramms Proteomweaver lieferte 42 Proteinexpressionsunterschiede. 28 dieser Proteinspots im Se(+)-Homogenat waren signifikant stärker exprimiert als im Se(-)-Homogenat. Im Zytosol gab es 33 unterschiedlich exprimierten Proteinspots, wovon 17 im Se(+)-Zytosol signifikant stärker exprimiert sind als im Se(-)-Zytosol. Mittels tryptischer Spaltung einiger Proteinspots (1-4) aus dem Se(+)- Homogenat und der Bestimmung der Massen einiger Peptide durch die Massen-Spektrometrie (MALDI-MS) wurden die Proteine cGPx, Carbonylreduktase 3, Disulfid-Isomerase und Tumor-Abwehr Antigen gp 96 durch den Vergleich mit den theoretischen Daten der Peptide/Proteine identifiziert. Eine Identifizierung weiterer Proteinspots konnte in dieser Arbeit nicht mehr dokumentiert werden.

Durch immunochemische Untersuchungen wurden metallhaltige Proteine und Selenoproteine in den Homogenaten und den subzellulären Fraktionen der Prostata von normal ernährten Ratten und im Homogenat der Zelllinie Du145 detektiert. Die verwendeten Antikörper, gerichtet gegen bestimmte Proteine zeigten positive Signale für die Selenoproteine SeP, Sel T, cGPx und das saure 15 kDa-Selenoprotein, das ein prostataspezifisches Protein ist, sowie für die metallhaltigen Proteine MT, LOX, SOD und für das erstmalig identifizierte Cu-bindende Protein Dermatopontin.

Mittels chromatographischer Verfahren wurde das bekannte Protein Dermatopontin aus der Schweinehaut aufgereinigt und Antikörper gegen dieses Protein produziert, die für die Erkennung des Proteins in den Prostatafraktionen eingesetzt wurden. Durch die Produktion von  $^{64}\text{Cu}$ , das im Reaktor BER II (HMI) hergestellt wurde, wurden die isolierten Proteine LOX und Dermatopontin mit  $^{64}\text{Cu}$  inkubiert und anschließend mit der SDS-PAGE aufgetrennt. Mittels Autoradiographie wurde der gebundene Tracer in beiden Proteinbanden identifiziert. Das bestätigte unsere Theorie, dass Dermatopontin ein Cu-bindendes Protein ist und für das Enzym LOX, einem Cu-bindenden Protein mit dem es co-eluiert wird, eine Funktion als Cu- Lieferant hat.

## 7.1. Summary

The experiments carried out in this thesis and the results obtained in this way are concerned with the prostate gland, an organ that during the last years has been increasingly affected by diseases. For this purpose analytical, biochemical methods and immunohistochemical procedures have been applied.

By means of INAA the contents of the trace elements As, Co, Cr, Fe, Mn, Rb, Sb, Se and Zn were determined in the prostate and prostate cytosol of laboratory rats with a different selenium status.

AAS and ICP-MS have been used to measure the concentration of the elements As, Cd, Cu, Mn and Se. The comparison of the data showed an inverse relationship between Se and As (The As concentration increased with decreasing Se levels). There was only a slight effect of the Se status on the contents of Fe and Zn, and no effect was observed with regard to the other elements investigated. Each of the methods applied was best suited to the determination of certain elements, but INAA as a method for multielement analysis was the most versatile procedure and should be applied in the first place.

The proteins in the prostate cytosols of the rats with different selenium status and in the human prostate cell line Du145 were separated by size exclusion chromatography (SEC). By online coupling of the HPLC with the inductively plasma mass spectrometry (ICP-MS) the elements in the protein fractions were then determined by mass spectrometry. The chromatographic profiles obtained in this way for As, Co, Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, Sn and Zn in the rat prostate cytosols indicate that all these elements were bound to proteins. In case of the human cell line Du145 Cd, Cu, Mn, Ni, Sn and Zn were analysed in the cytosolic fractions after the cells had been incubated separately with these elements. The chromatographic profiles demonstrated that these elements were likewise bound to proteins. As, Cu, Fe, Mn, Se and Zn are known to be essential components of many redox enzymes. The elements Co, Ni and Sn were detected for the first time in the prostate cytosol. The results suggest that these elements may be components of proteins not yet identified.

The investigation by light microscopy showed a decreased growth rate of the cells incubated with the different elements as compared with the control cells. This is understandable as these elements are slightly toxic in these concentrations without additional selenium supplementation.

Experiments on rats with different selenium status labelled *in vivo* with  $^{75}\text{Se}$  led to the identification of selenoproteins in the homogenates and in the nuclear, mitochondrial, microsomal and cytosolic fractions by separation of the proteins by means of SDS-PAGE in these samples and determination of selenium in the proteins by means of autoradiography. In the Se(+)-animals as

well as in the Se(-)-animals all selenoproteins present in the molecular mass range between 10 and 70 kDa were detected, whereas the distribution of the selenoprotein bands in the subcellular fractions and cytosols differed from micro organelle to micro organelle. The 2D-electrophoresis with a very good resolution for the protein bands with PI-values between 3.5 and 9.0 and molecular masses between 10 kDa and approximately 80 kDa then allowed the accurate identification of these selenoprotein bands.

The analysis of the protein expression in the homogenates of the Se(+)- and Se(-)-animals by using an appropriate computer program called Proteomweaver showed 42 differences in the expressed protein spots. 28 of these protein spots were expressed significantly stronger in the Se(+)- homogenate than in the Se(-)-homogenate. In the cytosol were 33 proteins differently expressed whereas in Se(+)-cytosol 17 proteins were expressed significantly stronger than in the Se(-)-cytosol. By tryptic fragmentation of some proteins spots (1-4) of the Se(+)-homogenate, determination of the masses of several peptides by MALDI-MS and comparison with the theoretical data for the peptides or proteins the proteins cGPx, carbonyl reductase 3, disulfid-isomerase and the tumor rejection antigen gp96 were identified. The identification of some further proteins could not be completed in time to be included in this thesis.

By means of immunochemical investigations several metal-containing proteins and selenoproteins were detected in the homogenate and in subcellular fractions of the prostate of adequately fed rats and in the homogenate of the prostate cell line Du145. The used antibodies adjusted against defined proteins, showed positive signals for the selenoproteins Sel P, Sel T, cGPx and the acid 15 kDa-selenoprotein, which is a specific prostatic protein as well as for the metal-containing proteins MT, LOX, SOD and for dermatopontin, a protein which for the first time was identified as a Cu-containing protein.

By application of chromatographic procedures the known protein dermatopontin was purified from pork skin and antibodies against this protein were produced which were applied in the detection of this protein in several fractions of the prostate. After production of <sup>64</sup>Cu in the BER II (HMI), the isolated proteins LOX and dermatopontin, proteins, treated with EDTA prior to the incubation, were incubated with <sup>64</sup>Cu and separated by SDS-PAGE. The protein-bound tracer was then determined in both proteins by autoradiography.

The result confirmed our hypothesis that dermatopontin may be a Cu-binding protein and suggests that dermatopontin is a Cu-supplier for the Cu-Enzyme LOX, a Cu-binding protein which co-eluates with Dermatopontin.

## Literatur

01. **Ekmekcioglu C;**  
"Spurenelemente auf dem Weg ins 21. Jahrhundert - zunehmende Bedeutung von Eisen, Kupfer, Selen und Zink".  
*Journal für Ernährungsmedizin* **2000**, 2, (2 (Ausgabe für Österreich)), 18-23.
02. **Cohen AM, Teitelbaum A, Miller E, Ben-Tor V, Hirt R, Fields M;**  
"Effect of copper on carbohydrate metabolism in rats"  
*Isr J Med Sci.* **1982** Aug;18(8):840-4
03. **Davies IJ, Musa M, Dormandy TL;**  
"Measurements of plasma zinc. I. In health and disease"  
*J Clin Pathol.* **1968** May;21(3):359-63
04. **FH Nielsen, Myron DR, Givand SH, Zimmerman TJ, Ollerich DA;**  
"Nickel deficiency in rats"  
**J Nutr.** 1975 ; **105: 1620-1630**
05. **Nicoloff G, Angelova M, Christova I, Nikolov A, Alexiev A;**  
"Serum cobalt in children with essential hypertension"  
*Am J Hum Biol.* **2006** Nov-Dec;18(6):798-805
06. **Prasad AS, Oberleas D, Rajasekaran G;**  
"Essential micronutrient elements. Biochemistry and changes in liver disorders"  
*Am J Clin Nutr.* **1970** May;23(5):581-91
07. **Schroeder HA, Frost DV, Balassa JJ;**  
"Essential trace metals in man: selenium"  
*J Chronic Dis.* **1970** Oct;23(4):227-43
08. **Tait GH, Vallee BL;**  
"Studies on the active center of alkaline phosphatase of *E. coli* "  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* **1966** Oct;56(4):1247-51
09. **Behne D, Kyriakopoulos A,**  
"Mammalian Selenium-Containing Proteins".  
*Annual Reviews Nutrition* **2001**, 21, 453-473.
10. **Berbel P, Obregón MJ, Bernal J, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G;**  
"Iodine supplementation during pregnancy: a public health challenge"  
*Trends Endocrinol Metab.* **2007** Nov;18(9):338-43. Epub 2007 Oct 24
11. **Bertelsmann H, Kuehbacher M, Weseloh G, Kyriakopoulos A, Behne D;**  
"Sperm nuclei glutathione peroxidases and their occurrence in animal species with cysteine-containing protamines"  
*Biochim Biophys Acta.* **2007** Oct;1770(10):1459-67. Epub 2007 Jul 27

12. **Debrus S, Rahbani L, Marttila M, Delorme B, Paradis P, Nemer M;**  
*"The Zinc Finger-Only Protein Zfp260 Is a Novel Cardiac Regulator and a Nuclear Effector of (alpha)1-Adrenergic Signalling"*  
*Molecular Cell Biology* **2005**, 25, (19), 8669-8682
13. **Robb EL, Page MM, Wiens BE, Stuart JA;**  
*"Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD"*  
*Biochem Biophys Res Commun.* **2007** Dec 31 [Epub ahead of print]
14. **Holleman AF, Wiberg E,**  
*"Lehrbuch der Anorganischen Chemie".*  
 101. Auflage; Walter de Gruyter: Berlin, **1995**
15. **Bertelsmann-Stiftung**  
*Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine-Klinische Aspekte und chemische Analyse;*  
 Verlag Bertelsmann Stiftung Gütersloh, **1997**
16. **Expert group on Vitamins and Minerals [EVM] 2002**
17. **Rangerjan ES, Asinas A, Proteau A, Munger C, Baardsnes J, Iannuzzi P, Matte A, Cygler M;**  
*"Structure of [NiFe]-Hydrogenase Maturation Protein Hyp E from e. coli and its interaction with Hyp F"*  
*J. Bacteriol.* Dez. **2007** online
18. **Mäki JM, Sormunen R, Lippo S, Kaarteenaho-Wiik R, Soininen R, Myllyharju J;**  
*"Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues"*  
*Am J Pathol.* **2005** Oct;167(4):927-36.
19. **Lucero HA, Kagan HM;**  
*"Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function"*  
*Cell Mol Life Sci.* **2006** Oct; 63(19-20):2304-16.
20. **Rucker RB, Rucker BR, Mitchell AE, Cui CT, Clegg M, Kosonen T, Uriu-Adams JY, Tchapanian EH, Fishman M, Keen CL;**  
*"Activation of chick tendon lysyl oxidase in response to dietary copper"*  
*J Nutr.* **1999** Dec;129(12):2143-6.
21. **Millhauser GL;**  
*"Copper Binding in the Prion Protein"*  
*Accounts of Chemical Research*, 37: 79-85, **2004**
22. **Morante S, González-Iglesias R, Potrich C, Meneghini C, Meyer-Klaucke W, Menestrina G, Gasset M;**  
*"Inter- and intra-octarepeat Cu(II) site geometries in the prion protein: implications in Cu(II) binding cooperativity and Cu(II)-mediated assemblies"*  
*J Biol Chem.* **2004** Mar 19;279(12):11753-9.

23. **Stefanidou M, Maravelias C, Dona A, Spiliopoulou C;**  
 “Zinc: a multipurpose trace element”  
*Arch Toxicol.* **2006** Jan;80(1):1-9. Epub 2005 Sep 27
24. **Kang YJ, Zhou Z;**  
 “Zinc prevention and treatment of alcoholic liver disease”  
*Mol Aspects Med.* **2005** Aug-Oct;26(4-5):391-404.
25. **Tseng CH;**  
 “Blackfoot disease and arsenic: a never-ending story”  
*J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* **2005**;23(1):55-74
26. *Handbook of Chemistry and Physics, 85. Editon CRC Verlag*
27. **Lü J, Jiang C;**  
 “Selenium and cancer chemoprevention: hypotheses integrating the actions of selenoproteins and selenium metabolites in epithelial and non-epithelial target cells”  
*Antioxid Redox Signal.* **2005** Nov-Dec;7(11-12):1715-27
28. **Regitz-Zagrosek V, Kyriakopoulos A, K. Pleissner P, Jungblut P, Fleck E, Behne D;**  
 "Effects of selenium deficiency on the rat myocardial protein pattern - investigation by two dimensional gel electrophoresis".  
*Basic Research in Cardiology* **2000**, 95, (3), 199-207.
29. **Yang C, Niu C, Bodo M, Gabriel E, Notbohm H, Wolf E, Müller PK;**  
 "Fulvic acid supplementation and selenium deficiency disturb the structural integrity of mouse skeletal tissue. An animal model to study the molecular defects of Kashin-Beck disease".  
*Biochemical Journal* **1993**, 289, (3), 829-835.
30. **Köhrle J;**  
 "Selenium and the control of thyroid hormone metabolism"  
*Thyroid* **2005**, 15, (8), 841-853
31. **Köhrle J;**  
 "The trace element selenium and the thyroid gland"  
*Biochimie* **1999**, 81, (5), 527-533
32. **Stadtman TC;**  
 “Selenocysteine”  
*Annu Rev Biochem.* **1996**;65:83-100. Review.
33. **Böck A;**  
 “Incorporation of selenium into bacterial selenoproteins: selenium in biology and human health”  
*New York, Springer Verlag* **1994** S. 9-24
34. **Berry MJ, Martin GW 3rd, Low SC;**  
 “RNA and protein requirement for eukaryotic Selenoprotein synthesis”  
*Biomed Environ Sci.* 1997 Sep;10(2-3):182-9

35. **Kyriakopoulos A, Behne D;**  
*"Selenium-Containing Proteins in Mammals and other Forms of Life"*  
 1. Auflage; Springer-Verlag: Berlin, **2002**
36. **Behne D, Hilmert H, Scheid S, Gessner H, Elger W;**  
*"Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins"*  
*Biochim Biophys Acta.* **1988** Jul 14;966(1):12-21
37. **Behne D, Kyriakopoulos A, Scheid S, Gessner H;**  
*"Effects of chemical form and dosage on the incorporation of selenium into tissue proteins in rats".*  
*J Nutrition* **1991**, 121, (6), 806-814.
38. **Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG;**  
*"Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase"*  
*Science.* **1973** Feb 9;179(73):588-90
39. **Flohe L, Günzler WA, Schock HH;**  
*"Glutathione Peroxydase: a selenoenzyme"*  
*FEBS Lett.* **1973** May 15;32(1):132-4
40. **Ursini F, Maiorino M, Gregolin C;**  
*"The selenoenzyme phospholipid hydroperoxyde glutathion peroxidase",*  
*Biochim Biophys Acta.* **1985** Mar 29;839(1):62-70
41. **Grasdaka PY, Berggren MM, Berry MJ, Powis G;**  
*"Cloning, sequencing and functional expression of a novel human thioredoxin reductase"*  
*FEBS Lett.* **1999** Jan 8;442(1):105-11
42. **Sun QA, Wu Y, Zappacosta F, Jeang KT, Lee BJ, Hatfield DL, Gladyshev VN;**  
*"Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases"*  
*J Biol Chem.* **1999** Aug 27;274(35):24522-30
43. **Behne D, Kyriakopoulos A, Meinhold H, Köhrle J;**  
*"Identification of type Iodothyronine 5'-deiodase as a selenoenzyme"*  
*Biochem Biophys Res Commun.* **1990** Dec 31;173(3):1143-9.
44. **Salvatore D, Bartha T, Harney JW, Larsen PR;**  
*"Molecular biological and biochemical characterization of a human type II selenodeiodinase",*  
*Endocrinology.* **1996** Aug;137(8):3308-15
45. **Croteau W, Whittemore SL, Schneider MJ, St Germain DL;**  
*"Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine Deiodinase"*  
*J Biol Chem.* **1995** Jul 14;270(28):16569-75

46. **Guimares MJ, Peterson D, Vicari A, Cocks BG, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Ferrick DA, Kastelein RA, Bazan JF, Zlotnik A;**  
*"Identification of a novel SelD homolog from eukaryotes, bacteria and archea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism?"*  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* **1996** Dec 24;93(26):15086-91
47. **Kyriakopoulos A, Bertelsmann H, Graebert A, Hoppe B, Kühbacher M, Behne D;**  
*"Distribution of an 18 kDa-selenoprotein in several tissues of the rat"*,  
*J Trace Elem Med Biol.* **2002**;16(1):57-62
48. **Gladyshev VN, Jeang KT, Wootton JC, Hatfield DL;**  
*"An new human selenium-containing protein. Purification, characterization and cDNA sequence"*,  
*J Biol Chem.* **1998** Apr 10;273(15):8910-5
49. **Röthlein D;**  
 „Characterisierung von 15 kDa-Selenoprotein in Geweben der Ratten“,  
 Promotion (1999)
50. **Kalcklösch M, Kyriakopoulos A, Hammel C, Behne D;**  
*"A new selenoprotein found in glandular epithelial cells of the rat prostate"*,  
*Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Dec 5;217(1):162-70
51. **Kryukov GV, Kryukov VM, Gladyshev VN;**  
*"New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocystein inserting sequence elements"*,  
*J Biol Chem.* **1999** Nov 26;274(48):33888-97
52. **Hill KE, Lloyd RS, Yang JG, Read R, Burk RF;**  
*"The cDNA for rat Selenoprotein P contains 10 TGA codons in the open frame"*,  
*J Biol Chem.* **1991** Jun 5;266(16):10050-3
53. **Motsenbocker MA, Tappel AL;**  
*"A selenocystein-containing seleniumtransport protein in rat plasma"*,  
*Biochim Biophys Acta.* **1982** Oct 28;719(1):147-53
54. **Navarro Silvera SA, Rohan TE;**  
*"Trace elements and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence"*  
*Cancer Causes Control.* **2007** Feb;18(1):7-27
55. **Jiang T, Jiang H, Wang Y;**  
*"Experimental research on the effect of arsenic trioxide on the growth of prostate cancer PC-3 cell lines"*  
*Zhonghua Nan Ke Xue.* **2004** Aug;10(8):578-81
56. **Anetor JI, Wanibuchi H, Fukushima S;**  
*"Arsenic exposure and its health effects and risk of cancer in developing countries: micronutrients as host defence"*  
*Asian Pac J Cancer Prev.* **2007** Jan-Mar;8(1):13-23

57. **Benbrahim-Tallaa L, Webber MM, Waalkes MP;**  
 “Mechanisms of acquired androgen independence during arsenic-induced malignant transformation of human prostate epithelial cells”  
*Environ Health Perspect.* **2007** Feb;115(2):243-7. Epub 2006 Nov 20
58. **Bryś M, Nawrocka AD, Miekoś E, Zydek C, Foksiński M, Barecki A, Krajewska WM;**  
 “Zinc and cadmium analysis in human prostate neoplasms”  
*Biol Trace Elem Res.* **1997** Winter;59(1-3):145-52
59. **Verougstraete V, Lison D, Hotz P.**  
 “Cadmium, lung and prostate cancer: a systematic review of recent epidemiological data”  
*J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* **2003** May-Jun;6(3):227-55
60. **Franklin RB, Feng P, Milon B, Desouki MM, Singh KK, Kajdacsy-Balla A, Bagasra O, Costello LC.**  
 “hZIP1 zinc uptake transporter down regulation and zinc depletion in prostate cancer”  
*Mol Cancer.* **2005** Sep 9;4:32.
61. **Zachara BA, Szewczyk-Golec K, Tyloch J, Wolski Z, Szyllberg T, Stepień S, Kwiatkowski S, Bloch-Bogusławska E, Wasowicz W;**  
 “Blood and tissue selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in patients with prostate cancer and benign prostate hyperplasia”  
*Neoplasma.* **2005** ;52(3):248-54.
62. **Rudolf E, Rudolf K, Cervinka M;**  
 “Zinc induced apoptosis in HEP-2 cancer cells: the role of oxidative stress and mitochondria”  
*Biofactors.* **2005**;23(2):107-20
63. **Diwadkar-Navsariwala V, Diamond AM;**  
 “The link between selenium and chemoprevention: a case for selenoproteins”  
*J Nutr.* **2004** Nov;134(11):2899-902
64. **Vinceti M, Rovesti S, Bergomi M, Vivoli G;**  
 “The epidemiology of selenium and human cancer”  
*Tumori.* **2000** Mar-Apr;86(2):105-18
65. **Diwadkar-Navsariwala V, Prins GS, Swanson SM, Birch LA, Ray VH, Hedayat S, Lantvit DL, Diamond AM;**  
 “Selenoprotein deficiency accelerates prostate carcinogenesis in a transgenic model”  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* **2006** May 23;103(21):8179-84. Epub 2006 May 11
66. **Tassabehji NM, VanLandingham JW, Levenson CW;**  
 “Copper alters the conformation and transcriptional activity of the tumor suppressor protein p53 in human Hep G2 cells”  
*Exp Biol Med (Maywood).* **2005** Nov;230(10):699-708.

67. **Hai-ning Yu, Yin JJ, Shen SR;**  
“Growth Inhibition of Prostate Cancer Cells by Epigallocatechin Gallate in the Presence of  $\text{Cu}^{2+}$ ”  
*J. Agric. Food Chem.*, 52 (3), 462 -466, **2004**
68. **Yilmaz MI, Saglam K, Sonmez A, Gok DE, Basal S, Kilic S, Akay C, Kocar IH;**  
“Antioxidant system activation in prostate cancer”  
*Biol. Trace Elem. Res.* **2004** Apr; 98 (1): 13-19
69. **Calvo A, Xiao N, Kang J, Best CJ, Leiva I, Emmert-Buck MR, Jorcyk C, Green JE;**  
“Alterations in gene expression profiles during prostate cancer progression: functional correlations to tumorigenicity and down-regulation of selenoprotein-P in mouse and human tumors”  
*Cancer Res.* **2002** Sep 15;62(18):5325-35.
70. **Moyad MA;**  
“Zinc for prostate disease and other conditions: a little evidence, a lot of hype, and a significant potential problem”  
*Urol Nurs.* **2004** Feb;24(1):49-52
71. **Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF;**  
“Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145)”  
*Int J Cancer.* **1978** Mar 15;21(3):274-81
72. **Laemmli UK;**  
“Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”  
*Nature.* **1970** Aug 15;227(5259):680-5
73. **Leissner KH, Fjelkegård B, Tisell LE;**  
“Concentration and content of zinc in the human prostate”  
*Invest Urol.* **1980** Jul;18(1):32-5
74. **Hawkes WC, Wilhelmsen EC, Tappel AL;**  
“Subcellular distribution of selenium-containing proteins in the rat”  
*J Inorg Biochem.* 1985 Oct;25(2):77-93
75. **Behne D, Hilmert H, Scheid S, Gessner H, Elger W;**  
“Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins”  
*Biochim Biophys Acta.* **1988** Jul 14;966(1):12-21
76. **Avissar N, Ornt DB, Yagil Y, Horowitz S, Watkins RH, Kerl EA, Takahashi K, Palmer IS, Cohen HJ;**  
“Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase”  
*Am. J. Physiol.* **1994**, 266, C367-C375
77. **Behne D, Scheid S, Kyriakopoulos A, Hilmert H;**  
“Subcellular distribution of selenoproteins in the liver of the rat”  
*Biochim Biophys Acta* **1990**, 1033, (3), 219-225

78. **Grumolato L, Ghzili H, Montero-Hadjadje M, Gasman S, Lesage J, Tanguy Y, Galas L, Ait-Ali D, Leprince J, Guérineau NC, Elkahloun AG, Fournier A, Vieau D, Vaudry H, Anouar Y;**  
“Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and neuroendocrine secretion”  
*FASEB J.* 2008 Jan 15 [Epub ahead of print]
79. **Himeno S, Chittum HS, Burk RF;**  
“Isoforms of selenoprotein P in rat plasma. Evidence for a full-length form and another form that terminates at the second UGA in the open reading frame”  
*J Biol Chem.* 1996 Jun 28;271(26):15769-75
80. **Behne D, Kyriakopoulos A, Kalcklösch M, Weiss-Nowak C, Pfeifer H, Gessner H, Hammel C;**  
“Two new selenoproteins found in the prostatic glandular epithelium and in the spermatid nuclei”  
*Biomed Environ Sci.* 1997 Sep;10(2-3):340-5
81. **Guan JY, Komura S, Ohishi N, Yagi K ;**  
“Difference in effects of classic and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases on liver lipid peroxide level in selenium-deficient rats”  
*Biochem Mol Biol Int.* 1995 Dec;37(6):1103-10
82. **Esteves A, Marques MI, Costa JV;**  
“Two-dimensional analysis of African swine fever virus proteins and proteins induced in infected cells”  
*Virology.* 1986 Jul 15;152(1):192-206
83. **Lyons DE, Wilhelmsen EC, Tappel AL;**  
“Rapid, High-Yield Purification of Rat Liver Glutathione Peroxidase by High Liquid Chromatography”  
*J Liquid Chrom.* 1981, 4, 2063-2071.
84. **McConnell KP, Broghamer WL Jr, Blotcky AJ, Hurt OJ;**  
“Selenium levels in human blood and tissues in health and in disease”  
*J Nutr.* 1975 Aug;105(8):1026-31
85. **Kryukov GV, Kumar RA, Koc A, Sun Z, Gladyshev VN;**  
“Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase”  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Apr 2;99(7):4245-50
86. **Hwang DY, Sin JS, Kim MS, Yim SY, Kim YK, Kim CK, Kim BG, Shim SB, Jee SW, Lee SH, Bae CJ, Lee BC, Jang MK, Cho JS, Chae KR;**  
“Overexpression of human selenoprotein M differentially regulates the concentrations of antioxidants and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the activity of antioxidant enzymes, and the composition of white blood cells in a transgenic rat”  
*Int J Mol Med.* 2008 Feb;21(2):169-79

87. **Anguiano B, López A, Delgado G, Romero C, Aceves C;**  
“*Deiodinase type 1 activity is expressed in the prostate of pubescent rats and is modulated by thyroid hormones, prolactin and sex hormones*”  
*J Endocrinol.* **2006** Aug;190(2):363-71
88. **Dikiy A, Novoselov SV, Fomenko DE, Sengupta A, Carlson BA, Cerny RL, Ginalski K, Grishin NV, Hatfield DL, Gladyshev VN;**  
“*SelT, SelW, SelH, and Rdx12: genomics and molecular insights into the functions of selenoproteins of a novel thioredoxin-like family*”  
*Biochemistry.* **2007** Jun 12;46(23):6871-82. Epub 2007 May 16
89. **Whanger PD;**  
“Selenoprotein W: a review”  
*Cell Mol Life Sci.* **2000** Dec;57(13-14):1846-52
90. **Lakhman SS, Ghosh D, Blanco JG;**  
“*Functional significance of a natural allelic variant of human carbonyl reductase 3 (CBR3)*”  
*Drug Metab Dispos.* **2005** Feb;33(2):254-7. Epub 2004 Nov 10
91. **Watanabe K, Sugawara C, Ono A, Fukuzumi Y, Itakura S, Yamazaki M, Tashiro H, Osoegawa K, Soeda E, Nomura T;**  
“*Mapping of a novel human carbonyl reductase, CBR3 and ribosomal pseudogenes to human chromosome 21q22.2*”  
*Genomics* 52: 95-100; **1998**
92. **Ohba H, Harano T, Omura T;**  
“*Presence of two different types of protein-disulfide isomerase on cytoplasmic and luminal surfaces of endoplasmic reticulum of rat liver cells*”  
*Biochem Biophys Res Commun.* **1977** Aug 8;77(3):830-6
93. **Forster SJ, Freedman RB;**  
“*Catalysis by protein disulphide-isomerase of the assembly of trimeric procollagen from procollagen polypeptide chains*”  
*Biosci Rep.* **1984** Mar;4(3):223-9
94. **Strbo N, Podack ER;**  
“*Secreted Heat Shock Protein gp96-Ig: An Innovative Vaccine Approach*”  
*Am J Reprod Immunol.* **2008** May;59(5):407-16
95. **Maki RG, Eddy RL Jr, Byers M, Shows TB, Srivastava PK;**  
“*Mapping of the genes for human endoplasmic reticular heat shock protein gp96/grp94*”  
*Somat Cell Mol Genet.* **1993** Jan;19(1):73-81
96. **Burk RF, Hill KE;**  
“*Orphan selenoproteins*”  
*Bioessays.* **1999** Mar;21(3):231-7

97. **Hill KE, Zhou J, McMahan WJ, Motley AK, Atkins JF, Gesteland RF, Burk RF;**  
 “Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse”  
*J Biol Chem.* **2003** Apr 18;278(16):13640-6. Epub 2003 Feb 6
98. **Motchnik PA, Tappel AL;**  
 “Rat plasma selenoprotein P properties and purification”  
*Biochim Biophys Acta.* **1989** Oct 13;993(1):27-35
99. **Yang JG, Hill KE, Burk RF;**  
 “Dietary selenium intake controls rat plasma selenoprotein P concentration”  
*J Nutr.* **1989** Jul;119(7):1010-2
100. **Burk RF, Hill KE;**  
 “Some properties of selenoprotein P”  
*Biol Trace Elem Res.* **1992** Apr-Jun;33:151-3
101. **Saito Y, Takahashi K;**  
 “Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein”  
*Eur J Biochem.* **2002** Nov;269(22):5746-51
102. **Burk RF, Hill KE, Boeglin ME, Ebner FF, Chittum HS;**  
 “Selenoprotein P associates with endothelial cells in rat tissues”  
*Histochem Cell Biol.* **1997** Jul;108(1):11-5
103. **Demus-Oole A, Swierczewski E;**  
 “Glutathione peroxidase in rat liver during development. I. Localization and characterization of the enzyme in the subcellular liver fractions of newborn and adult rat”  
*Biol Neonat.* **1969**;14(3):211-8
104. **Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigó R, Gladyshev VN;**  
 “Characterization of mammalian selenoproteomes”  
*Science* **2003**, 300, (5624), 1439-1443
105. **Brooksbank BW, Balazs R;**  
 “Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and lipoperoxidation in Down's syndrome fetal brain”  
*Brain Res.* **1984** Sep;318(1):37-44
106. **Bataineh ZM, Heidger PM Jr, Thompson SA, Timms BG;**  
 “Immunocytochemical localization of metallothionein in the rat prostate gland”  
*Prostate.* **1986**;9(4):397-410
107. **Mita M, Satoh M, Shimada A, Okajima M, Azuma S, Suzuki JS, Sakabe K, Hara S, Himeno S;**  
 “Metallothionein is a crucial protective factor against *Helicobacter pylori*-induced gastric erosive lesions in a mouse model”  
*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **2008** Apr;294(4):G877-G884.

108. **Shieh JJ, Yasunobu KT;**  
“Purification and properties of lung lysyl oxidase, a copper-enzyme”  
*Adv Exp Med Biol.* **1976**;74:447-63
109. **Vivoli G, Bergomi M, Rovesti S, Pinotti M, Caselgrandi E;**  
“Zinc, copper, and zinc- or copper-dependent enzymes in human hypertension”  
*Biol Trace Elem Res.* 1995 Aug-Sep;49(2-3):97-106
110. **Forbes EG, Cronshaw AD, MacBeath JR, Hulmes DJ;**  
“Tyrosine-rich acidic matrix protein (TRAMP) is a tyrosine-sulphated and widely distributed protein of the extracellular matrix”  
*FEBS Lett.* **1994** Sep 12;351(3):433-6
111. **Hurtado PA, Vora S, Sume SS, Yang D, St Hilaire C, Guo Y, Palamakumbura AH, Schreiber BM, Ravid K, Trackman PC;**  
“Lysyl oxidase propeptide inhibits smooth muscle cell signaling and proliferation”  
*Biochem Biophys Res Commun.* **2008** Feb 1;366(1):156-61. Epub 2007 Dec 3
112. **Cronshaw AD, MacBeath JR, Shackleton DR, Collins JF, Fothergill-Gilmore LA, Hulmes DJ;**  
“TRAMP (tyrosine rich acidic matrix protein), a protein that co-purifies with lysyl oxidase from porcine skin. Identification of TRAMP as the dermatan sulphate proteoglycan-associated 22K extracellular matrix protein”  
*Matrix.* **1993** May;13(3):255-66
113. **Nuñez A, Savary BJ, Foglia TA, Piazza GJ;**  
“Purification of lipoxygenase from *Chlorella*: production of 9- and 13-hydroperoxide derivatives of linoleic acid”  
*Lipids.* **2002** Nov;37(11):1027-32
114. **Takeuchi T, Suzuki M, Kumagai J, Kamijo T, Sakai M, Kitamura T;**  
“Extracellular matrix dermatopontin modulates prostate cell growth in vivo”  
*J Endocrinol.* **2006** Aug;190(2):351-61
115. **Huang Z, Pei Q, Sun G, Zhang S, Liang J, Gao Y, Zhang X;**  
“Low selenium status affects arsenic metabolites in an arsenic exposed population with skin lesions”  
*Clin Chim Acta.* **2008** Jan;387(1-2):139-44
116. **Singhal RL, Merali Z, Hrdina PD;**  
“Aspects of the biochemical toxicology of cadmium”  
*Fed Proc.* **1976** Jan;35(1):75-80
117. **Chinoy NJ, Sheth KM;**  
“Effects of CdCl<sub>2</sub> on the secretory functions of sex accessory glands of rats”  
*Indian J Exp Biol.* **1977** Aug;15(8):594-7
118. **Yan H, Carter CE, Xu C, Singh PK, Jones MM, Johnson JE, Dietrich MS ;**  
“Cadmium-induced apoptosis in the urogenital organs of the male rat and its suppression by chelation”  
*J Toxicol Environ Health.* **1997** Oct 10;52(2):149-68

119. **Piscator M;**  
“Role of cadmium in carcinogenesis with special reference to cancer of the prostate”  
*Environ Health Perspect.* **1981** Aug;40:107-20.
120. **Feustel A, Wennrich R, Steiniger D, Klauss P;**  
“Zinc and cadmium concentration in prostatic carcinoma of different histological grading in comparison to normal prostate tissue and adenofibromyomatosis (BPH)”  
*Urol Res.* **1982**;10(6):301-3
121. **Lindegaard PM, Hansen SO, Christensen JE, Andersen BB, Andersen O;**  
“The distribution of cadmium within the human prostate”  
*Biol Trace Elem Res.* **1990** May;25(2):97-104
122. **Behne D, Scheid S, Kyriakopoulos A, Hilmert H;**  
“Subcellular distribution of selenoproteins in the liver of the rat”  
*Biochim Biophys Acta.* **1990** Mar 26;1033(3):219-25
123. **Lobanov AV, Hatfield DL, Gladyshev VN;**  
“Reduced reliance on the trace element selenium during evolution of mammals”  
*Genome Biol.* **2008** Mar 31;9(3):R62 [Epub ahead of print]
124. **Korotkov KV, Kumaraswamy E, Zhou Y, Hatfield DL, Gladyshev VN;**  
“Association between the 15-kDa selenoprotein and UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase in the endoplasmic reticulum of mammalian cells”  
*J Biol Chem.* **2001** May 4;276(18):15330-6. Epub 2001 Feb 7
125. **Hattori H, Imai H, Furuhashi K, Sato O, Nakagawa Y;**  
“Induction of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in human polymorphonuclear neutrophils and HL60 cells stimulated with TNF-alpha”  
*Biochem Biophys Res Commun.* **2005** Nov 18;337(2):464-73. Epub 2005 Sep 21

Vorveröffentlichte Teile der Dissertation:

Publikationen als Autor:

1. **Grbavac I, Wenda N, Wolf C, Plotnikov A, Kühbacher M, Alber D, Behne D, Kyriakopoulos A.**  
*“Detection of trace element and trace element-containing proteins in the prostate”*  
*Proceedings : 5<sup>th</sup> internat. Symposium on trace elements in human: new perspectives*  
**2005** Athen p. 189-194
2. **Grbavac I, Wenda N, Wolf C, Kühbacher M, Alber D, Behne D, Kyriakopoulos A.**  
*“Distribution of metals and metalloids and related proteins in the prostate”*  
*Proceedings: 4<sup>th</sup> fall conference on metalloproteins and metalloidproteins* **2005** Berlin  
p.139-147; Herbert Utz Verlag
3. **Grbavac I, Wenda N, Wolf C, Kühbacher M, Alber D, Behne D, Kyriakopoulos A.**  
*“Metal-containing proteins in the apoptosis and redox processes in the rat prostate and human prostate cells”*  
Ann N Y Acad Sci. **2006** Dec;1090:113-9
4. **Grbavac I, Wenda N, Wolf C, Kühbacher M, Alber D, Behne D, Kyriakopoulos A.**  
*“Studies to identify metal-containing proteins in the prostate of mammals”*  
*Proceedings: 5<sup>th</sup> fall conference on metallobiolumics* **2006** Berlin p.50-147; Herbert  
Utz Verlag
5. **Grbavac I, Wolf C, Kühbacher M, Alber D, Behne D, Kyriakopoulos A.**  
*“Distribution of Manganese and Selenium in the cytosoles and sections of the rat prostate”*  
Proceedings: Macro and trace elements = Mengen- und Spurenelemente : 23.  
Workshop, **2006**. Jena. p. 387-391; Verlag Leipzig
6. **Grbavac I, Wolf C, Bartel J, Kyriakopoulos A.**  
*“Comparison of trace element-containing proteins in the cytosol of the rat prostate with trace element-containing proteins in the cytosol of the human prostate carcinoma cell line Du145”*  
*Proceedings: 6<sup>th</sup> fall conference on metallobiolumics* **2007** Berlin; Herbert Utz Verlag  
z.Z. im Druck

Publikationen als Co-Autor:

7. **Kyriakopoulos A, Grbavac I, Kühbacher M, Wolf C, Alber D, Behne D.**  
“*Characterisation of Seleno-glycoproteins in the human plasma by antibodies and mass-specroscopy*”  
*Proceedings : 5<sup>th</sup> internat. Symposium on trace elements in human: new perspectives*  
**2005** Athen p. 442-448
8. **Richter A, Pohl T, Wolf C, Plotnikov A, Grbavac I, Behne D, Kyriakopoulos A.**  
“*Selenium in the cardiovascular system of the rat*”  
*Proceedings: 4<sup>th</sup> fall conference on metalloproteins and metalloprotein* **2005** Berlin  
p.169-174; Herbert Utz Verlag
9. **Kyriakopoulos A, Grbavac I, Wolf C, Plotnikov A, Kühbacher M, Graebert A, Behne D.**  
“*Isolation and characterization of a copper-binding protein*”  
*Proceedings: 4<sup>th</sup> fall conference on metalloproteins and metalloprotein* **2005** Berlin  
p.148-152; Herbert Utz Verlag
10. **Wenda N, Grbavac I, Wolf C, Plotnikov A, Kühbacher M, Behne D, Kyriakopoulos A.**  
“*Prostate and the essential trace element Selenium*”  
“*Isolation and characterization of a copper-binding protein*”  
*Proceedings: 4<sup>th</sup> fall conference on metalloproteins and metalloprotein* **2005** Berlin  
p.175-179; Herbert Utz Verlag
11. **Kühbacher M, Falkenberg G, Schade U, Bartel J, Grbavac I, Bukalis G, Alber D, Behne D, Kyriakopoulos A.**  
“*Metalloid- and Metalloproteins – visualized with Neutrons and Photons*”  
*Proceedings: 5<sup>th</sup> fall conference on metalloproteinomics* **2006** Berlin p.1-5; Herbert Utz Verlag
12. **Plotnikov A, Wolf C, Bertelsmann H, Grbavac I, Kyriakopoulos A.**  
“*A Brief Review of Laser Ablation ICP Mass Spectrometry as a Tool for Bioanalytic : Properties, Limitations and Outlook*”  
*Proceedings: 5<sup>th</sup> fall conference on metalloproteinomics* **2006** Berlin p.39-47; Herbert Utz Verlag
13. **Kyriakopoulos A, Richter A, Pohl T, Wolf C, Grbavac I, Plotnikov A, Kühbacher M, Bertelsmann, H, Behne D.**  
“*Protein expression in the tissues of the cardiovascular system of the rat under selenium deficiency and adequate conditions*”  
*Ann N Y Acad Sci.* **2007** Dec;1095:300-304

14. **Richter A, Wolf C, Grbavac I, Plotnikov A, Kühbacher M, Alber D, Behne D, Kyriakopoulos A.**  
**“Proteinexpression in Geweben des kardiovaskulären Systems des Tiermodells Ratte“**  
*Proceedings: Experimentelle Modelle der Spurenelementforschung 2005* p.190-195;  
Herbert Utz Verlag

Poster:

Grbavac I, Wenda N, Wolf C, Plotnikov A, Kühbacher M, Alber D, Behne D, Kyriakopoulos A.  
“Distribution of trace element proteins in the prostate”  
*5<sup>th</sup> internat. Symposium on trace elements in human: new perspectives 2005* Athen

**Grbavac I, Wenda N, Wolf C, Plotnikov A, Kühbacher M, Alber D, Behne D, Kyriakopoulos A.**  
“INVOLVEMENT OF TRACE ELEMENT CONTAINING PROTEINS IN THE APOPTOSIS AND REDOX PROCESSES IN THE PROSTATE AND HUMAN PROSTATE CELLS”  
*Cell Signaling World 2006 Signal Transduction Pathways as therapeutic targets 2006*  
Luxembourg

**Grbavac I, Wenda N, Wolf C, Kühbacher M, Behne D, Kyriakopoulos A.**  
“Prevention of prostate cancer by redox processes“  
12<sup>th</sup> International Congress on Hormonal Steroids and Hormones Cancer **2006** Athen

**Grbavac I, Wenda N, Wolf C, Plotnikov A, Kühbacher M, Alber D, Behne D, Kyriakopoulos A.**  
“Distribution of Mn and Se in the Cytosoles and sections of the rat prostate”  
*Macro and Trace Elements 23. Workshop 2006* Jena

**Grbavac I, Wolf C, Kühbacher M, Behne D, Kyriakopoulos A.**  
“INFLUENCE OF SELENIUM ON METALLOPROTEINS IN THE PROSTATE OF THE RAT”  
*2<sup>nd</sup> International Conference of the Hellenic Proteomics Society 2007* Kreta

Auszeichnungen:

**1. Posterpreis für:**  
“Distribution of Mn and Se in the Cytosoles and sections of the rat prostate”  
*Macro and Trace Elements 23. Workshop 2006* Jena

Vorträge:

“Identification of metal-containing proteins in the prostate of the rat”  
*Gemeinsame Herbsttagung : Metallobiomics 2006* HMI Berlin

## Erklärung

Hiermit versichere ich gemäß § 6 (4), dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und mit keinem anderen als den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Igor Grbavac

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.