

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
1 Einleitung	3
1.1 Das chemische Element Selen	3
1.2 Selen in seiner Bedeutung als Spurenelement	3
1.3 Selenocystein – die 21. Aminosäure	5
1.3.1 Biosynthese und Einbau von Selenocystein	6
1.4 Selenoproteine	9
1.5 Neuroanatomie	15
1.5.1 Großhirn	16
1.5.2 Kleinhirn	16
1.5.3 Hirnstamm	17
1.5.4 Hippocampus	18
1.5.5 Hypophyse	18
1.6 Zellulärer Aufbau des Gehirns	19
1.6.1 Die Neuronen	19
1.6.2 Die Astrocyten	20
1.6.3 Die Oligodendrocyten	21
1.6.4 Die Mikroglia	21
1.6.5 Die Blut-Hirnschranke	22
1.7 Selenoproteine im Gehirn	23
2 Zielsetzung	27
3 Methoden	29
3.1 Chemikalien	29
3.2 Geräte	31
3.3 Methoden zur Selenbestimmung	34
3.3.1 Elementanalytik	34
3.3.1.1 Neutronenaktivierungsanalyse (NAA)	34
3.3.1.2 Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)	35
3.3.1.3 Statistische Auswertung	36
3.3.1.4 Versuchstiere	36
3.3.1.5 Präparation der Proben	36
3.3.2 Selenbestimmung mittels Radiotracer ⁷⁵ Se in vivo	38
3.3.2.1 Radiotracer ⁷⁵ Se	38
3.3.2.2 Gewinnung des Radiotracers ⁷⁵ Se	38
3.3.2.3 Tracer-Messungen mit dem NaI-Szintillator	38
3.3.2.4 Tracer-Messungen durch Autoradiographie	38
3.3.2.5 Markierung von Proteinen mit ⁷⁵ Se	39

3.3.2.6	Versuchstiere und Präparation der Proben	39
3.3.3	Selenbestimmung mittels Radiotracer ^{75}Se <i>in vitro</i>	40
3.3.3.1	Kultivierung der Hirnzellen	40
3.3.3.2	Markierung von Proteinen mit ^{75}Se	41
3.4	Etablierung der <i>in vitro</i> Blut-Hirnschranke	42
3.4.1	Präparation und Kultivierung primärer Astrocyten	42
3.4.1.1	Immunfärbung der Astrocytenkulturen	42
3.4.2	Aufbau der Co-Kultur	43
3.4.2.1	Kulturmedien	43
3.4.2.2	Markierung der Co-Kultur mit ^{75}Se	43
3.5	Biochemische Methoden	44
3.5.1	Proteinbestimmung nach Bradford	44
3.5.2	Glycin-SDS-Gelelektrophorese nach Lämmli	44
3.5.3	2-dimensionale Gelelektrophorese	45
3.5.4	Differentielle Zentrifugation	45
3.5.5	Western-Blot	46
3.5.6	Peptid-Antikörper gegen Selp	46
3.5.7	Dialyse	47
3.5.8	Färbemethoden für Polyacrylamidgele	47
3.5.8.1	Coomassie-Färbung	47
3.5.8.2	Silberfärbung nach Rabilloud	47
3.5.9	Trocknung der Gele	48
3.5.10	Datenverarbeitung	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Ergebnisse der Spurenelementanalytik	49
4.1.1	Selenbestimmung in den Geweben durch NAA	49
4.1.2	Selenbestimmung in Gewebe-Cytosolen durch AAS	53
4.2	Selenbestimmung mittels Radiotracer ^{75}Se	57
4.2.1	Selenoproteine in verschiedenen Geweben der Ratte	58
4.2.2	Selenoproteine in verschiedenen Hirnregionen	60
4.2.3	Untersuchungen der selenhaltigen Proteine der Hirnregionen durch 2D-Gelelektrophorese	62
4.2.4	Selenoproteine in subzellulären Fraktionen der Hirnregionen	65
4.2.4.1	Quantitative Analyse der Expressionen	68
4.2.5	Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der Inkorporation von Selen im Gehirn	72
4.2.5.1	Immunologische Identifikation der selenhaltigen Bande bei 57 kDa	74
4.3	Markierungen von Zell-Linien mit ^{75}Se	75
4.3.1	Kultivierung und Markierung der Zell-Linien	77
4.3.1.1	Die verwendeten Zell-Linien	77
4.3.1.2	Markierung der Zell-Linien mit ^{75}Se	79
4.4	Zelluläre Verteilung von Selenoprotein P	83
4.5	Untersuchungen durch 2D-Gelelektrophorese	84

4.5.1	Zuordnung der ⁷⁵ Se-markierten Proteinbanden zu den bekannten Selenoproteinen	87
4.6	Etablierung des in vitro-Modells der Blut-Hirnschranke	91
4.6.1	Primäre Astrocyten	91
4.6.1.1	Immuncytochemische Charakterisierung	91
4.6.2	Markierung der primären Astrocyten mit ⁷⁵ Se	93
4.6.3	Das in vitro-Modell der Blut-Hirnschranke	94
4.6.4	Die Co-Kultivierung von Astrocyten und cerebralen Endothelzellen	96
4.6.5	Vorversuche zur Markierung der Co-Kultur mit ⁷⁵ Se	96
4.7	Markierung der selenhaltigen Proteine aus co- und mono-kultivierten Zellen	97
4.7.1	Expressionen selenhaltiger Proteine bei unterschiedlicher Selenversorgung	99
4.7.2	Untersuchungen durch 2-dimensionale Gelelektrophorese	100
5	Diskussion der Ergebnisse	103
5.1	Analyse des Gehirn-Selengehaltes	103
5.2	Selenaufnahme ins Hirngewebe	105
5.3	Expression der Selenoproteine in den Hirnregionen	106
5.4	Expression von Selenoproteinen in Zelltypen des Gehirns	108
5.5	Zuordnung gefundener ⁷⁵ Se-markierter Proteine zu bekannten Selenoproteinen	110
5.6	Expression selenhaltiger Proteine an der Blut-Hirnschranke	112
6	Zusammenfassung	114
7	Summary	116
	Abbildungsverzeichnis	118
	Tabellenverzeichnis	121
	Erklärung	122
	Vorabveröffentlichungen	123
	Literaturverzeichnis	125
	Danksagung	143
	Lebenslauf	145
	Anhang A: Messergebnisse der NAA	147

