

## 8 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Spurenelements Selen auf die Aktivierung von Mikroglia unter oxidativem Stress untersucht.

Mikrogliazellen sind intrinsische Gehirnmakrophagen. Als Antwort auf zelluläre Schädigung durch oxidativen Stress werden ruhende Mikroglia aktiviert und reagieren mit morphologischen und funktionellen Veränderungen. Die aktivierten Mikrogliazellen produzieren große Mengen freier Sauerstoff- und Stickstoffradikale sowie toxische Zytokine. Diese massive Freisetzung toxischer Produkte kann nicht nur auf die Mikroglia selbst schädigend wirken, sondern vor allem auch auf Neuronen (Sekundärschädigung).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Wasserstoffperoxid-induzierte Mikrogliaaktivierung und deren Folgen durch Selenzugabe verhindert bzw. abgemildert werden kann.

Selen verhinderte die Produktion von freien Sauerstoffradikalen (ROS) in Mikroglia, die Aktivierung von Caspase-3, die Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und die induzierbare NO-Synthase (iNOS) -Aktivierung. Es wurde auch gezeigt, dass physiologische Konzentrationen von Selen die Aktivierung und Migration der Mikroglia beeinflussen: Durchflusszytometrie-Analysen zeigten eine verringerte Expression des  $\beta_2$ -Integrins CD11a nach Vorinkubation mit Selen. Selen reguliert die CD11a-Expression in aktivierten Mikrogliazellen, die notwendig ist für die spezifische Migration zum Ort der neuronalen Schädigung.

Durch  $^{75}\text{Se}$ -Markierung und Elektrophorese wurde das Selenoproteom der BV2-Zellen analysiert. Nach zwei-dimensionaler Elektrophorese wurden mehr als 25 markierte Spots in der Mikroglia-Zellen gefunden. Einige Selenoproteine konnten durch Vergleich mit den Ergebnissen früherer Studien identifiziert werden.

Alle diese Ereignisse sind mit der Fähigkeit des Selens korreliert, die Expression von Selenoproteinen zu stimulieren. Die Zugabe von Selen steigerte in BV2-Zellen insbesondere die Gpx1-Aktivität, wie durch Traceruntersuchungen mit  $^{75}\text{Se}$  und Enzymaktivitätsmessungen gezeigt werden konnte. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass Selen durch Erhöhung der Gpx1-Aktivität eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte Mikrogliaaktivierung hemmen kann.

Um die Rolle der Gpx1 in Mikrogliazellen aufzuklären, wurden Zellen produziert, in denen die Expression dieses Enzyms erhöht oder reduziert war. Dafür wurden zunächst Vektoren für die Überexpression oder Hemmung von Gpx1 kloniert.

Die Sequenz der Gpx1 wurde in einen EGFP-C1-Vektor kloniert. Auf diese Weise konnte das Enzym nach Transfektion von BV2-Zellen überexprimiert werden. Außerdem diente die GFP-Markierung der subzellulären Lokalisation des Fusionsproteins mittels Konfokalmikroskopie in COS-7 Zellen.

Die Verringerung der Gpx1-Expression wurde mittels der siRNA Technologie erreicht.

Nach sorgfältiger Auswahl der Target-Sequenzen und deren Klonierung in einen pSUPER-Vektor konnte ein funktionelles Konstrukt isoliert werden.

Die Analyse des Selenoproteoms nach der Transfektion zeigte, dass der Gpx1-pSUPER-142 Vektor effizient und gezielt die Expression dieses Enzyms in den Mikrogliazellen reduzieren konnte.

Der Knock-Down des Gpx1-Proteins bestätigte, dass der Schutzeffekt von Selen bei den Mikrogliazellen vor allem auf der Wirkung der Gpx1 beruht.

Die essentielle Rolle von Selen wurde auch durch Experimente an primären Mikrogliazellen von Ratten bestätigt, die entweder selenadäquat oder mit einer Selen-Mangeldiät ernährt worden waren.

Durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte aufgeklärt werden, wie das Spurenelement Selen durch die Modulation toxischer Reaktionen Mikrogliazellen beeinflusst und schützt. Aufgrund dieser Ergebnisse besteht die Möglichkeit, Selen therapeutisch gegen die Überaktivierung von Mikrogliazellen einzusetzen, die zur sekundären Schädigung von Neuronen führt und in verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle spielt.