

# 4 Ergebnisse

## 4.1 Ergebnisse der Spurenelementanalytik

### 4.1.1 Selenbestimmung in den Geweben durch NAA

In Tieren, die selenadäquat oder selendefizient ernährt wurden waren, wurden die Selengehalte der Gewebe von verschiedenen Hirnregionen, der Hypophyse, der Leber und der Niere mittels NAA analysiert. Das Gehirn wurde hier in die unterscheidbaren Regionen: Vorderhirn, Hinterhirn, Hippocampus, Kleinhirn und Hirnstamm präpariert. Die Proben wurden wie im Abschnitt 3.3.1.5 beschrieben gewonnen. Der Selengehalte der Proben wurde durch Vergleich der Intensitäten der Linien des  $^{75}\text{Se}$  bei 135,9 keV und 264,6 keV mit denen in den mitbestrahlten Standards bestimmt. Im folgenden werden die Tiere, die mit selenadäquater Nahrung ernährt wurden, als Se(+)-Tiere und diejenigen Tiere, die über mehrere Generationen selendefizient gehalten wurden, als Se(-)-Tiere bezeichnet. Die Analyse der Selengehalte in den Futterproben ergaben für das Se(+)-Futter  $0,30 \pm 0,04$  mg/kg und für das Se(-)-Futter  $< 0,08$  mg/kg (unterhalb der Nachweisgrenze).

In Tabelle 4.1 sind die Anzahl N der gemessenen Proben für jedes Gewebe, die Mittelwerte der Analysenwerte, deren Standardabweichung, die dazugehörigen Variationskoeffizienten und die prozentualen Zählfehler aus der  $\gamma$ -Spektrometrie der Se(+) und der Se(-)-Tiere angegeben. Beim Betrachten der Messwerte und deren Fehler fällt auf, dass die prozentuale Standardabweichung für Hypophyse, Leber und Niere bei etwa 10% lag. Sie überstieg in der Niere beider Gruppen und in der Leber der Se(+)-Tiere die Zählfehler, dies deutet auf Gewebeinhomogenitäten und/oder auf Unterschiede zwischen den Tieren hin. In der Leber der Se(-)-Tiere war der Zählfehler mit 28,6% sehr groß. Dieser Fehler war auf den geringen Selengehalt, der nahe der Nachweisgrenze lag zurückzuführen. Die großen Fehler der Hypophyse waren durch ihre sehr geringe Masse bedingt. Eine tabellarische Übersicht der einzelnen Messergebnisse ist im Anhang A ab Seite 147 zu finden.

Gewebe	Anzahl N	Mittelwert in mg/kg Trockenmasse	Standardabw.	Variationskoeff. in Prozent	Zählfehler
Se(+) Tiere					
Hirnstamm	5	0,372	0,023	6,2	6,5
Kleinhirn	5	0,604	0,011	1,8	3,7
Hippocampus	5	0,488	0,028	5,7	5,0
Vorderhirn	5	0,508	0,028	5,5	4,4
Hinterhirn	5	0,470	0,025	5,3	4,3
Hypophyse	5	1,912	0,166	13,9	4,9
Leber	5	3,002	0,319	10,6	1,0
Niere	5	6,176	0,562	9,1	0,5
Se(-) Tiere					
Hirnstamm	5	0,268	0,018	6,7	7,5
Kleinhirn	5	0,430	0,014	3,3	5,2
Hippocampus	5	0,332	0,013	3,9	7,4
Vorderhirn	5	0,366	0,021	5,7	5,5
Hinterhirn	5	0,338	0,013	3,8	6,0
Hypophyse	3	0,793	0,055	6,9	13,0
Leber	5	0,036	0,055	15,3	28,6
Niere	5	0,528	0,075	14,2	5,0

TABELLE 4.1: Mittelwerte der Selengehalte in Geweben der Se(+)- und Se(-)-Tiere

Zum direkten Vergleich sind in Abb. 4.1 die gemittelten Selengehalte der Hirnregionen sowie der Hypophyse, Leber und Niere der Se(+)- und Se(-)-Tiere als Balkendiagramm dargestellt.

In den Geweben der selenadäquat ernährten Tiere (Se(+)) wurden aufsteigende Selengehalte in der Reihenfolge: Hirnstamm, Hinterhirn, Hippocampus, Vorderhirn, Kleinhirn, Hypophyse, Leber und Niere gemessen. Innerhalb des Gehirns ist das Element Selen nicht völlig homogen verteilt. In den Se(+)-Tieren wurde der höchste Selengehalte im Kleinhirn gemessen. Sein Mittelwert lag um den Faktor 1,6 über dem geringsten Selengehalt des Hirnstamms. Die mit selenadäquater bzw. selendefizienter Nahrung ernährten Tiere wiesen gewebe-spezifische Unterschiede in den Selengehalten auf. Sehr auffällig war, dass sich der Selengehalt in denselben Hirnregionen zwischen Se(+) und Se(-) um ca. 30 % in allen Hirnregionen verringerte. Im Gegensatz dazu wiesen die Selengehalte der Hypophyse, Leber und Niere beider Tiergruppen deutlichere Unterschiede auf.

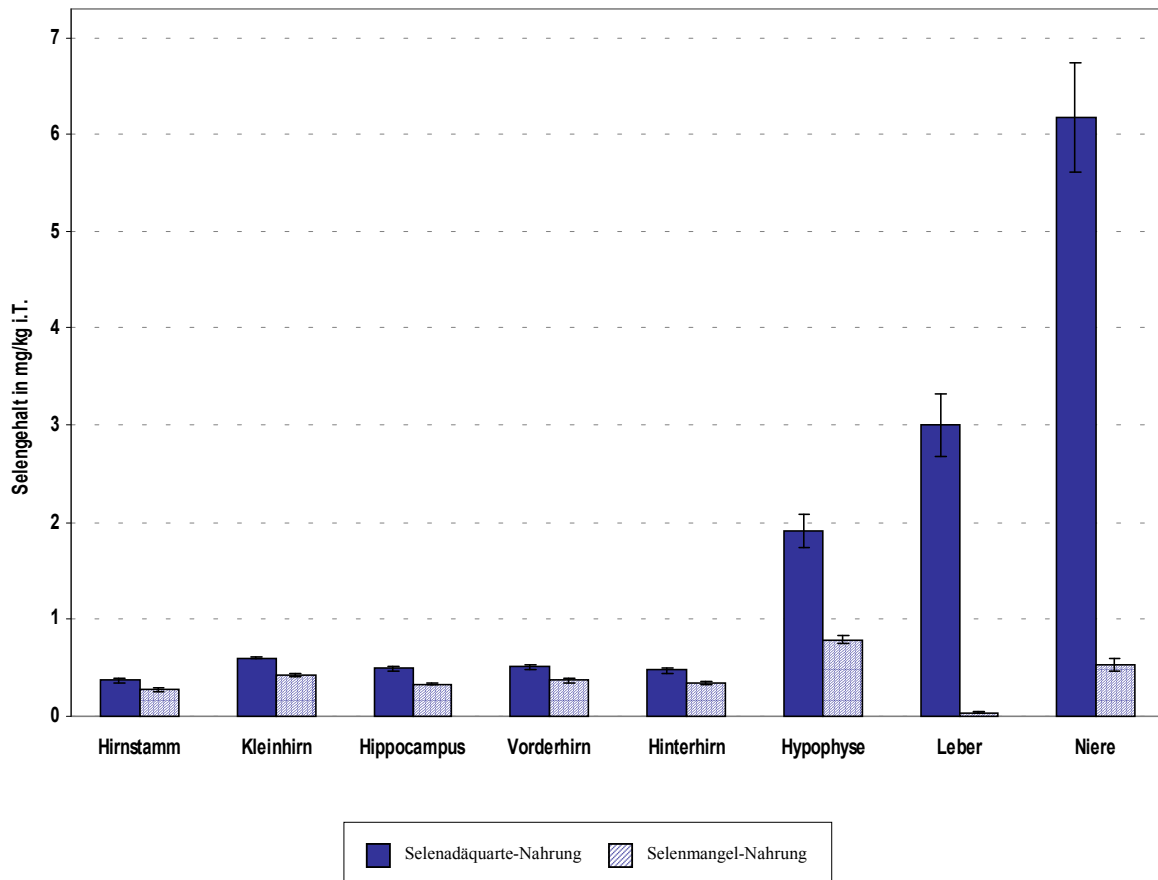
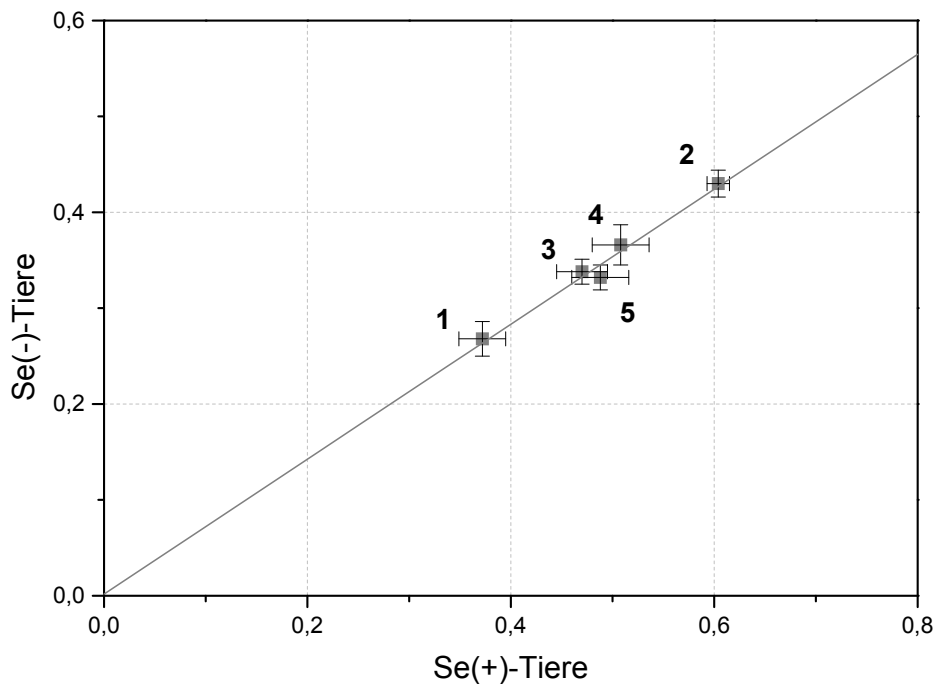


ABBILDUNG 4.1: Selengehalte der verschiedenen Hirnregionen, der Hypophyse, der Leber und der Niere von Se(+)- und Se(-)-Tieren

Der Selenstatus der Hypophyse hatte sich im Mittel um 41,7% vermindert, in der Niere und Leber wurde eine sehr starke Abnahme auf 8,6% bzw. 1,3% des Wertes der Se(+)-Tiere beobachtet. Das sind eine bzw. zwei Größenordnungen.

Die in dieser Arbeit ermittelten Werte entsprechen den publizierten Daten für die Gewebe Leber, Niere, Hypophyse und Gehirn (gesamtes Organ) von Behne und Mitarbeitern. Sie zeigen die beschriebene Hierarchie der Selenversorgung zwischen verschiedenen Organen. Die hierarchisch höher stehenden Organe erhalten im Fall einer unzureichenden Selenaufnahme ihren Selenstatus auf Kosten der niedriger gestellten Organe aufrecht. Das Gehirn hat hierbei die höchste Priorität.

Wie oben schon erwähnt, wurden die Selengehalte in allen Hirnregionen der Se(-)-Tieren im Vergleich zu denen der Se(+)-Tiere um einen ähnlichen Faktor reduziert.



1: Vorderhirn, 2: Hinterhirn, 3: Kleinhirn, 4: Stammhirn, 5: Hippocampus

ABBILDUNG 4.2: Streng proportionale Verringerung der Selengehalte in verschiedenen Hirnregionen beim Vergleich von Se(+)- und Se(-)-ernährten Tieren

In Abbildung 4.2 sind die Selengehalte der Se(+)- und Se(-)-Tiere gegeneinander aufgetragen. Die berechnete Regressionsgerade verläuft durch den Koordinatenursprung. Das bedeutet, entsprechend ihrer Selenversorgung war die Selenanreicherung bzw. -abreicherung innerhalb des Gehirns praktisch gleich. Bei einer ungenügenden Selenaufnahme wird die Selenversorgung des Gehirns in allen Hirnregionen ähnlich reguliert.

Es gibt zwischen den Hirnregionen keine Prioritätsunterschiede. Die ermittelten Daten wurden statistisch ausgewertet. Für diese Anwendung wurden der F-Test und der t-Test als geeignete Testverfahren gewählt. Die statistischen Auswertungen des Gruppenvergleiches der Se(+)- und Se(-)- Tiere durch den F-Test ergaben keine Variationsunterschiede für alle Hirnregionen sowie für die Hypophyse, jedoch deutliche Signifikanzen für Leber und Niere. Das Ergebnis des F-Tests wurde für den t-Test der Mittelwertsunterschiede berücksichtigt. Dessen Aussage ist eindeutig, die Mittelwerte aller Gewebe unterscheiden sich mit hoher Signifikanz ( $P < 0,001$ ) voneinander.

Alle statistischen Daten sind im Anhang A (Seite 151 ff.) zu finden.

### 4.1.2 Selenbestimmung in Gewebe-Cytosolen durch AAS

Interessant für die Interpretation des Selenmetabolismus bei Se(+)- und Se(-)-Tieren ist neben der Bestimmung des Selengehalts im gesamten Gewebe auch die Ermittlung dieses Wertes in der cytosolischen Fraktion des entsprechenden Gewebes. Als Analysenmethode käme prinzipiell auch hier die NAA in Frage. Für flüssige Proben wie Gewebe-Cytosole bietet sich jedoch auch die ebenso nachweisstarke AAS an, bei der die Trocknung der Proben nicht notwendig war. Daher wurde die Analyse der Selengehalte der cytosolischen Fraktionen der verschiedenen Hirnregionen, der Hypophyse, der Leber und der Niere von je zwei Se(+) und Se(-) Tieren mittels AAS durchgeführt. Die Proben und deren Cytosole wurden wie im Abschnitt 3.3.1.5 beschrieben gewonnen. Ihre Proteinkonzentrationen wurden aus Mehrfachmessungen nach der Bradford-Methode ermittelt. Die Tabelle 4.2 auf der folgenden Seite zeigt die Proteinkonzentrationen, deren prozentuale Standardabweichungen als Varianz, die Selenkonzentrationen und deren prozentuale Standardabweichungen als Varianz sowie die ermittelten Selengehalte bezogen auf die Masse an cytosolischem Protein. Zum direkten Vergleich sind in Abbildung 4.3 die Selengehalte der präparierten Hirnregionen sowie der Hypophyse, Leber und Niere für jedes Tier der Se(+) und Se(-) Tiere als Balkendiagramm dargestellt. Im Unterschied zur Bestimmung der Selengehalte durch NAA wurde hier der Selengehalt für jedes Gewebe aus zwei unabhängigen Messungen ermittelt. Wegen der teilweise sehr großen Fehler bei nur zwei Messwerten wurden keine Mittelwerte gebildet.

Die Proteinbestimmung wies in einigen Geweben große Varianzen auf: 22% im Hirnstamm von Tier 3, 10,5% im Hippocampus von Tier 3 und ca. 15% in den Hypophysen der Tiere 2, 3 und 4. Die Varianzen der restlichen Proteinbestimmungen lagen unter 10%. Die Varianzen der AAS-Messungen lagen in drei der gemessenen Geweben über 10%: 15,6% im Vorderhirn von Tier 2; 10,1% im Kleinhirn von Tier 3 und 13,2% im Hippocampus von Tier 4. Die Analyseergebnisse für die Hypophyse der Tiere 2, 3 und 4 sowie für den Hirnstamm von Tier 3, den Hippocampus von Tier 4, die Leber von Tier 3 und 4 lagen nahe an der Nachweisgrenze der AAS. Sie wiesen daher hohe Varianzen auf. Zur Berechnung der prozentualen Standardabweichung der Selengehalte pro Gramm Protein wurde der geometrische Fehler aus der Selen- und Proteinbestimmung ermittelt. Sie war für Hirnstamm 3 (22,2%), Vorderhirn 2 (16,2%) und Kleinhirn 3 (11,4%) relativ groß.

4 Ergebnisse

Gewebe	Proteinkonz.* $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Varianz Prozent	Selengehalt* $\mu\text{g}/\text{L}$	Varianz Prozent	Selengehalt $\mu\text{g Se}/\text{g Protein}$
Se(+) Tier 1					
Hirnstamm	9,9	3,0	10,0	4,0	$1,010 \pm 0,05$
Kleinhirn	16,4	7,3	14,0	5,7	$0,854 \pm 0,08$
Hippocampus	7,9	5,1	6,9	7,2	$0,873 \pm 0,06$
Vorderhirn	13,8	0,7	9,2	6,5	$0,667 \pm 0,04$
Hinterhirn	14,1	4,3	10,7	3,7	$0,759 \pm 0,04$
Hypophyse	6,6	6,1	7,6	0,7	$1,394 \pm 0,14$
Leber	54,9	2,9	200,8	7,4	$3,658 \pm 0,29$
Niere	64,3	0,9	293,2	6,7	$4,560 \pm 0,31$
Se(+) Tier 2					
Hirnstamm	9,8	5,1	7,9	3,8	$0,806 \pm 0,05$
Kleinhirn	13,6	6,6	11,4	7,0	$0,838 \pm 0,08$
Hippocampus	5,7	8,8	7,0	5,7	$1,228 \pm 0,15$
Vorderhirn	15,9	4,4	9,0	15,6	$0,566 \pm 0,09$
Hinterhirn	13,7	7,3	10,0	3,0	$0,730 \pm 0,06$
Hypophyse	0,7	14,3	1,4	14,3	$2,000 \pm 0,40$
Leber	51,5	1,7	257,8	6,9	$3,606 \pm 0,26$
Niere	47,8	0,8	211,3	6,9	$4,421 \pm 0,31$
Se(-) Tier 3					
Hirnstamm	4,1	22,0	3,4	2,9	$0,829 \pm 0,18$
Kleinhirn	15,5	5,2	8,9	10,1	$0,574 \pm 0,06$
Hippocampus	–	–	–	–	–
Vorderhirn	15,0	0,0	8,0	6,3	$0,533 \pm 0,03$
Hinterhirn	13,3	3,8	7,7	6,5	$0,579 \pm 0,04$
Hypophyse	0,7	14,3	< 1	< 1	‡
Leber	42,8	0,5	2,9	41,4	$0,068 \pm 0,03$
Niere	47,8	1,7	15,6	9,0	$0,326 \pm 0,03$
Se(-) Tier 4					
Hirnstamm	8,3	7,2	6,4	4,7	$0,771 \pm 0,07$
Kleinhirn	15,3	4,6	9,1	5,5	$0,595 \pm 0,04$
Hippocampus	7,6	10,5	6,9	13,2	$0,500 \pm 0,08$
Vorderhirn	12,9	8,5	8,1	7,4	$0,628 \pm 0,07$
Hinterhirn	9,7	9,3	6,3	6,3	$0,649 \pm 0,07$
Hypophyse	4,7	14,9	3,5	14,3	$0,745 \pm 0,15$
Leber	41,9	2,1	4,3	20,9	$0,103 \pm 0,02$
Niere	36,3	1,1	11,0	5,5	$0,303 \pm 0,02$

TABELLE 4.2: Selengehalte der cytosolischen Fraktion aus Geweben der verschiedenen Hirnregionen, der Hypophyse, der Leber und der Niere von Se(+)- und Se(-)-Tieren;

‡ Selenkonzentration unter der Nachweisgrenze,  
\* Gemisch aus Gewebe-Cytosol und Puffer (1:3)

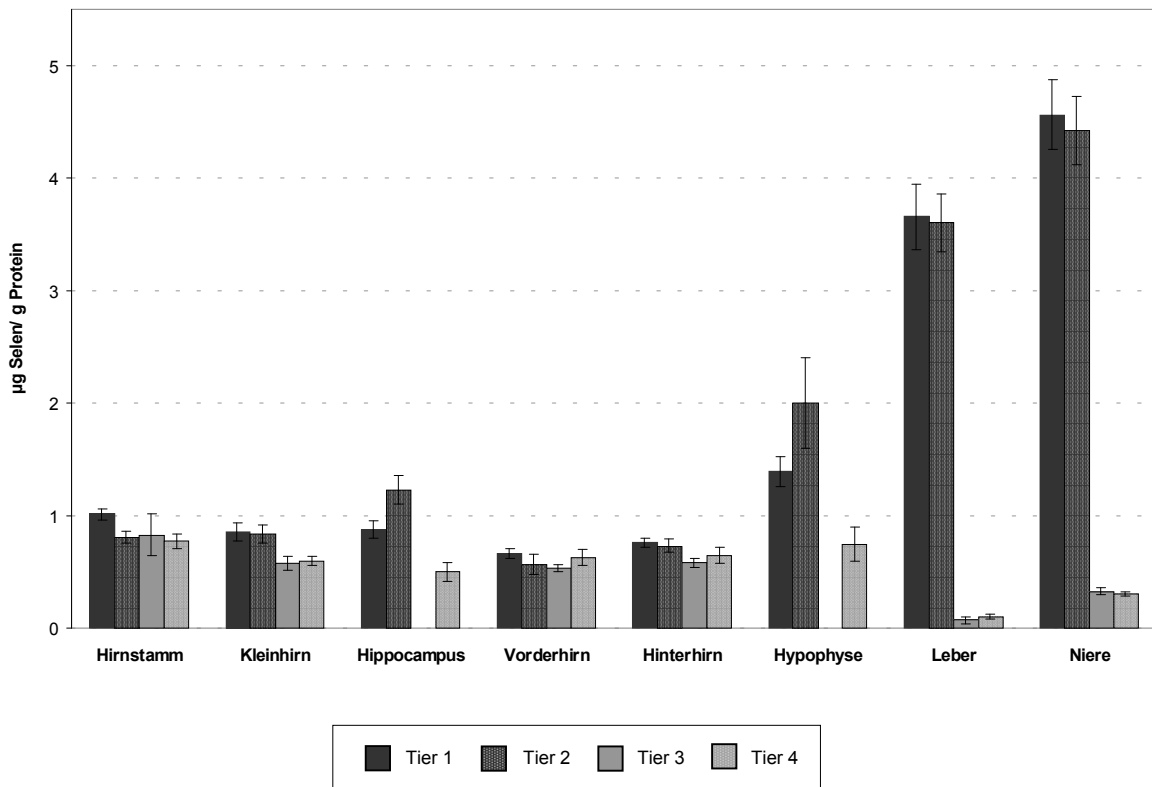


ABBILDUNG 4.3: Selengehalte der cytosolischen Fraktion aus Geweben der verschiedenen Hirnregionen, der Hypophyse, der Leber und der Niere von Se(+)- und Se(-)-Tieren

Die großen Fehler der ermittelten Selengehalte für Hippocampus 4 (16,9%), Hypophysen 2 (20,2%), 3 (Selenkonzentration lag unter der Nachweisgrenze) und 4 (21%) sowie die Werte für Leber 3 (41,4%) und 4 (21%) waren wie oben schon erwähnt durch die niedrigen Gehalte in der Nähe der Nachweisgrenze bedingt. Daher mussten bei der Bildung von Mittelwerten die Fehler berücksichtigt werden.

Insgesamt war die Reihenfolge der Selengehalte im Cytosol der im Gesamtgewebe ähnlich. In der Hypophyse, Leber und Niere gab es bei den Se(-)-Tieren eine vergleichbare Verringerung der Selengehalte im Cytosol. Auch im Kleinhirn entsprechen die Abnahmen der Selengehalte im Cytosol im Selenmangel den mit der NAA gefundenen Veränderungen im Gesamtgewebe. Dagegen gingen die Selengehalte im Cytosol des Vorderhirns nur um 6% und beim Hinterhirn um 18% zurück.

#### 4 Ergebnisse

Das weist darauf hin, dass die größere Abnahme im Gesamtgewebe hauptsächlich durch die Selengehalte in membrangebundenen Selenoproteinen oder solchen, die in Kompartimenten gebunden sind, verursacht wurde.

Abschließend muß jedoch festgehalten werden, dass die hier durchgeführten Messungen mit nur zwei Tieren pro Gruppe nicht ausreichend zuverlässig sind. Die Messwerte sind starken Schwankungen unterworfen, so dass für Messungen nach diesem Verfahren Gruppengrößen von mindestens fünf Tieren notwendig wären. Daher wurde auch zu den hier ermittelten Messwerten keine statistische Auswertung angefertigt.



## 4.2 Selenbestimmung mittels Radiotracer $^{75}\text{Se}$

In den vorangegangenen Abschnitt wurden die Selengehalte in Geweben der Ratten mit Hilfe elementanalytischer Methoden bestimmt. In Ergänzung dazu wurden proteinchemische Untersuchungen mit Hilfe des Radiotracers  $^{75}\text{Se}$  durchgeführt, der den Tieren als Natriumselenit intraperitoneal (i.p.) appliziert wurde. Die Ergebnisse sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

Die schon mehrfach erwähnte Hierarchie führt zu einer spezifischen Selenversorgung in den Geweben, die durch elementanalytische Verfahren nachweisbar ist. Bei der Markierung mit  $^{75}\text{Se}$  wird dem Tier einmalig eine gewisse Menge an radioaktiven Selen angeboten, die entsprechend der Stoffwechsellage verwendet wird. Im Organismus, der ausreichend mit Selen versorgt ist ( $\text{Se}(+)$ ), wird das  $^{75}\text{Se}$  entsprechend zu dem, schon in ausreichender Menge zur Verfügung stehenden Selen verteilt. Im Gegensatz dazu wird das  $^{75}\text{Se}$  im unter Selenmangel stehenden Organismus entsprechend der Hierarchie auf seine Gewebe verteilt. Das bedeutet für die Untersuchungen mittels Radiotracer  $^{75}\text{Se}$ , dass ein Gewebe umso stärker mit Selen versorgt wird, je höher seine hierarchische Stellung ist. Diese Hierarchie wird um so deutlicher, je stärker der Selenmangel im Organismus und je geringer die applizierte Selenmenge ist. Das Gehirn hat innerhalb der gewebespezifischen Hierarchie die höchste Priorität, jedoch weist dieses Gewebe einen sehr geringen Selengehalt auf. Als Folge davon nimmt das Hirngewebe verglichen mit allen anderen Geweben im Selenmangel-Zustand prozentual zwar eine grössere Menge des Radiotracers  $^{75}\text{Se}$  auf, wird aber durch die geringere Menge nur relativ schwach markiert. Hinzu kommt der hohe Lipidgehalt des Hirngewebes, der dessen Verarbeitung und die proteinchemische Analyse erschwert. Im Hirngewebe sind Lipide neben ihrem Vorkommen in den Plasmamembranen und intrazellulären Membranen der Hirnzellen auch Hauptbestandteil der Myelinschichten neuronaler Axone.

Auf Prozeduren zur Entfettung von Hirngeweben wurde aus den folgenden Gründen verzichtet: (i) mögliche Substanzverluste sind schwer abzuschätzen und (ii) der Effekt der Entfettungsprozedur auf zelluläre Strukturen ist nicht zu vernachlässigen. Die Markierung des Gehirns für proteinchemische Untersuchungen ist daher problematisch. Deshalb und aus Gründen der hierarchischen Stellung des Gehirns wurde die Markierung mit  $^{75}\text{Se}$  hoher spezifischer Aktivität (16 – 18 MBq/Tier) durchgeführt. Erst dadurch wurde eine optimale proteinchemische Analyse der selenhaltigen Proteine des Hirngewebes ermöglicht.

### 4.2.1 Selenoproteine in verschiedenen Geweben der Ratte

Die Abbildung 4.4 zeigt ein Autoradiogramm der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine von Homogenaten verschiedener Gewebe eines Se(–)-Tieres (520 g), das mit 16 MBq  $^{75}\text{Se}$  markiert wurde. Das Tier wurde 6 Tage nach seiner Markierung getötet und die Organe präpariert. Die Gewebe wurden in 50 mM Tris pH 7.4 homogenisiert und die Proteine mittels SDS-PAGE getrennt. Hier wurden statt gleicher Proteinmengen die gleichen Tracermengen für jedes Gewebe aufgetragen, da sich die aufgenommenen Mengen an  $^{75}\text{Se}$  zum Teil erheblich voneinander unterschieden. Das optimale Autoradiogramm kann nur erhalten werden, wenn die erforderliche Belichtungszeit für alle Proben auf einem Gel annähernd gleich ist. Die Unterschiede in den Mengen an Selen, die von jedem Gewebe aufgenommen wurden, wurden durch die gewebespezifische Hierarchie verursacht. Das Autoradiographie lieferte die schon bekannten Muster der Banden der selenhaltigen Proteine. Die Benennung der Selenoprotein-Banden im folgenden Text stützt sich teilweise auf Ergebnisse aus immunologischen Techniken und Ergebnisse aus Klonierungen.

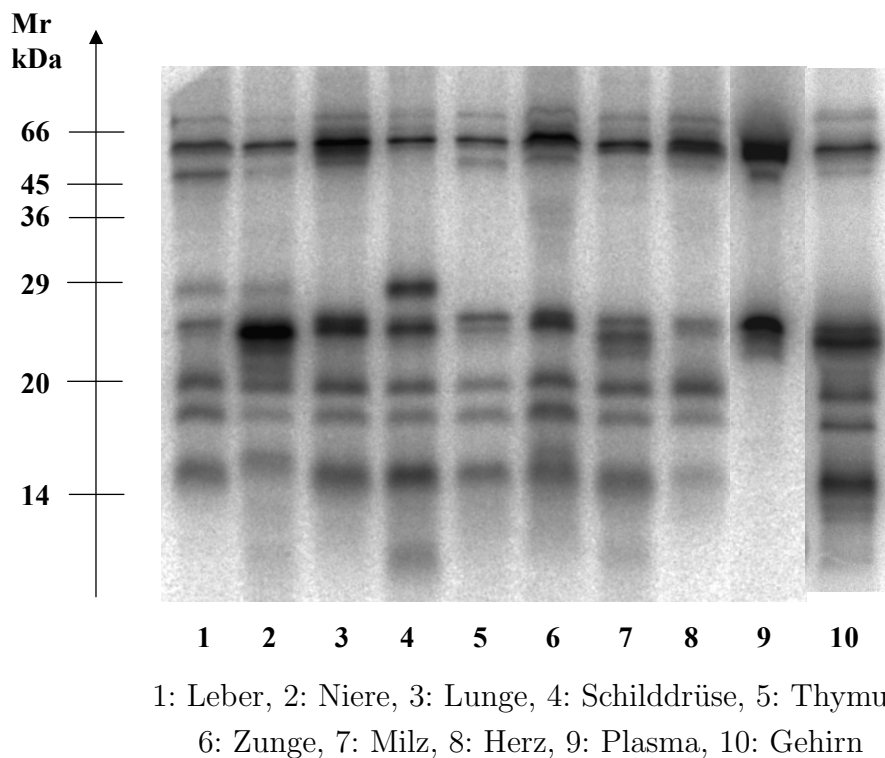


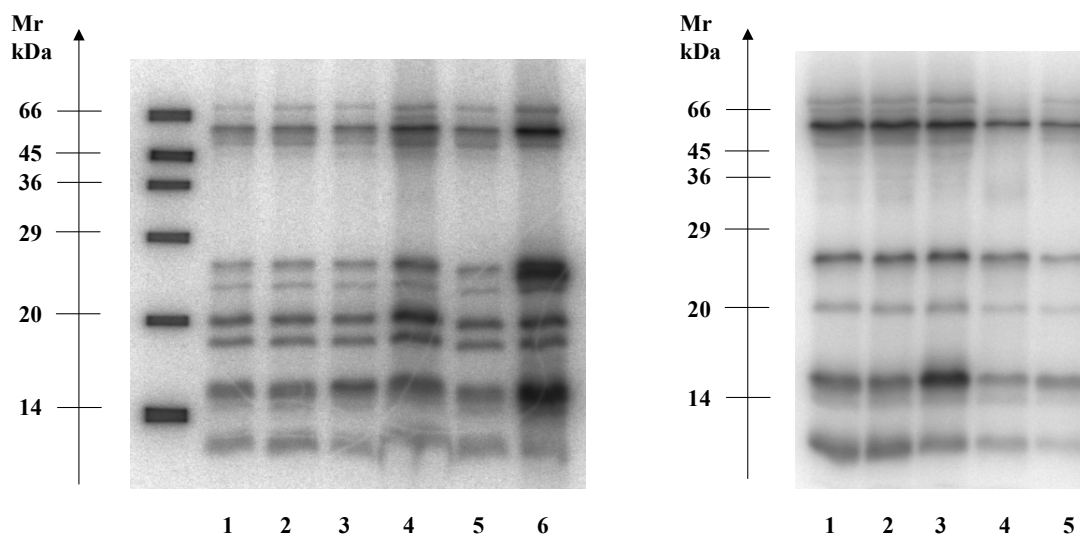
ABBILDUNG 4.4: Autoradiogramm der selenhaltigen Proteine in Homogenaten verschiedener Organe eines Se(–)-Tieres

Im Autoradiogramm der durch SDS-PAGE getrennten Proteine wurden in allen Geweben die Banden der Untereinheiten der Thioredoxin-Reduktase TrxR1 und TrxR2 bei 57 bzw. 53 kDa gefunden. In allen Geweben außer dem Plasma wurden auch die Banden der Untereinheiten der Glutathion-Peroxidasen GPx1 und GPx3 bei 23 bzw. 25 kDa detektiert. Gleichfalls in allen Geweben außer im Plasma wurden die Banden der GPx4 bei 20 kDa, die des membrangebundenen 18 kDa-Selenoproteins und eine Bande bei 15 kDa nachgewiesen. Letztere war in den Geweben unterschiedlich stark markiert und war im Gehirn besonders stark geschwärzt. Durch nähere Untersuchungen und 2-dimensionale Proteintrennungen wurde gezeigt, dass im Hirngewebe bei dieser Molekularmasse mehrere Selenoproteine liegen. Im Plasma wurde Banden bei ca. 54 kDa und 25 kDa detektiert, die von den Glykoproteinen Selenoprotein P und GPx3 stammen könnten. Die in der Schilddrüse, der Leber und der Niere gefundene Bande bei 27 kDa stammt von der Deiodase Typ I. In der Leber wurde eine weitere Bande bei ca. 49 kDa gefunden, bei der es sich möglicherweise um die Bande der Selenophosphat-Synthetase 2 (SPS2) handelte. Die Bande bei 10 kDa stammte von Selenoprotein W, sie wurde besonders stark im Hirngewebe markiert.

In diesem Autoradiogramm waren auch selenhaltige Proteinbanden bei ca. 74 kDa und bei ca. 12 kDa zu sehen. Die Gene von Selenoproteinen dieser Molekularmassen wurden *in silico* identifiziert und ihre exprimierten Proteine wurden als Selenoprotein O und Selenoprotein X [65] bezeichnet. Die hier gefundenen Banden bei 74 kDa und bei 12 kDa könnten von diesen Proteinen stammen.

### 4.2.2 Selenoproteine in verschiedenen Hirnregionen

In den folgenden Versuchen wurde die Verteilung der selenhaltigen Proteine in den verschiedenen Regionen des Gehirns untersucht. Als eine der zentralen Fragestellungen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob im gesamten Gehirn die Verteilung der selenhaltigen Proteine gleich ist und/oder regionale Differenzen in ihrer Expression bestehen. Dazu wurden Gehirne von Se(-)-Tieren (Gewicht: 240 – 270 g) in den durch NAA und AAS analysierten Regionen nach Markierung mit dem Radiotracer  $^{75}\text{Se}$  proteinchemisch untersucht. Die Tiere wurden 6 Tage nach Markierung mit  $^{75}\text{Se}$  (18 MBq) getötet und die Gehirne wie im Abschnitt 3.3.1.5 beschrieben präpariert. Anschließend wurden die Gewebe homogenisiert und für jede Gewebeprobe das Cytosol als Überstand nach Zentrifugation bei  $120\,000 \times g$  gewonnen. Dabei konnte wegen der geringen Probenmenge kein Cytosol der Hypophyse erhalten werden. Nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen und der Traceraktivitäten wurden jeweils gleiche Proteinmengen der Homogenate und Cytosole jeder Hirnregion einer Trennung durch die SDS-Gelelektrophorese unterworfen. Nach der Färbung und der Trocknung der Gele wurden die selenhaltigen Proteine autoradiographisch detektiert.



1: Vorderhirn, 2: Hinterhirn, 3: Kleinhirn  
4: Hirnstamm, 5: Hippocampus, 6: Hypophyse

ABBILDUNG 4.5: Autoradiogramm der selenhaltigen Proteine der Homogenate verschiedener Hirnregionen und der Hypophyse (links) sowie der Cytosole verschiedener Hirnregionen (rechts) eines Se(-)-Tieres

Um die Proteine des Molekularmarkers auch im Autoradiogramm sichtbar zu machen, wurden ihre gefärbten Banden in dem getrockneten Gel mit  $^{75}\text{Se}$  markiertem Filterpapier überklebt. Die Autoradiogramme sind in Abbildung 4.5 dargestellt. In den Homogenaten aller Hirnregionen waren die gleichen selenhaltigen Proteine vorhanden. Dazu gehörten die Banden bei 57 bzw. 53 kDa, die wahrscheinlich von den Untereinheiten der Thioredoxin-Reduktasen TrxR1 und TrxR2 stammen sowie die Banden bei 23 bzw. 25 kDa., die vermutlich von den Untereinheiten der Glutathion-Peroxidasen GPx1 und GPx3 herrühren. Außerdem wurden in allen Homogenaten die Banden bei 20 kDa (GPx4), bei 18 kDa und eine Bande bei 15 kDa nachgewiesen. Die Bande bei 10 kDa stammt vermutlich vom Selenoprotein W. Auch das *in silico* identifiziert Selenoprotein O bei 74 kDa wurde detektiert. In den Cytosolen aller Hirnregionen fehlten die Banden der mitochondrialen TrxR2 bei 53 kDa und des membrangebundenen 18 kDa Selenoproteins.

Interessante Unterschiede ergaben sich beim Vergleich des Schwärzungsgrades der Banden sowohl innerhalb einer Hirnregionen als auch zwischen den Hirnregionen. Beim Autoradiogramm der Homogenate fällt auf, dass mit Ausnahme der Bande bei 25 kDa alle Banden im Hirnstamm stärker geschwärzt sind als in anderen Hirnregionen. In den Cytosolen des Hirnstamms sind die selenhaltigen Proteine insgesamt geringer markiert als in den Cytosolen anderer Regionen. Dies könnte darauf hinweisen, dass Selen im Hirnstamm hauptsächlich in membrangebundenen und kompartimentierten Selenoproteinen enthalten ist. In dem Homogenat der Hypophyse weisen alle Proteinbanden einen höheren Schwärzungsgrad auf. Eine 15 kDa-Bande fällt im Homogenat des Kleinhirns und noch deutlicher in dessen Cytosol durch ihre erhöhte Schwärzung auf. Dies weist auf ein cytosolisch lokalisiertes selenhaltiges Protein von 15 kDa der SDS-PAGE hin, das im Kleinhirn angereichert ist.

Die Ergebnisse der auf die Proteinmenge bezogenen Traceraktivitäten für die Homogenate und Cytosole entsprechen denen der visuellen Analyse der Autoradiogramme in Abbildung 4.5.

### 4.2.3 Untersuchungen der selenhaltigen Proteine der Hirnregionen durch 2D-Gelelektrophorese

Zur weiteren Analyse der mit  $^{75}\text{Se}$  markierten Homogenate und Cytosole jeder Hirnregion wurden die Proteine zweidimensional aufgetrennt. Zur Fokussierung wurde das System Multiphor<sup>TM</sup>II der Firma Amersham Biotech mit IPG-Strips genutzt. Nach ihrer Fokussierung und Äquilibration wurden die Proteine in der Gelelektrophorese nach Lämmli in einer zweiten Dimension aufgetrennt. Die Proteine in den Gelen wurden gefärbt, die Gele getrocknet und die  $^{75}\text{Se}$ -markierten Proteine durch Autoradiographie detektiert.

In den Abbildungen 4.6 und 4.7 sind die erhaltenen Autoradiogramme der 2-dimensional getrennten Proteine aus den Homogenaten von Vorderhirn und Hinterhirn sowie der cytosolischen Proteine aus Hinterhirn und Hirnstamm exemplarisch gezeigt. Zwischen den Homogenaten und zwischen den Cytosolen von: Vorderhirn, Hinterhirn, Hippocampus und Stammhirn wurden keine Unterschiede bei den selenhaltigen Proteinen gefunden.

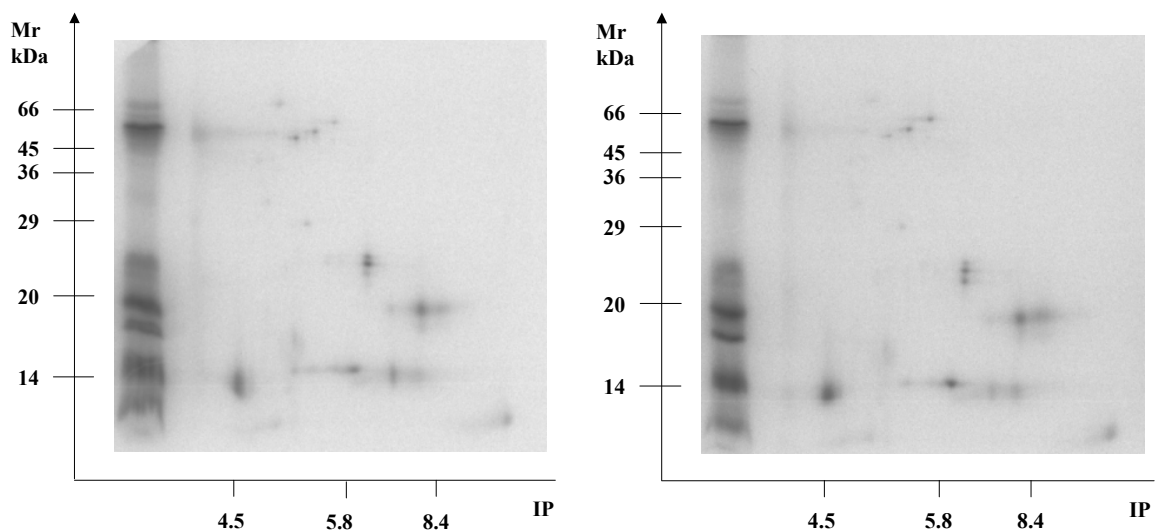


ABBILDUNG 4.6: Autoradiogramm der selenhaltigen Proteine der Homogenate aus Vorderhirn (links) und Hinterhirn (rechts) eines  $\text{Se}(-)$ -Tieres nach 2-dimensionaler Proteintrennung

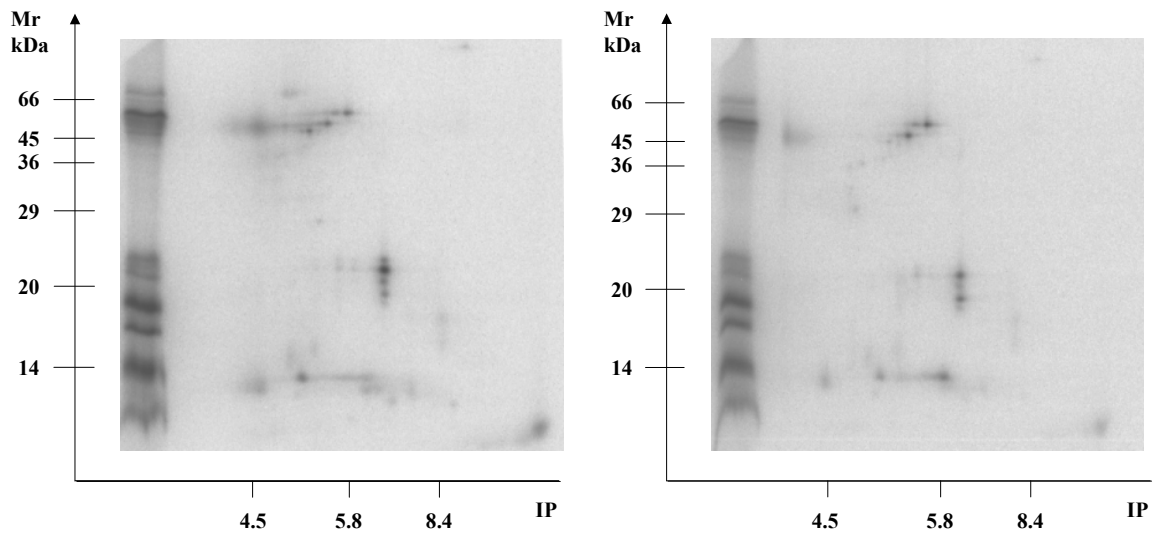


ABBILDUNG 4.7: Autoradiogramm der selenhaltigen Proteine der Cyto-sole aus Hinterhirn (links) und Hirnstamm (rechts) eines  $\text{Se}(-)$ -Tieres nach 2-dimensionaler Proteintrennung

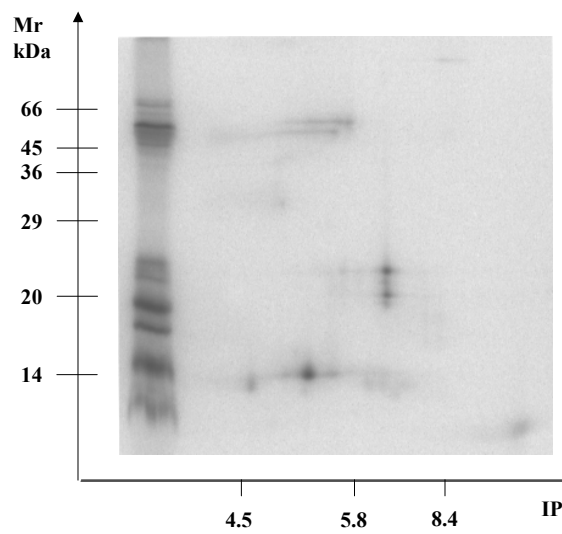


ABBILDUNG 4.8: Autoradiogramm der selenhaltigen Proteine des Cyto-sole vom Kleinhirn eines  $\text{Se}(-)$ -Tieres nach zweidimensionaler Proteintrennung

Die einzige Auffälligkeit im Muster der  $^{75}\text{Se}$ -markierten Proteine nach 2-dimensionalen Proteintrennung zeigte sich im Autoradiogramm des Cytosols aus dem Kleinhirn. Darauf wird später eingegangen.

In allen Homogenaten wurden die gleichen selenhaltigen Proteine gefunden. Dazu gehören Spots zwischen 57 bis 53 kDa mit IP-Werten von 5.2 – 6.0 (Untereinheiten von TrxR1 und TrxR2) sowie Spots bei 23 bzw. 25 kDa im IP-Bereich von 6.4 – 7.0 (Untereinheiten der Glutathion-Peroxidasen GPx1 und GPx3). Ein schwacher Spot wurde im Molekularmassenbereich von 29 – 30 kDa bei einem IP-Wert von 5.4 – 5.8 detektiert. Hierbei könnte es sich um die Deiodase Typ II handeln. Weiterhin wurde ein selenhaltiges Protein bei 20 kDa mit einem IP von 7.0 – 7.8 (GPx4) und bei 18 kDa im IP-Bereich 7.2 – 8.0 (18 kDa-Selenoprotein) nachgewiesen. Im Molekularmassenbereich von 15 – 14,2 kDa konnten mehrere selenhaltigen Spots mit IP-Werten von 4.5 – 4.8, 5.8 – 6.2 und 6.8 – 7.5 unterschieden werden. Ein Spot bei 10 kDa und einem IP-Wert von 8.0 – 8.5 könnte von Selenoprotein W herrühren. In den Autoradiogrammen wurde auch ein markierter Spot bei 74 kDa mit einem IP von 4.8 – 5.0 gefunden, der von dem als Selenoprotein O bezeichnetem Protein stammen könnte.

In den Cytosolen aller Hirnregionen fehlte der Spot bei 18 kDa, da das entsprechende selenhaltige Protein membrangebunden ist. Sehr interessant war, dass im Massenbereich 15 – 14,2 kDa insgesamt vier selenhaltige Spots unterschieden werden konnten. Davon wurde der Spot bei IP 5.8 – 6.2 im Homogenat deutlicher detektiert. Im Cytosol lag bei diesem IP-Wert kein Spot, stattdessen wurde einer bei IP 5.0 – 5.2 gefunden. Hierbei könnte es sich um ein selenhaltige Protein handeln, das im Cytosol angereichert ist. Bei genauerer Analyse der 2-dimensional getrennten Proteine der Homogenate und Cytosole wurde in einigen Gelen eine schwache Schwärzung, die sich über einen IP-Bereich von ca. 4.8 – 6.2 hinzieht gefunden. Diese diffuse Schwärzung wurde anscheinend von diesen zwei selenhaltigen Spots verursacht, die im Homogenat bei IP 5.8 – 6.2 und im Cytosol bei IP 4.8 – 5.2 gefunden worden waren. Dieses Ergebnis wurde in zahlreichen Versuchen bestätigt.

In dem Autoradiogramm des 2-dimensional getrennten Cytosols aus dem Kleinhirn wurden die schon beschriebenen Spots der  $^{75}\text{Se}$ -markierten Proteine nachgewiesen. Im Unterschied zu den übrigen Hirnregionen wurde hier selektiv ein Spot bei IP 4.8 – 5.2 deutlich stärker markiert. In der eindimensionalen Gelelektrophorese des vorangegangenen Kapitels wurde bereits festgestellt, dass bei der Masse 15 kDa der Schwärzungsgrad im Autoradiogramm stärker war und dies in den Cytosolen deut-



licher wurde. Diese Auffälligkeit verlangt nach weiterer Untersuchung, besonders im Hinblick auf den morphologischen und zellulären Aufbau des Kleinhirns. So wäre eine zelltypspezifische Expression dieses 15 kDa-Selenoproteins in den Purkinjezellen oder den Körnerzellen des Kleinhirns denkbar.

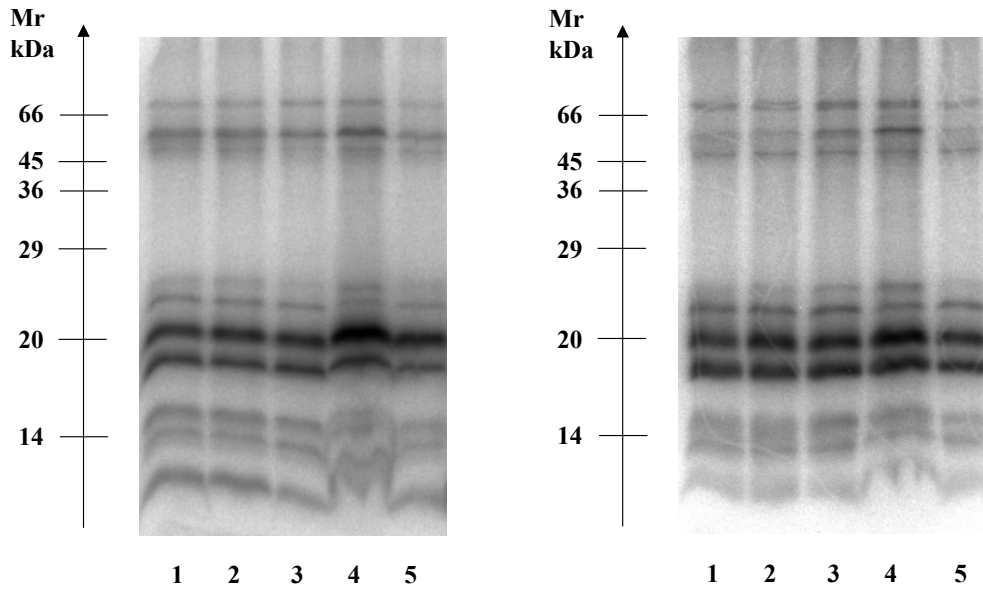
#### 4.2.4 Selenoproteine in subzellulären Fraktionen der Hirnregionen

Zur genaueren Untersuchung der Expressionsmuster selenhaltiger Proteine innerhalb der Zellen wurden subzelluläre Fraktionen der Hirnregionen Vorderhirn, Hinterhirn, Hippocampus, Kleinhirn und Hirnstamm gewonnen. Die präparierten Hirnregionen bestehen alle aus Neuronen und verschiedenen Gliazelltypen, deren Charakteristika und Anteile regional verschieden sind. Daher kann durch diese Fraktionierung nach Größen und Dichten der Zellbestandteile nur ein grober Überblick über Besonderheiten einer Region gewonnen werden.

Mit den nach der Zentrifugation bei  $120\,000 \times g$  erhaltenen Pellets für jede Hirnregion wurde eine differentielle Zentrifugation durchgeführt. Die Pellets wurden in 50 mM Tris pH 7.4 aufgenommen und wie im Abschnitt 3.5.4 beschrieben aufgearbeitet. Es wurde eine Kernfraktion, eine mitochondriale und eine mikrosomale Fraktion gewonnen. Die Reinheit der Kernfraktion wurde mikroskopisch überprüft. Sie wies nur sehr geringe Verunreinigungen durch Membranstrukturen auf. Die als mitochondriale Fraktion bezeichnete Fraktion enthielt neben den Mitochondrien auch Peroxisomen, Lysosomen und Strukturen des Golgi-Apparates. In der mikrosomalen Fraktion waren überwiegend das Endoplasmatische Retikulum und freie Ribosomen enthalten.

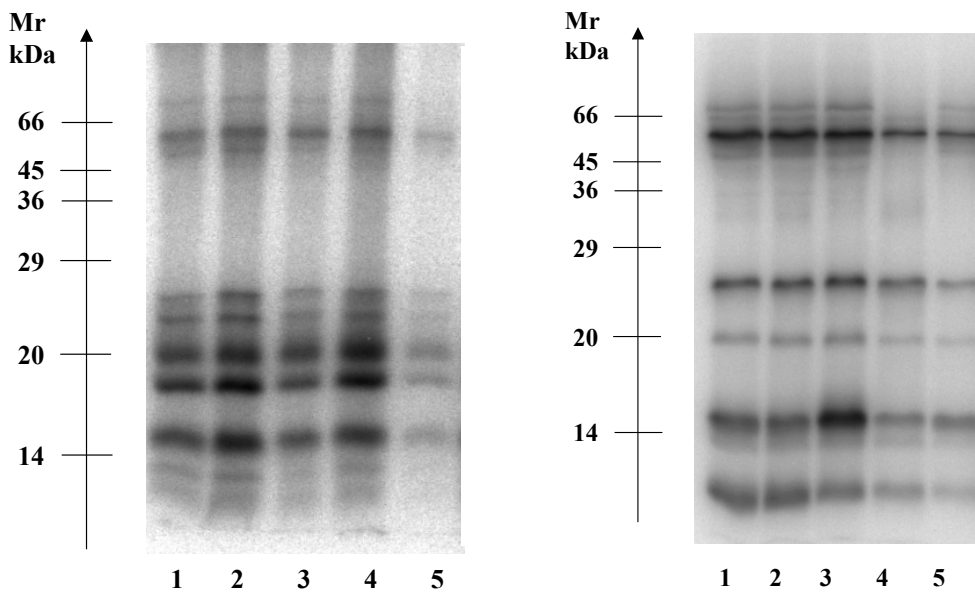
Nach Messung des Gesamtproteins, Bestimmung des Tracers in den einzelnen Fraktionen, elektrophoretischer Trennung nach Lämmli sowie Anfärben der Proteine und Trocknung der Gele wurden die  $^{75}\text{Se}$ -markierten Proteine in den einzelnen Fraktionen autoradiographisch nachgewiesen. Die Abbildungen 4.9 und 4.10 zeigen die Autoradiogramme der subzellulären Fraktionen sowie der cytosolischen Fraktionen jeder Hirnregion. Die Autoradiogramme zeigen Unterschiede der  $^{75}\text{Se}$ -markierten Proteine zwischen den subzellulären Fraktionen, jedoch wurden nur geringe Unterschiede zwischen gleichen Fraktionen der verschiedenen Hirnregionen gefunden.

## 4 Ergebnisse



1: Vorderhirn, 2: Hinterhirn, 3: Kleinhirn, 4: Hirnstamm, 5: Hippocampus

ABBILDUNG 4.9: Autoradiogramm der selenhaltigen Proteine der Kernfraktion (links) und der mitochondrialen Fraktion (rechts) verschiedener Hirnregionen eines Se(-)-Tieres



1: Vorderhirn, 2: Hinterhirn, 3: Kleinhirn, 4: Hirnstamm, 5: Hippocampus

ABBILDUNG 4.10: Autoradiogramm der selenhaltigen Proteine der mikrosomalen (links) und der cytosolischen Fraktion (rechts) verschiedener Hirnregionen eines Se(-)-Tieres

In den Kernfraktionen sowie in den mitochondrialen Fraktionen aller Hirnregionen in Abbildung 4.9 waren die Banden der selenhaltigen Proteine bei 20 kDa und die Bande des 18 kDa–Seleoproteins sehr stark, die übrigen selenhaltigen Proteine aber nur schwach markiert. Im Hirnstamm waren in der Kernfraktion die selenhaltigen Proteine bei 20 kDa und bei 18 kDa deutlich stärker markiert als in den gleichen Fraktionen der anderen Hirnregionen. Zusätzlich erschienen auch die Banden bei 57 kDa in beiden Fraktionen wesentlich stärker als in anderen Hirnregionen. Dieses Ergebnis wurde auch bei den auf die Gesamtproteinmenge bezogenen Aktivitäten gefunden.

In den mikrosomalen Fraktionen der Hirnregionen in Abbildung 4.10 waren die Banden des selenhaltigen Proteins bei 20 kDa, des 18 kDa Selenoproteins und auch die Bande bei 15 kDa sehr viel stärker mit  $^{75}\text{Se}$  markiert als die übrigen Banden. Die beobachtete geringere Schwärzung der selenhaltigen Proteine des Hippocampus dieser Fraktion war auf die geringere Probenmenge zurückzuführen. Auf die beobachteten Auffälligkeiten in den cytosolischen Fraktionen wurde schon in dem vorangegangenen Abschnitt 4.2.2 und 4.2.3 eingegangen.

Die Verteilung der Selenoproteine zwischen subzellulären Fraktionen wurde schon für andere Organe beschrieben [193]. Zur genaueren Auswertung der Autoradiogramme der subzellulären Fraktionen wurde eine quantitative Analyse der Schwärzungen in den Autoradiogrammen durchgeführt.

## 4.2.4.1 Quantitative Analyse der Expressionen

Die Autoradiogramme der subzellulären Fraktionen jeder Hirnregion wurden quantitativ mit dem Programm Aida 2.43 (Raytest, Straubenhardt) ausgewertet. Dabei wurden die  $^{75}\text{Se}$ -markierten Banden der Molekularmassen: 74 kDa, 57 kDa, ca. 50 kDa, 25 kDa, 23 kDa, 20 kDa, 18 kDa, 15 kDa und 12 – 10 kDa erfasst. Die Intensitäten der Schwärzungen der Banden wurden in PSL-Einheiten (photostimulable luminescence units) ermittelt. Anschließend wurde ihre prozentualen Anteile an der Gesamtschwärzung einer Probe berechnet. In den Abbildungen 4.11, 4.12 und 4.13 sind die Ergebnisse für jede Hirnregion als Balkendiagramm dargestellt. Die maximalen Fehler wurden auf 10 % des Messwertes geschätzt. Die gefundenen PSL-Werte bestätigen und präzisieren die schon im vorangegangenen Kapitel gemachten Beobachtungen.

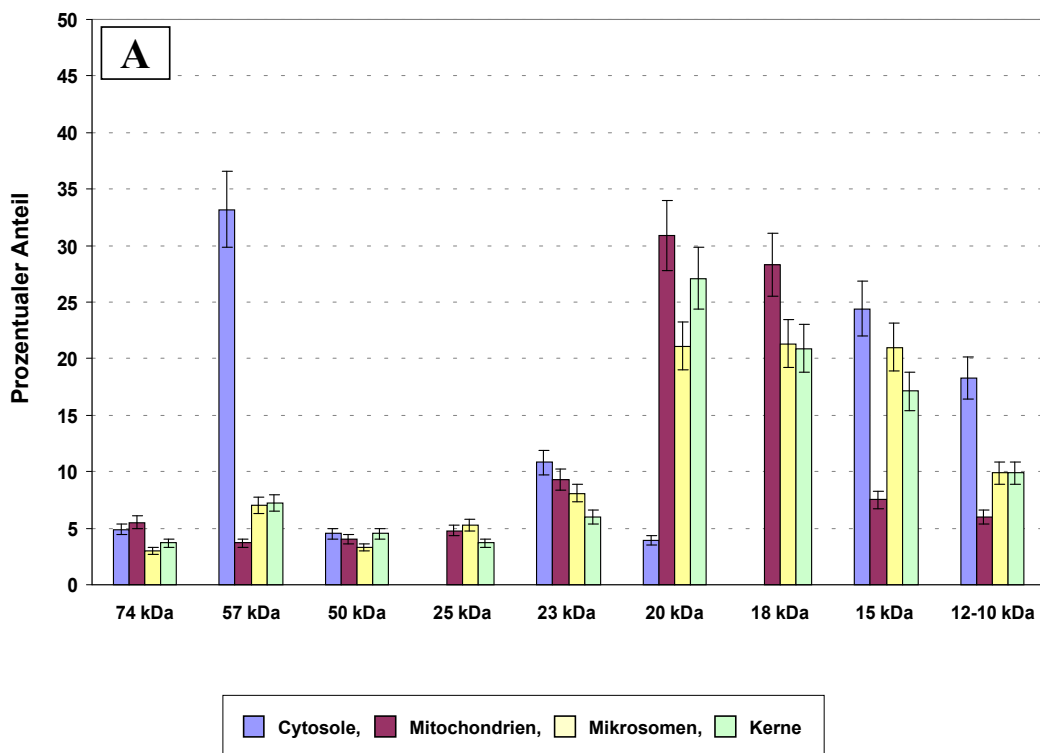


ABBILDUNG 4.11: Prozentuale Anteile der  $^{75}\text{Se}$ -markierten Banden an der Gesamtschwärzung der elektrophoretisch getrennten Proteinen in subzellulären Fraktionen des Vorderhirns (A) eines  $\text{Se}(-)$ -Tieres

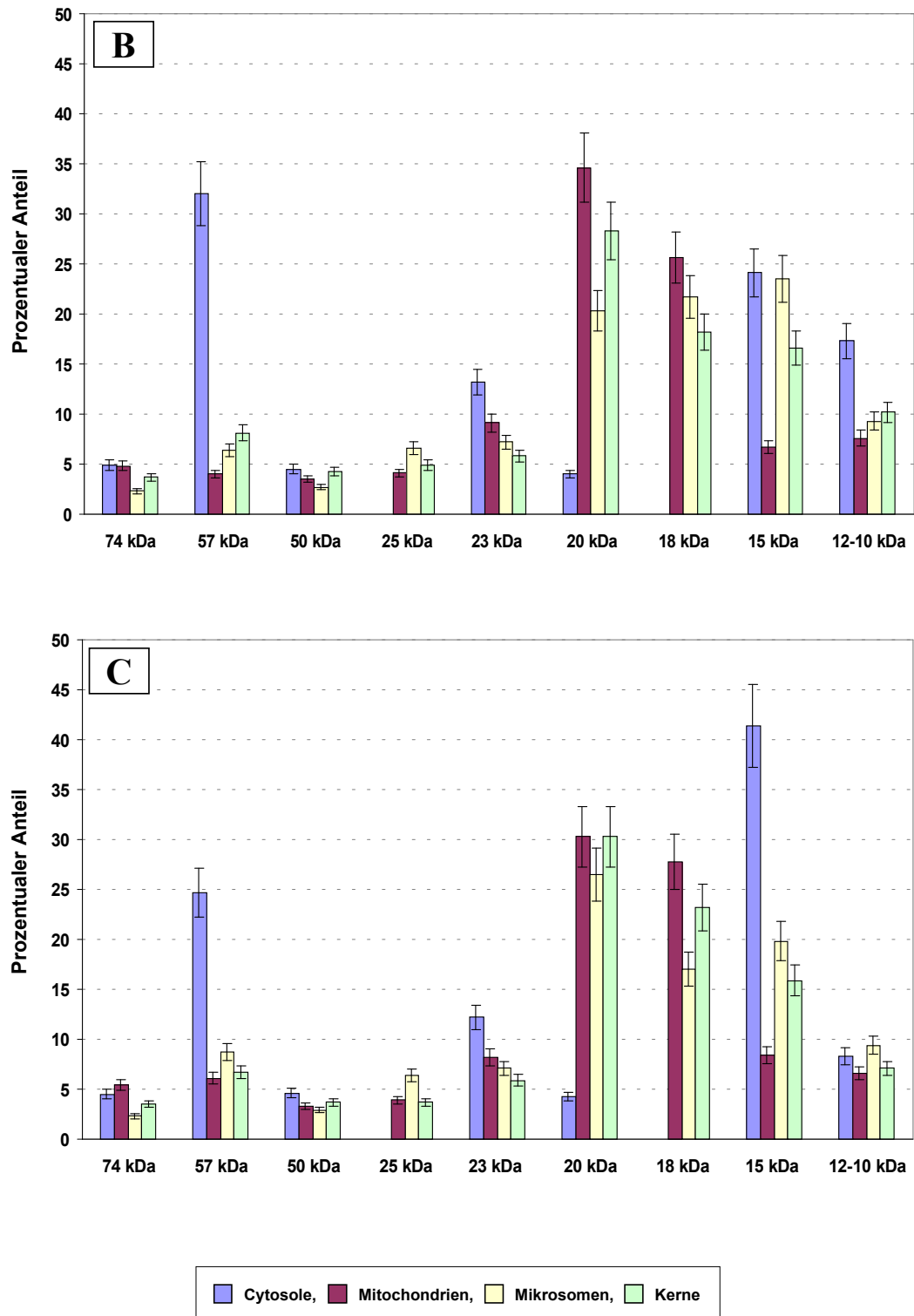


ABBILDUNG 4.12: Prozentuale Anteile der  $^{75}\text{Se}$ -markierten Banden an der Gesamtschwärzung der elektrophoretisch getrennten Proteinen in subzellulären Fraktionen des Hinterhirns (B) und des Kleinhirns (C) eines Se(-)-Tieres

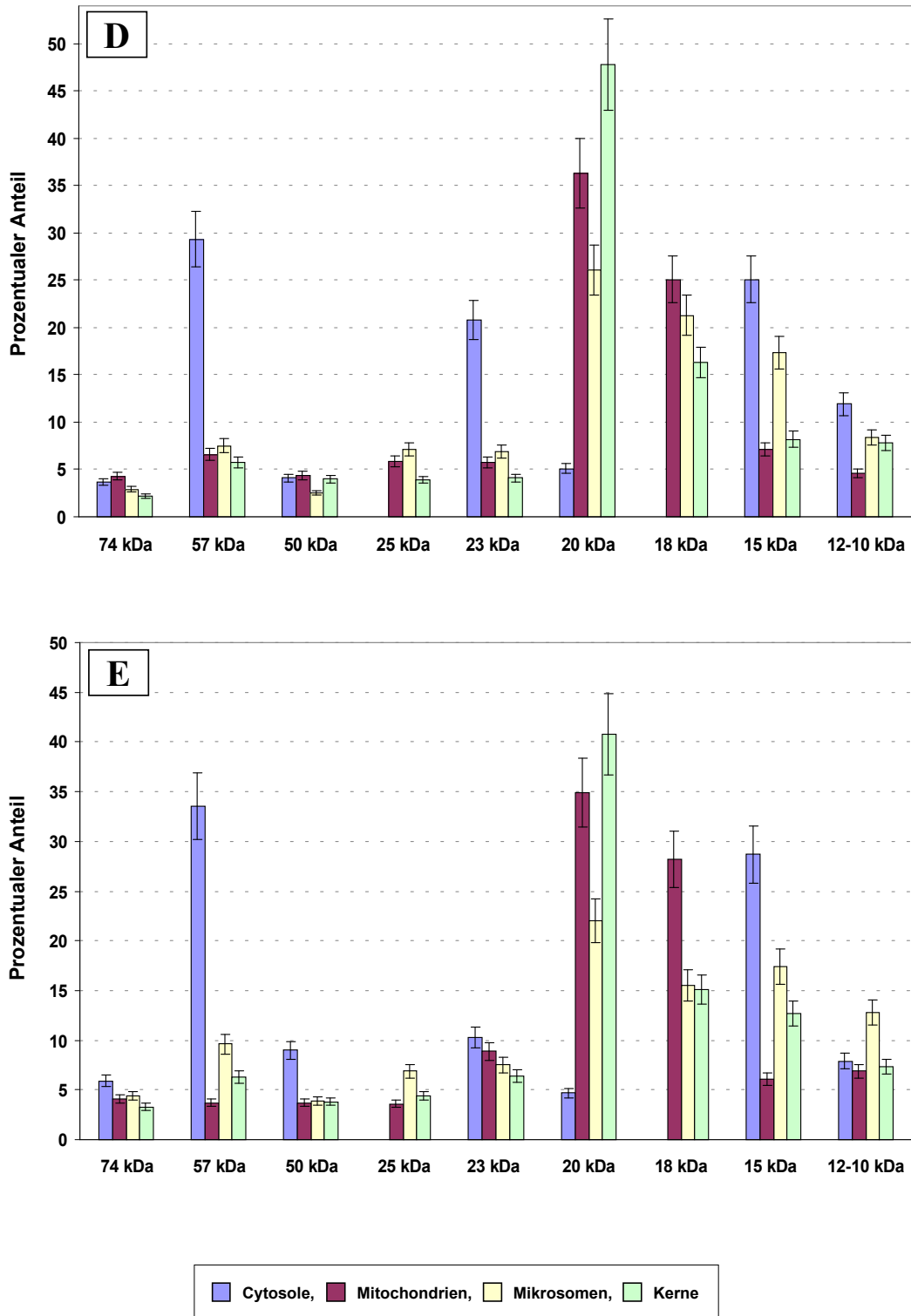


ABBILDUNG 4.13: Prozentuale Anteile der  $^{75}\text{Se}$ -markierten Banden an der Gesamtschwärzung der elektrophoretisch getrennten Proteinen in subzellulären Fraktionen des Hirnstammes (D) und des Hippocampus (E) eines  $\text{Se}(-)$ -Tieres

In den Diagrammen der subzellulären Fraktionen fallen zunächst die Werte für die Schwärzungen bei 57 kDa in den cytosolischen Fraktionen auf. Sie lagen zwischen 25 % im Kleinhirn und 34 % im Hippocampus. Die prozentualen Schwärzungen der Banden bei 74 kDa, 50 kDa, 25 kDa und 57 kDa lagen in allen subzellulären Fraktionen, außer im Cytosol zwischen 3 % und 6 %. In den Fraktionen der Cytosole fehlten die Banden bei 25 kDa völlig, was vermutlich auf die schlechte elektrophoretische Trennung zurückzuführen war. Die prozentualen Anteile der Schwärzungen der Banden bei 23 kDa in der jeweiligen Hirnregion nahmen in der Reihenfolge Cytosol, mitochondriale Fraktion, mikrosomale Fraktion und Kernfraktion um jeweils 1 – 4 % ab. Eine Ausnahme bildete hier der Hirnstamm. Auf diese Auffälligkeit wird im späteren Text noch genauer eingegangen.

Die Schwärzungen bei 18 kDa fehlten in den Cytosolen aller Hirnregionen, wegen der Membranbindung des 18 kDa-Selenoproteins. Der Molekularmassenbereich von 15 kDa wurde in den Cytosolen, den mikrosomalen Fraktionen und den Kernfraktionen zu einem größeren Anteil markiert als in den mitochondrialen Fraktionen. In den Cytosolen lagen die Schwärzungen der 15 kDa Banden zwischen 24 % im Hinterhirn und 41 % im Kleinhirn, in den mikrosomalen Fraktionen zwischen 17 % im Hirnstamm und 23 % im Hinterhirn. In den Kernfraktionen lagen sie zwischen 8 % im Hirnstamm und 17 % im Vorderhirn. Im Gegensatz dazu die Schwärzungen bei 15 kDa in den mitochondrialen Fraktionen nur im Bereich zwischen 6 % im Hippocampus und 8 % im Kleinhirn. Die prozentualen Anteile der Schwärzungen im Molekularmassenbereich von 12 – 10 kDa an den Gesamtschwärzungen der subzellulären Fraktionen waren in den mitochondrialen Fraktionen am geringsten und lagen zwischen 5 % im Hirnstamm und 8 % im Hinterhirn. Die Schwärzungen der Fraktionen des Cytosols variierten zwischen 8 % im Hippocampus und 19 % im Vorderhirn. Die prozentualen Anteile der Schwärzungen bei 12 – 10 kDa lagen in den mikrosomalen Fraktion und den Kernfraktionen zwischen 8 % im Hirnstamm und 13 % im Hippocampus bzw. 7 % im Kleinhirn und 10 % im Hinterhirn.

Bemerkenswert war im Cytosol des Kleinhirns die besonders starke Schwärzung der Bande bei 15 kDa. Ihr prozentualer Anteil an der gesamten Schwärzung betrug 41 % und überstieg damit die Werte der anderen Fraktionen um mehr als 12 %. Die Abnahme des prozentualen Anteils der Banden bei 57 kDa und bei 12–10 kDa war zumindest teilweise durch die stark erhöhte Markierung der 15 kDa-Bande verursacht.

In dem Diagramm des Hirnstammes wurden zwei interessante Unterschiede zu den anderen Hirnregionen gefunden. Der Anteil der Schwärzung der Bande bei 23 kDa wies

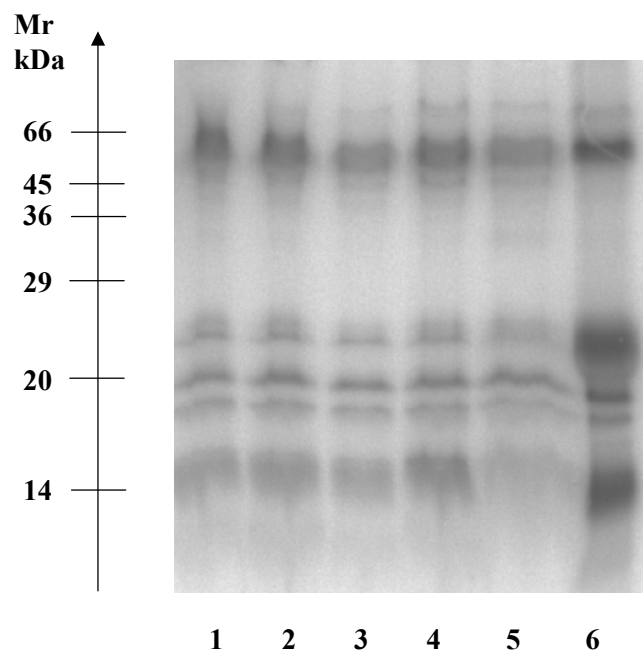
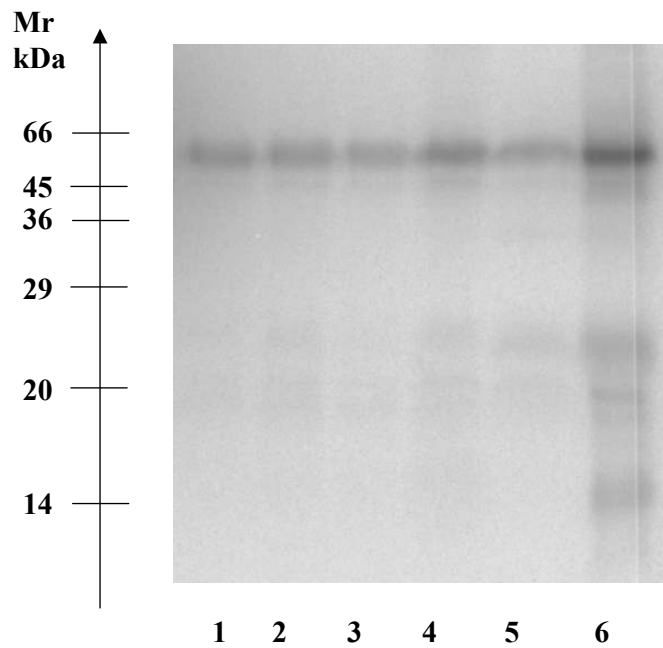
im Cytosol einen deutlich höheren Wert auf. Er lag um 8 – 10 % über den entsprechenden Schwärzungen der 23 kDa Bande in den anderen Hirnregionen. Zum Zweiten war der Prozentsatz für die Bande bei 20 kDa in der Kernfraktion des Hirnstammes sowie des Hippocampus erhöht. Ihr prozentualer Anteil lag bei 48 % und 41 % und somit um 17 % bzw. 10 % über den Prozentsätzen der anderen Hirnregionen.

### 4.2.5 Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der Inkorporation von Selen im Gehirn

In den bisherigen Versuchen wurden  $^{75}\text{Se}$ -markierte Gewebe von Tieren aufgearbeitet, die 6 Tage nach der Markierung getötet worden waren. Dieser Versuch sollte die Frage klären, wie schnell Selen bei Selenmangel vom Hirngewebe im Vergleich zu anderen Geweben aufgenommen und dort zur Biosynthese von Selenoproteinen verwendet wird. Es wurden Se(-)-Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten nach Gabe des Radiotracers  $^{75}\text{Se}$  getötet. Als Markierungsdauer wurden 3 Stunden, 24 Stunden und 6 Tage gewählt. Die Proben wurden wie unter 3.3.1.5 beschrieben gewonnen. Nach Proteinbestimmung, Aktivitätsmessung, elektrophoretischer Trennung nach Lämmli, Färben der Proteine und Trocknung der Gele wurden die  $^{75}\text{Se}$ -markierten Proteine autoradiographisch nachgewiesen. In Abbildung 4.14 sind die Autoradiogramme der Hirnregionen und der Hypophyse nach Markierungsperioden von 3 Stunden und 24 Stunden dargestellt. In den Autoradiogrammen fällt auf, dass nach 3 Stunden im wesentlichen nur eine  $^{75}\text{Se}$ -markierte Proteinbande bei 57 kDa vorhanden war. Offensichtlich wurde in 3 Stunden noch kein anderes Selenoprotein in nachweisbarer Menge synthetisiert. In der Hypophyse wurden schon nach 3 Stunden schwache Banden aller bekannten selenhaltigen Proteine gefunden. In der Leber, Niere und Milz waren zu diesem Zeitpunkt schon alle bekannten  $^{75}\text{Se}$ -markierten Banden deutlich erkennbar. Nach 24-stündiger Markierung mit  $^{75}\text{Se}$  war in allen Hirnregionen und auch in der Hypophyse das bekannte Muster der selenhaltigen Proteine vorhanden.

Die Autoradiogramme der Gewebe nach 6-tägiger Markierung wurden hier nicht dargestellt, da sie die bekannten Muster der selenhaltigen Proteine in gewohnter Stärke zeigten. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen wird deutlich, dass Selen entweder zeitverzögert in das Gehirn aufgenommen oder dort langsamer in Selenoproteine inkorporiert wird.



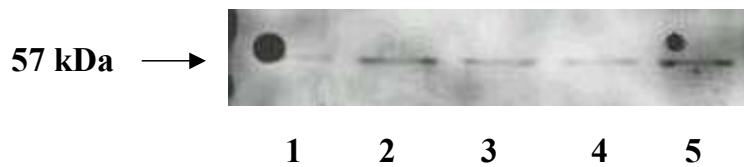


1: Vorderhirn, 2: Hinterhirn, 3: Kleinhirn  
4: Hirnstamm, 5: Hippocampus, 6: Hypophyse

ABBILDUNG 4.14: Autoradiogramm der selenhaltigen Proteine der Homogenate von verschiedenen Hirnregionen und der Hypophyse eines  $\text{Se}(-)$ -Tieres nach 3-stündiger (oben) und 24-stündiger Markierungsdauer (unten)

#### 4.2.5.1 Immunologische Identifikation der selenhaltigen Bande bei 57 kDa

Im vorangegangenen Abschnitt wurde im Autoradiogramm der  $^{75}\text{Se}$  markierten Hirnregionen und der Hypophyse nach 3 Stunden Markierungsdauer eine selenhaltige Proteinbande bei 57 kDa gefunden. Zur Identifizierung dieses Proteins wurde ein Western Blot mit einem Antikörper gegen das Selenoprotein P durchgeführt. Nach anschließender Inkubation mit einem sekundären, Alexa580-gekoppeltem Antikörper (anti-Rabbit-Alexa580, LI-COR, Bad Homburg) wurde der Immunoblot mit Odyssey® (LI-COR, Bad Homburg) gescannt. In Abbildung 4.15 ist der Scan dargestellt.



1: Vorderhirn, 2: Hinterhirn, 3: Kleinhirn, 4: Hirnstamm, 5: Hippocampus

ABBILDUNG 4.15: Western-Blot der Hirngewebe eines  $\text{Se}(-)$ -Tieres nach einer Markierungsdauer von 3 Stunden

In allen Hirnregionen wurde Selenoprotein P erkannt. Auf eine Quantifizierung des Antigens wurde in dieser Untersuchung jedoch verzichtet. Die Position des Antigens entspricht der Position der  $^{75}\text{Se}$ -markierten Bande im Autoradiogramm der Hirngewebe nach 3 Stunden Markierung mit dem Radiotracer. Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung aus dem vorangegangenen Kapitel. Nach 3 Stunden Markierungsdauer ist im Gehirngewebe nur eine Bande eines selenhaltigen Proteins bei 57 kDa in nachweisbaren Mengen vorhanden, und zwar handelt es sich dabei um das Selenoprotein P. Vor der Präparation der Proben wurde das Gefäßsystem des Tieres nicht perfundiert. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass das nachgewiesene Selenoprotein P vollständig oder teilweise aus dem in den Kapillaren enthaltenem Blutplasma stammte.

### 4.3 Markierungen von Zell-Linien mit $^{75}\text{Se}$

In den folgenden Abschnitten werden Ergebnisse aus Markierungsstudien mit dem Radiotracer  $^{75}\text{Se}$  an Zellkulturen beschrieben. Diese Untersuchungen wurden in Ergänzung zu den Untersuchungen an Geweben der mit  $^{75}\text{Se}$  markierten Tieren durchgeführt. Hierbei sollten einzelne Zelltypen des Hirngewebes auf ihre Expressionsmuster der selenhaltigen Proteine untersucht werden.

Die Grundlage für die Funktion des Gehirns bildet das Zusammenwirken seiner unterschiedlichen Zellen. Die Arbeit der Neuronen wird von verschiedenen Gliazelltypen unterstützt. In den Großhirnen der Wirbeltiere können Mikroglia, Astroglia und Oligodendrocyten unterschieden werden. Außerdem sind in den zahlreichen Kapillaren des stark durchbluteten Hirngewebes auch cerebrale Endothelzellen enthalten, die das Gefäß auskleiden. Auf der Seite des Hirngewebes werden sie von Endfüßchen der Astrocyten dicht umschlossen. Die Untersuchung dieser zellulären Struktur an der Grenzfläche Blutgefäß–Hirngewebe, die als Blut-Hirnschranke bezeichnet wird, war Teil dieser Arbeit. In späteren Kapiteln wird ausführlicher auf die Blut-Hirnschranke eingegangen.

Für die Studie wurden Zell-Linien der genannten Zelltypen: HT22 (Neuronen), BV2 (Mikroglia), U 373 (Astrocyten), OLN-73 (Oligodendrocyten) und rBCEC4 (cerebrale Endothelzellen) genutzt. Die Markierung von Zellkulturen mit  $^{75}\text{Se}$  bietet Vorteile, hat aber auch gegenüber den Traceruntersuchungen im Gewebe einige Nachteile. Da jede Zelle während einer Passage der Zellkultur mehrere Proliferationszyklen durchlief und Selen in Selenoproteine einbaute, nahm die Konzentration des Radiotracers im Kulturmedium ab. Die selenhaltigen Proteine wurden unabhängig von ihrem spezifischen Turn-over mit  $^{75}\text{Se}$  markiert, jedoch sank das Selenangebot mit zunehmender Zelldichte. Ein großer Vorteil der  $^{75}\text{Se}$ -Markierung *in vitro* ist die stärkere Markierung, die es erlaubt, geringere Proteinmengen auf die SDS-PAGE aufzutragen und damit eine bessere elektrophoretische Trennung zu erreichen. Sehr vorteilhaft für die Trennung der Proteine aus den Zellkulturen ist auch der geringere Fettanteil, der bei Proben der Hirngewebe zu Problemen führte. Die Vorteile der  $^{75}\text{Se}$ -Markierung *in vitro*, ermöglichen gleichfalls gute 2-dimensionale Proteintrennungen. Ein Nachteil der Untersuchung der Proteinexpression von immortalisierten Zell-Linien ist, dass durch die Einfügung eines viralen Gens oder eines Tumorgens ihr Genotyp manipuliert wurde. Ein zweiter Nachteil ist die Mono-Kultivierung, da diese die phänotypischen und möglicherweise auch auf die genotypischen Eigenschaften beeinflussen kann.

## 4 Ergebnisse

Bei dieser erstmalig durchgeführten systematischen Untersuchung des zelltypspezifischen Expressionsmusters selenhaltiger Proteine an Hirnzellen wurden die genannten nachteiligen Einflüsse zunächst vernachlässigt. Die Zellen wurden nach einer Passage in der Dichte ( $1,3 \cdot 10^4$  bis  $4 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>) ausplattiert und anschließend durch den Zusatz einer entsprechenden Menge an Radiotracer in das Kulturmedium markiert. Dieser Markierungsansatz wurde bis zur Ernte der Kultur nicht verändert. Eine Trennung der Zell-Lysate durch Zentrifugation bei  $120\,000 \times g$  in eine cytosolische und eine pelletierte Fraktion ermöglichte erste Informationen über die Lokalisation eines Proteins.

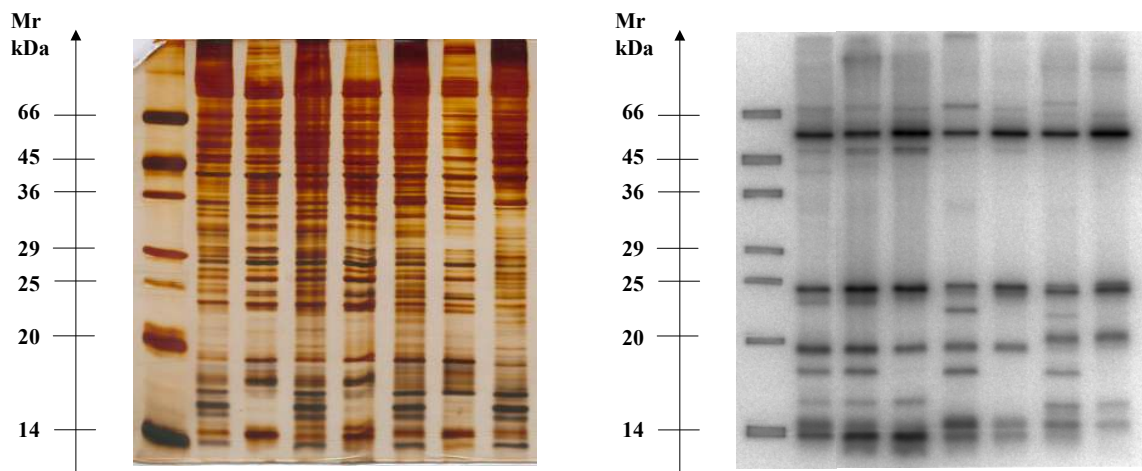


ABBILDUNG 4.16: Gel mit silbergefärbten Proteinen aus kultivierten Zellen nach elektrophoretischer Trennung (links) und das dazugehörige Autoradiogramm (rechts)

Die Abbildung 4.16 zeigt exemplarisch ein silbergefärbtes Gel nach elektrophoretischer Proteintrennung von Zell-Lysaten aus den Zellkulturen. Dieses Beispiel verdeutlicht die hohe Trennschärfe bei geringer Proteinmenge sowie den guten autoradiographischen Nachweis durch kurze Expositionszeiten. Bei einem Gelauftrag von  $50 \mu\text{g}$  Protein in einer  $0,8\text{ cm}$  langen und  $1,2\text{ mm}$  breiten Probenzelle konnten die Proteine nach Elektrophorese über einer Trenngelstrecke von  $12,5\text{ cm}$  noch mit der Silberfärbung nach Rabilloud erfasst werden. Die Expositionsdauer dieses Gels betrug  $64$  Stunden. Diese Trennschärfe und der Grad der Markierung konnte nicht durch die  $^{75}\text{Se}$ -Markierung eines  $\text{Se}(-)$ -Tieres erreicht werden. Um die Proteine des Molekularmarkers auch im Autoradiogramm nachweisen zu können, wurden die gefärbten Proteinbanden der Markerproteine auf dem getrockneten Gel mit  $^{75}\text{Se}$ -markiertem Filterpapier überklebt.

### 4.3.1 Kultivierung und Markierung der Zell-Linien

Das Gewebe des Gehirns besteht aus funktional unterschiedlichen Zelltypen. Um der Frage nach zelltypspezifischen Unterschieden in der Expression selenhaltiger Proteine nachzugehen, wurden Zell-Linien der verschiedenen Hirnzellen kultiviert.

#### 4.3.1.1 Die verwendeten Zell-Linien

Diese wurden typgerecht und wie im Abschnitt 3.3.3.1 (S. 40 f.) beschrieben kultiviert.

- Die verwendeten neuronalen Zellen HT22 wurden als glutamat-sensitiver Subklon aus immortalisierten, hippocampalen Neuronen (HT4) gewonnen [194, 195].
- Die mikroglialen Zellen BV2 wurden aus murinen Mikrogliazellen gewonnen, die durch Infektion mit einem v-raf/v-myc tragenden Retrovirus (J2) von Blasi und Mitarbeitern immortalisiert worden waren [196].
- Die Oligodendrocyten OLN-93 wurden als Subklon einer gemischten Gliazell-Kultur neugeborener Wistar-Ratten gewonnen [197].
- Die humanen Astrocyten U-373 wurden durch Transfektion einer gemischten Gliazell-Kultur von fötalem Hirngewebe mit einer SV40-Mutante gewonnen [198].
- Für Untersuchungen in cerebralen Endothelzellen wurde die Zell-Linie rBCEC4 verwendet. Aus Kapillaren des Gehirns von 3 Wochen alten Wistar-Ratten wurden die Endothelzellen isoliert und mit dem T-Antigen des Polyoma-Virus immortalisiert [199].

Die folgenden mikroskopischen Aufnahmen 4.17, 4.18 und 4.19 zeigen die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kulturen der Zell-Linien.

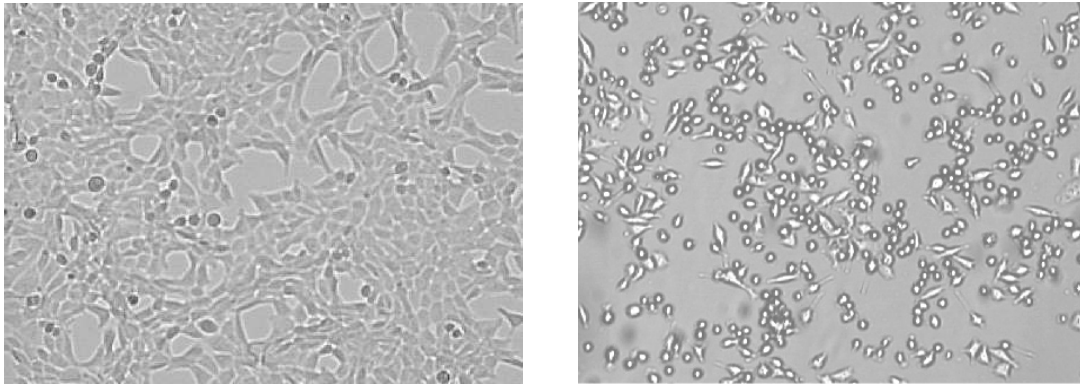


ABBILDUNG 4.17: Mikroskopische Phasenkontrast-Aufnahme von HT22 (links) und BV2 (rechts)

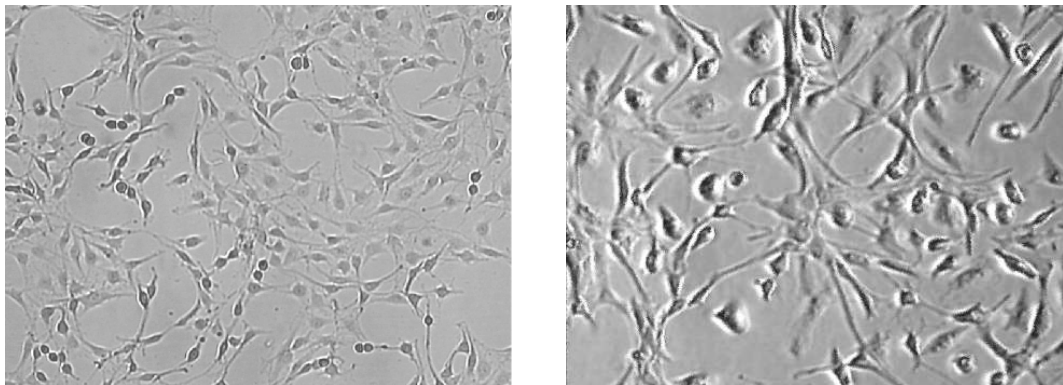


ABBILDUNG 4.18: Mikroskopische Phasenkontrast-Aufnahme von OLN-93 (links) und U-373 (rechts)

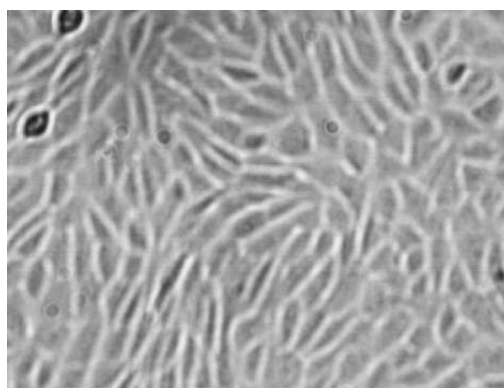
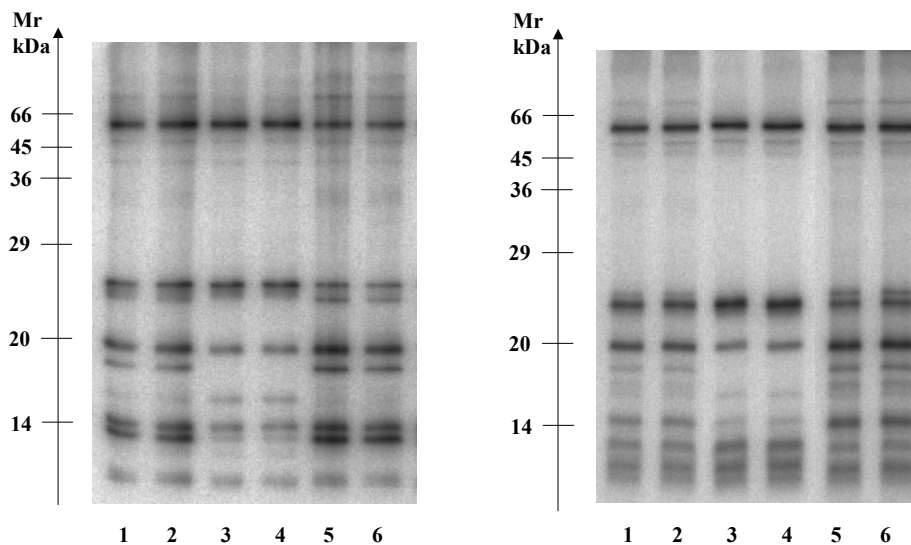


ABBILDUNG 4.19: Mikroskopische Phasenkontrast-Aufnahme von rBCEC4

#### 4.3.1.2 Markierung der Zell-Linien mit $^{75}\text{Se}$

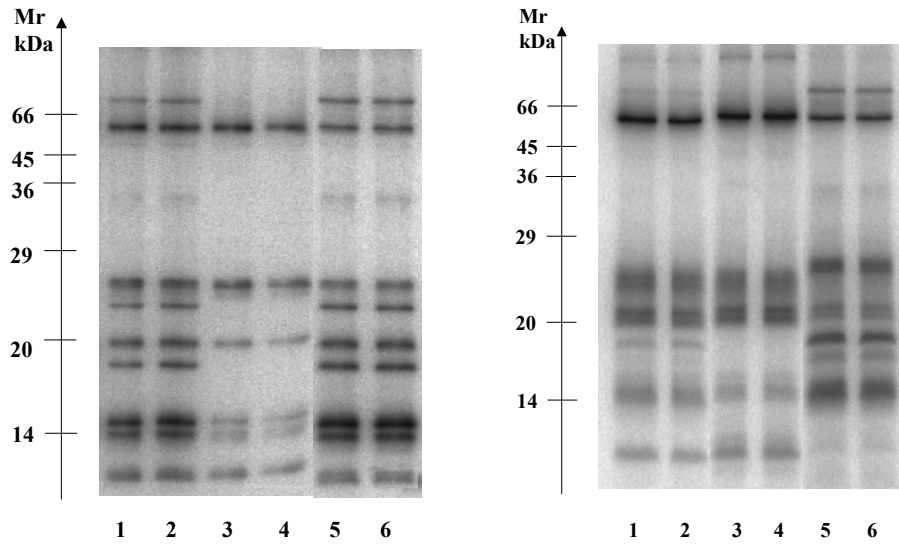
Die Zell-Linien der unterschiedlichen Hirnzelltypen wurden jeweils in einer Zelldichte zwischen  $1,4 \cdot 10^4 - 2,0 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-2}$  ausplattiert. Nach 5 Stunden wurde ihrem Kulturmedium  $^{75}\text{Se}$  (mit einer Aktivität von  $0,8 \text{ MBq}$  pro  $150 \text{ cm}^2$ -Kulturschale) als Natriumselenit zugesetzt und mit nicht-radioaktiven Natriumselenit zu  $80 \text{ nM}$  ergänzt. Die Zellen wurden nach ihrer Ernte jeweils in  $20 \text{ mM}$  Tris pH 7.4 aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung lysiert. Die Lysate wurden bei  $120\,000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Diese Zentrifugation trennte die cytosolischen Proteine (Überstand) von den membrangebundenen bzw. in Zellkompartimenten enthaltenen Proteinen (Pellet). Die pelletierten Fraktionen jeder Probe wurden in  $50 \text{ mM}$  Tris pH 7.4 resuspendiert. Die Proteine der Fraktionen der verschiedenen Zell-Linien wurden durch Gelelektrophorese nach Lämmli getrennt. Dabei wurde für jede Probe einer Fraktion die gleiche Proteinmenge verwendet. Nach Färbung der Proteine und Trocknung der Gele wurden die  $^{75}\text{Se}$ -markierten Proteine mittels Autoradiographie detektiert. In den Abbildungen 4.20, 4.21 und 4.22 sind die Autoradiogramme für jede Zell-Linie dargestellt. Die erhaltenen Autoradiogramme wurden mit denen der  $^{75}\text{Se}$ -markierten Proteine aus den Geweben des Gehirns verglichen.



1 + 2: Zell-Lysate, 3 + 4: Cytosole, 5 + 6: Pellet nach  $120\,000 \times g$

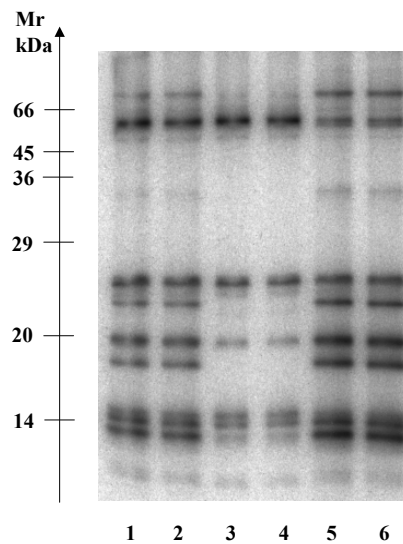
ABBILDUNG 4.20: Autoradiogramme der  $^{75}\text{Se}$ -markierten Proteine nach elektrophoretischer Trennung der Zell-Linien der HT22 (rechts) und BV2 (links)

## 4 Ergebnisse



1 + 2: Zell-Lysate, 3 + 4: Cytosole, 5 + 6: Pellets nach  $120\,000 \times g$

ABBILDUNG 4.21: Autoradiogramme der <sup>75</sup>Se-markierten Proteine nach elektrophoretischer Trennung der Zell-Linien der OLN-93 (rechts) und der U373 (links)



1 + 2: Zell-Lysate, 3 + 4: Cytosole, 5 + 6: Pellets nach  $120\,000 \times g$

ABBILDUNG 4.22: Autoradiogramme der <sup>75</sup>Se-markierten Proteine nach elektrophoretischer Trennung der Zell-Linie der rBCEC4



In den Autoradiogrammen der mit  $^{75}\text{Se}$  markierten Zellkulturen wurde ähnliche Banden der selenhaltigen Proteinen gefunden wie in den elektrophoretisch aufgetrennten  $^{75}\text{Se}$ -markierten Gewebeproben des Gehirns.

Einen Überblick zu den Ergebnissen dieser Markierungsstudie gibt die folgende Tabelle 4.3. In die Spalten der Tabelle wurden jeweils die Zell-Linien eingetragen. Dabei wurden jeweils die Fraktionen: Lysat (L), Cytosol (C) und Pellet (P) unterschieden. In den Zeilen sind diejenigen Molekularmassenbereiche aufgeführt, in denen in mindestens einer Zell-Linie  $^{75}\text{Se}$ -markierte Proteinbanden gefunden wurden. Die Stärke der Markierung wurde durch verschiedene Symbole angegeben. Die an dieser Stelle präsentierten Ergebnisse der Proteintrennungen  $^{75}\text{Se}$ -markierter Zellkulturen wurden durch weiteren SDS-Gelelektrophoresen bestätigt.

$^{75}\text{Se}$ -markierte Banden	HT22			BV2			OLN-93			U-373			rBCEC4		
	L	C	P	L	C	P	L	C	P	L	C	P	L	C	P
74 kDa	◐		○	◐		○	◐		◐	◐		◐	◐		◐
57-53 kDa	◐	◐	◐	◐	◐	◐	◐	◐	◐	◐	◐	◐	◐	◐	◐
50 kDa	◐	◐	◐	◐	◐	◐							◐	◐	◐
48-46 kDa	◐	◐	◐	◐	◐	◐	◐	◐							
42-40 kDa	◐	◐	◐												
34-33 kDa			◐	◐		◐	◐		◐			◐	◐		○
25 kDa	◐	◐	◐	◐		○	◐	◐	◐	◐		◐	◐	◐	◐
23 kDa	○	○	◐	◐	●	◐				◐	◐		◐		◐
22 kDa							◐		◐				◐		◐
20 kDa	◐	◐	◐	◐	○	●	◐	○	●	◐	◐	◐	◐	○	●
18 kDa	◐		◐	◐		○	◐		●	○		◐	◐		●
16 kDa	◐	◐	◐	◐	○	○				◐		○			
15 kDa	◐	○	◐	◐	◐	◐	●	○	●	○	○	◐	◐	○	●
14 kDa	◐	◐	◐				◐		●				◐	◐	●
13-12 kDa				◐	◐	◐									
10 kDa	◐	◐	◐	◐	◐	◐	◐	◐	◐	○	○	◐	◐	◐	◐
9 kDa				◐	◐	○						◐			

TABELLE 4.3: Tabellarische Darstellung der gefundenen  $^{75}\text{Se}$ -markierten Proteinbanden in den untersuchten Zell-Linien der Hirnzellen;  
Stärke der Markierung: ◐ = sehr schwach, ○ = schwach, ◐ = mittel, ● = stark

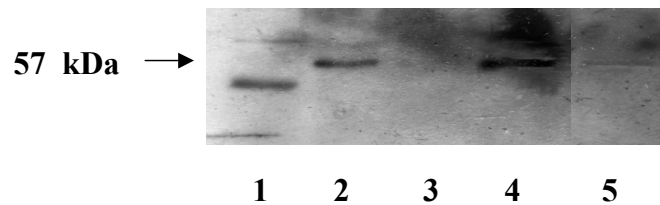
Bei den Autoradiogrammen der Proben von HT22, OLN-93 und rBCEC4 fällt auf, dass die Zell-Cytosole anscheinend schwächer mit  $^{75}\text{Se}$  markiert worden waren. Dieser Effekt wurde jedoch in weiteren Versuchen nicht mehr beobachtet.

In den Lysaten sowie in den Pellets der OLN-73 und der rBCEC4 wurden im Molekularmassenbereich von 74 kDa eine Bande stärker mit  $^{75}\text{Se}$  markiert als in den anderen Zell-Linien. Der augenfälligste Unterschied zwischen den Zellen trat bei der  $^{75}\text{Se}$ -markierten Bande bei 22 kDa auf, die nur in den OLN-93 und den rBCEC4 gefunden wurde. In den Proben der HT22, OLN-93 und rBCEC4 konnten bei den Massen 15/14 kDa zwei Proteinbande unterschieden werden. Diese Besonderheit könnte auf mehrere selenhaltige Proteine in diesem Massenbereich in Neuronen, Oligodendrocyten und Endothelzellen hinweisen. Auffällig waren auch in den Proben der BV2 mehrere deutlich markierte Banden der Molekularmassen 13 – 12 kDa, 10 kDa und 9 kDa, von denen nur die Bande bei 10 kDa in den übrigen Zell-Linien deutlich nachgewiesen werden konnte. Besonders stark waren  $^{75}\text{Se}$ -markierte Banden mit den Molekularmassen von 23 kDa (Cytosole) und 20 kDa (Pellets) in den Proben aus BV2. Eine starke Markierung wurde bei 53 – 57 kDa in den Lysaten und den Cytosolen der U-373 detektiert.

Aus dem Vorhandensein einer  $^{75}\text{Se}$ -markierten Bande in der cytosolischen oder pelletierten Fraktion können erste Aussagen zur Lokalisation des entsprechenden selenhaltigen Proteins gemacht werden. Denkbar ist auch, dass bei der betreffenden Molekularmasse mehrere Proteine liegen, deren unterschiedliche Verteilung eventuell durch eine subzelluläre Fraktionierung sichtbar gemacht werden kann. So scheinen die Proteine, deren Banden im Autoradiogramm bei 74 kDa und bei 18 kDa lagen, membrangebunden zu sein. Das selenhaltige Protein, dessen Bande bei ca. 16 kDa detektiert wurde, ist wahrscheinlich cytosolisch lokalisiert oder schwach an Membranstrukturen assoziiert. Die schwachen Banden bei ca. 34 – 33 kDa wurden von membrangebundenen Proteinen oder Proteinen, die in Zellkompartimenten enthalten sind, verursacht. Die  $^{75}\text{Se}$ -Markierung von Zell-Linien verschiedener Zelltypen des Gehirns und deren proteochemischer Analyse lieferte interessante Ergebnisse. Abschließend muß jedoch betont werden, dass die gefundenen zelltypspezifischen Unterschiede in der Expression von selenhaltigen Proteinen (22 kDa in OLN-93 und rBCEC4, 16 kDa in HT22 und BV2 sowie 13 – 12 kDa und 9 kDa in BV2) der Absicherung durch andere experimentelle Methoden, z.B. immunologischen und molekularbiologischen Techniken, bedarf.

## 4.4 Zelluläre Verteilung von Selenoprotein P

Bei den Neuronen HT22, Mikroglia BV2, Oligodendrocyten OLN-93, Astrocyten U-373 und cerebralen Endothelzellen rBCEC4, die als Zell-Linien für die verschiedenen Hirnzellen untersucht worden waren, sollte in dieser Untersuchung das Vorhandensein des Selenoprotein P durch immunologische Reaktion mit einem spezifischen Antikörper überprüft werden. Hierfür wurde die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus den Cytosolen der verschiedenen Hirnzellen geblottet und im Western-Blot auf Selenoprotein P getestet. Nach Inkubation mit einem sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörper wurden die Banden des Antigens durch ECL-Behandlung auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Die Abbildung 4.23 zeigt den gescannten Western-Blot mit anti-Selenoprotein P.



1: HT22; 2: BV2; 3: U-373; 4: OLN-93; 5: rBCEC4

ABBILDUNG 4.23: Immunologischer Nachweis von Selenoprotein P in den verschiedenen Zell-Linien der Hirnzellen

Das Selenoprotein P wurde in allen Hirnzellen mit Ausnahme der U-373 erkannt. Dieses Ergebnis bei den humanen Astrocyten könnte auf die andere Spezies des Antigens zurückzuführen. Die Molekularmassen der markierten Banden im Western-Blot entsprechen den Positionen der  $^{75}\text{Se}$ -markierten Banden in den Autoradiogrammen der Hirnzellen. In den HT22 scheint eine geringfügig kleinere Isoform des Selenoprotein P vorhanden zu sein. Es wurde eine Bande bei ca. 54 – 53 kDa erkannt. Bei der zusätzlichen Schwärzung bei ca. 60 kDa in diesen Zellen handelte es sich wahrscheinlich um einen Artefakt, denn in weiteren Western-Blots wurde dort keine Bande detektiert.

Die Resultate dieser Untersuchung bedürfen einer Absicherung durch weitere Experimente an den aus Hirngewebe präparierten primären Zellen sowie der eindeutigen Identifizierung des Selenoproteins P durch die Sequenzierung des Proteins in diesen Zellen.

## 4.5 Untersuchungen durch 2D-Gelelektrophorese

In Weiterführung der Untersuchungen zur Expression von selenhaltigen Proteinen in den verschiedenen Zelltypen des Gehirns wurden 2-dimensionale Gelelektrophoresen durchgeführt. Dazu wurde mit  $^{75}\text{Se}$  markierte Proteinproben jeder Zell-Linie verwendet. Die Proteinproben wurden wie im Abschnitt 3.5.3 beschrieben in pH-Gradienten entsprechend ihrem IP-Wert fokussiert und anschließend in einer Gelelektrophorese nach Lämmli nach ihrer Molekularmasse aufgetrennt. Die Proteine in den Gelen wurden gefärbt, die Gele getrocknet und die  $^{75}\text{Se}$ -markierten Proteine durch Autoradiographie nachgewiesen. In den Abbildungen 4.24, 4.25 und 4.26 sind die Autoradiogramme der Cytosole aus HT22, OLN-93 und rBCEC4 sowie die Lysate aus BV2 und U-373 als repräsentative Beispiele dargestellt. Bei diesen Autoradiogrammen wurden die schon oben beschriebenen Vorteile in der Trennschärfe der Gelelektrophoresen bei Proben aus der Zellkultur gegenüber Proben aus dem Hirngewebe deutlich. Eine sehr gute Trennung wurde insbesondere bei den Proben der Cytosole aus HT22, rBCEC4 und dem U-373-Lysat erreicht. Die Proteinproben aus dem Cytosol von OLN-93 und dem Lysat von BV2 wurden nicht so gut fokussiert bzw. waren nicht ausreichend stark mit  $^{75}\text{Se}$  markiert. Beim Vergleich der Autoradiogramme der verschiedenen Zelltypen des Gehirns wurden sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede festgestellt.

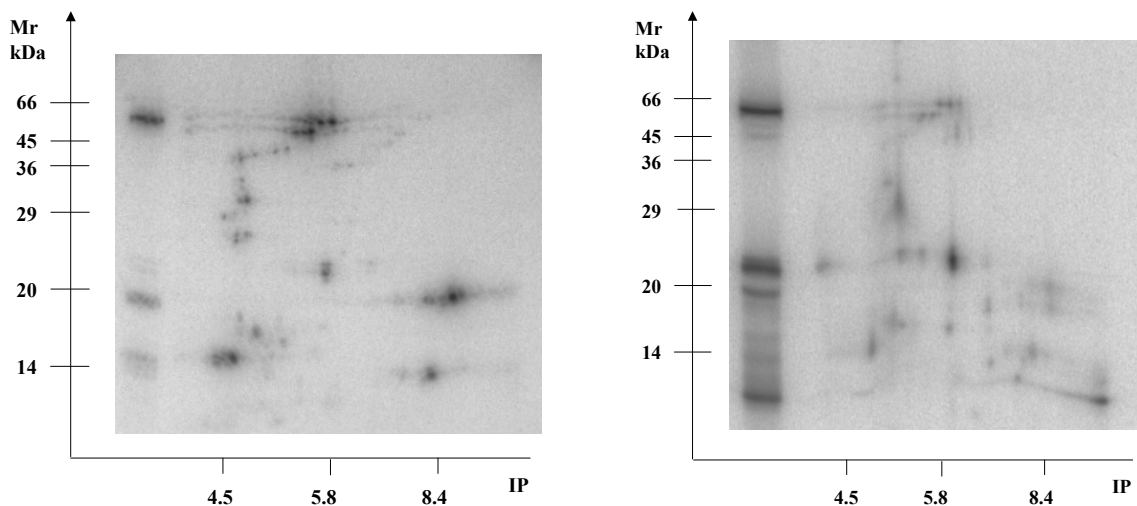


ABBILDUNG 4.24: Autoradiogramme der selenhaltigen Proteine des Cytosols aus HT22 (links) und des Lysats aus BV2 (rechts) nach zweidimensionaler Proteintrennung

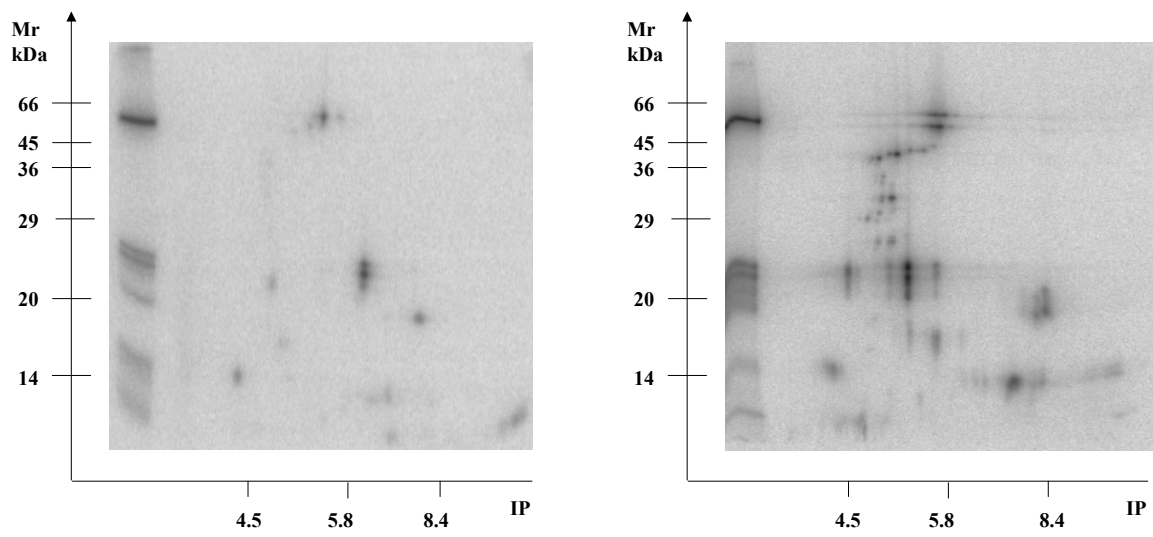


ABBILDUNG 4.25: Autoradiogramme der selenhaltigen Proteine des Cytosols aus OLN-93 (links) und des Lysats aus U-373 (rechts) nach zweidimensionaler Proteintrennung

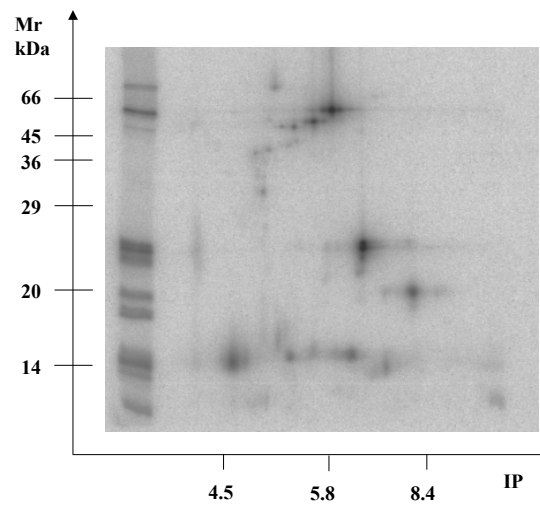


ABBILDUNG 4.26: Autoradiogramm der selenhaltigen Proteine des Cytosols aus rBCEC4 nach zweidimensionaler Proteintrennung

In den Autoradiogrammen der Proteinproben aus BV2 und rBCEC4 wurde das *in silico* identifizierte Selenoprotein O bei 74 kDa mit einem IP von 4.8 – 5.0 gefunden. In allen Zelltypen wurden mehrere Spots bei 57 kDa und bei 53 kDa mit IP-Werten von 5.2 – 5.5 und 5.2 – 5.8 detektiert. Sehr deutlich waren diese in den Proteinproben aus HT22, U-373 und rBCEC4. Es ließen sich zwei bis vier Spots unterscheiden, die einen geringfügig unterschiedlichen IP-Wert aufwiesen. Im Molekularmassenbereich zwischen 45 kDa und 27 kDa wurden in den Proben aus HT22, BV2, U-373 und rBCEC4 bis zu 10 Spots von selenhaltigen Proteinen erkannt, die im einzelnen noch keinen bekannten Selenoproteinen eindeutig zugeordnet werden konnten.

In der Proteinprobe aus OLN-93 wurde in diesem Massenbereich, wahrscheinlich wegen zu geringer Markierung mit  $^{75}\text{Se}$ , kein Spot gefunden. Weiterhin wurden zwei Spots bei ca. 23 und 25 kDa im IP-Bereich von 5.8 – 6.0 nachgewiesen. Der Spot bei 23 kDa erschien in den Proben von OLN-93 und rBCEC4 im weniger basischen IP-Bereich bei 7.0 – 7.4. In allen Proben der unterschiedlichen Zelltypen wurde bei 20 kDa ein Spot mit IP-Werten von 8.0 – 8.5 nachgewiesen. In den Proteinproben der Lysate von BV2 und U-373 wurde ein Spot bei ca. 18 kDa mit einem IP-Wert von 4.8 – 5.2 erkannt, der anscheinend von einem membrangebundenem Protein stammte. Bei der Molekularmasse von ca. 16 kDa konnte in allen Zelltypen außer in den U-373 ein selenhaltigen Proteins bei IP-Werten von 4.8 – 5.2 nachgewiesen werden.

Im Molekularmassenbereich von 15 – 14,4 kDa wurden mehrere selenhaltigen Proteinspots bei IP-Werten von 4.6 – 4.8 und bei 7.8 – 8.2 detektiert. Eine Ausnahme bildete hier die Proteinprobe von rBCEC4, in der noch weitere Spots bei IP-Werten von 5.2 – 5.6 und 5.8 – 6.2 erkannt wurden. Dies wird später besprochen. Bei 10 kDa und einem IP-Wert von 8.5 – 8.6 wurde in allen Zelltypen ein Spot gefunden (in den hier gezeigten Autoradiogrammen der HT22 und U-373 ist dieser Spot nicht erkennbar). In der Probe der BV2-Zellen war dieser 10 kDa-Spot sehr stark markiert.

Der auffälligste Unterschied zwischen diesen Autoradiogrammen nach 2-dimensionaler Proteintrennung war bei den selenhaltigen Proteinen der Molekularmasse von ca. 15 kDa in den rBCEC4 (cerebralen Endothelzellen) zu finden. Im Gegensatz zu den  $^{75}\text{Se}$ -markierten 15 kDa-Proteinen der HT22, BV2, OLN-93 und U-373, wo nur jeweils zwei Spots nach ihren IP-Werten getrennt wurden, wurden dort insgesamt vier selenhaltige Proteine mit IP-Werten von 4.6 – 4.8, 5.2 – 5.6, 5.8 – 6.2 und 7.8 – 8.2 detektiert. Hierbei handelt es sich demnach um endothel-spezifische Proteine.

Weiterhin war die Stärke der Markierung des Proteins bei 10 kDa in den BV2-Zellen sehr auffällig. Auch bei 12 kDa wurde hier ein schwacher Proteinspot gefunden. In den Autoradiogrammen variierte die Markierung des Spots bei 15 kDa mit dem IP von 4.6 – 4.8. Diese Beobachtung konnte auch bei verschiedenen Gelelektrophoresen derselben Probe gemacht werden.

#### 4.5.1 Zuordnung der $^{75}\text{Se}$ -markierten Proteinbanden zu den bekannten Selenoproteinen

Mit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms und den Kenntnissen der konservierten Nukleotide, die in den SECIS-Elemente von Selenoproteinen vorhanden sind, konnten Algorithmen entwickelt werden, um Sequenzen möglicher Selenoproteine in Datenbanken aufzuspüren [65,130]. Auf diese Weise wurden 25 humane Gene von Selenoproteinen gefunden.

Zu den bereits bekannten Selenoproteinen konnten *in silico* die folgenden identifiziert werden: Selenoprotein M, Selenoprotein T, Selenoprotein V, Selenoprotein H, Selenoprotein K, Selenoprotein S, Selenoprotein I und Selenoprotein O [65].

In dieser Arbeit wurden erste Versuche unternommen, die gefundenen  $^{75}\text{Se}$ -markierten Proteinspots der 2-dimensionalen Gelelektrophoresen den bekannten Selenoproteinen einschließlich der *in silico* identifizierten Selenoproteine zuzuordnen. Dafür wurden Ergebnisse aus mehreren Publikationen bewertet, darunter immunologische Nachweise und Berechnungen der theoretischen Werte für die Molekularmassen und IP-Werte der cysteinhaltigen-Mutationen (Cystein für Selenocystein). Die berechneten Molekularmassen stellten eine gute Näherung dar, denn pro Polypeptidkette ist nur ein Selenocystein-Rest enthalten, so dass insgesamt die Massendifferenz und die Differenz des IP vernachlässigt werden konnten. Nur im Falle des Selenoprotein P, das 10 Selenocystein-Reste aufweist, ist eine kleine Massenkorrektur um 0,4 kDa und die Korrektur des IP zu einem stärker sauren IP-Wert notwendig.

Auf den folgenden Seiten sind die sich daraus ergebenden, möglichen Zuordnungen der im Rahmen dieser Arbeit gefundenen  $^{75}\text{Se}$ -markierten Proteinspots aufgeführt.

- Der Proteinspot bei ca. 74 kDa mit dem IP von 4.8–5.0 stammte wahrscheinlich von dem bisher nur in silico identifiziertem Selenoprotein O [65]. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf ein Transmembranprotein hin, das besonders stark in Endothelzellen und Oligodendrozyten gefunden wurde.
- Bei der Molekularmasse 53-57 kDa wurden in dem IP-Bereich 5.2 – 6.0 drei bis vier Proteinspots nachgewiesen, und zwar sowohl in den Gewebe-Homogenaten als auch in den Gewebe-Cytosolen. Dabei handelte es sich wahrscheinlich um die Spleißformen der TrxR1 und TrxR3. Bisher sind vier cytosolische Isoformen (TrxR1I–III, TrxR3III) und eine mitochondriale Isoform (TrxR3I) beschrieben, ihre tatsächliche Anzahl ist jedoch noch nicht geklärt. Auch in den Protein-Datenbanken sind die theoretischen Daten noch nicht verfügbar (Stand April 2004).
- Unklar ist auch, welcher Proteinspot dieses Massenbereiches von Selenoprotein P (43 kDa) verursacht wird. Denkbar ist, dass Selenoprotein P am sauren Ende des IPG-Strip herausläuft.
- In einigen 2D-Gelen wurde ein schwacher Proteinspot bei ca. 48 kDa und IP-Werten von ca. 6.0–6.4 detektiert. Dieser könnte, den theoretischen Daten nach zu urteilen, von SPS2 stammen. Die genaue Position des SPS2 im 2D-Gel ist jedoch noch nicht bekannt.
- Die Proteinspots bei ca. 32 kDa und 27 kDa mit den IP-Werten von 5.4 – 5.8 könnten von den Deiodase-Typ II und Deiodase-Typ III stammen.
- Die bei 25 kDa und 23 kDa gefundenen Spots mit IP-Werten von 6.2 – 6.8 wurden wahrscheinlich von den Untereinheiten der tetrameren GPx3 bzw. GPx1 verursacht. Sie waren in den Gewebe-Cytosolen und den Zell-Cytosolen enthalten.
- Bei der Molekularmasse 20 kDa wurde bei einem IP von 7.0 – 7.8 ein Spot detektiert, der wahrscheinlich auf die monomere GPx4 zurückzuführen ist. Dieses Protein wurde in den Cytosolen und in den pelletierten Fraktionen nachgewiesen.
- Die 18 kDa-Bande, die in den pelletierten Fraktionen nach 1-dimensionaler Proteintrennung gefunden wurde, könnte vom Selenoprotein T stammen. Seine Funktion ist noch unbekannt [65,122]. Beschrieben ist von diesem Protein, dass es ein Transmembranprotein ist. Diese Eigenschaft des 18 kDa-Selenoproteins

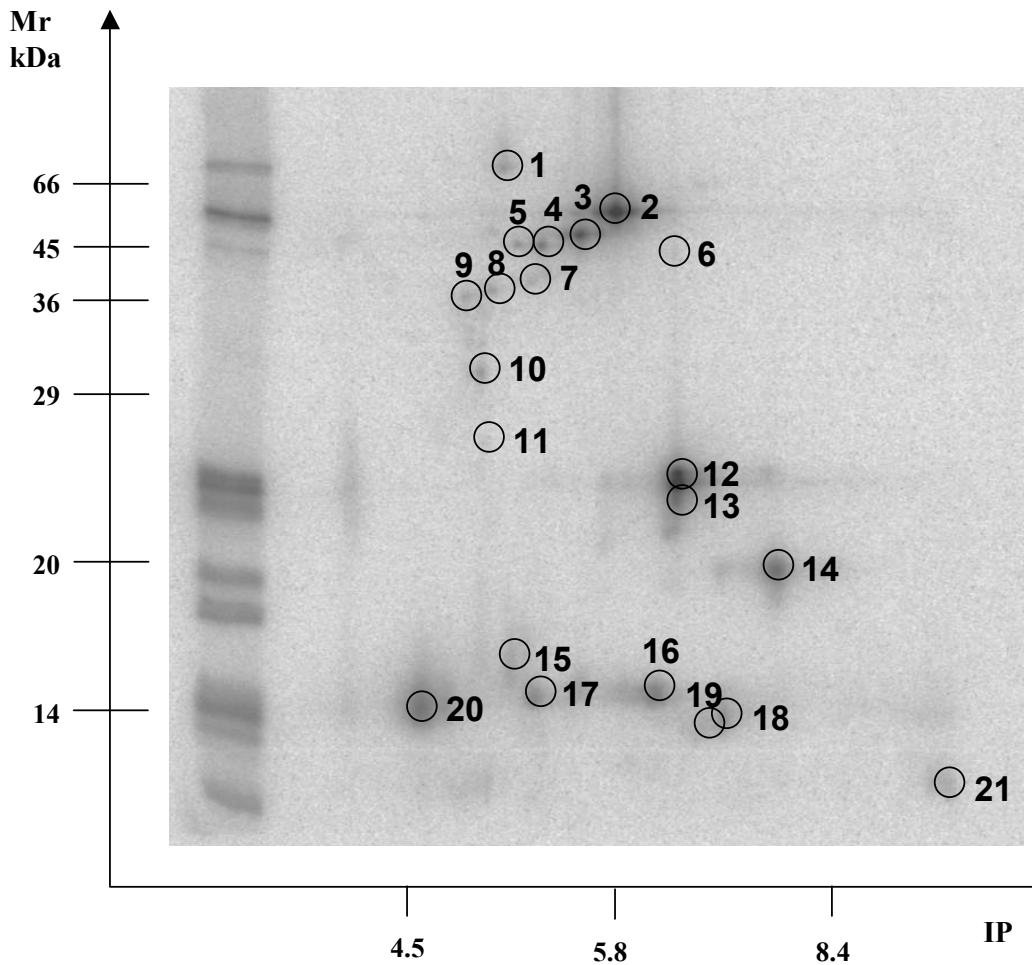


wurde auch in dieser Arbeit wiedergefunden. Nach 2-dimensionalen Proteintrennung wurde dieses 18 kDa Protein nicht nachgewiesen. Eine einfache Erklärung hierfür könnte der pH-Bereich der verwendeten IPG-Strips (3 – 10) sein, in dem dieses Protein nicht erfasst werden konnte.

- In den Proben der HT22 und BV2 nach SDS-PAGE sowie in einigen 2D-Gelen der Zellen wurde bei ca. 16 kDa ein Proteinspot mit einem IP von 4.8 – 5.2 gefunden. Hierbei könnte es sich um das *in silico* identifizierte Selenoprotein M handeln. Es ist an peri-nucleären Membranen assoziiert. Diese Eigenschaft ist bereits beschrieben [200] und erklärt auch, warum es in den Proben der Zellen manchmal nur im Cytosol und ein anderes Mal im Cytosol und in der pelletierten Fraktion vorhanden war.
- Der Proteinspot bei 15 kDa mit dem IP von 4.5 – 4.8 ist auf das 15 kDa-Selenoprotein zurückzuführen. Seine Identität wurde für die Ratte belegt [201].
- In den 2D-Gelen der Proben aus den BV2 wurde ein Proteinspot bei ca. 12,5 kDa mit einem IP von 7.0 – 7.3 gefunden. Dieser Spot könnte von dem Selenoprotein R herrühren [65], denn seine berechneten Daten stimmen gut mit den hier gefundenen überein.
- Bei der Molekularmasse von ca. 10 kDa wurde ein Spot mit einem IP von 8.2–8.5 detektiert, der wahrscheinlich vom Selenoprotein W stammt.

In der Abbildung 4.27 sind die oben beschriebenen Protein-Spots ausgewiesen und den bekannten Selenoproteinen zugeordnet. Nach 2-dimensionalen Proteintrennung in Proben der Zellen wurden in den Autoradiogrammen bei 45 – 27 kDa bis zu 10 Proteinspots gefunden. Diese konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt keinem Selenoprotein zugeordnet werden. Das gleiche gilt für den Proteinspot bei 9 kDa aus den BV2. Andererseits gibt es aber auch unter den *in silico* identifizierten Selenoproteinen Kandidaten, die noch keinem Proteinspot zugeordnet werden konnten.

An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass in einigen 2D-Gelen eine größere Anzahl an <sup>75</sup>Se-markierten Proteinspots (bis zu 35) nachgewiesen werden konnten, so dass die Zahl von 25 Selenoproteinen offenbar noch erweitert werden muß. So ist denkbar, dass noch weitere Spleißformen sowie auch post-translational modifizierte Selenoproteine existieren.



Nr.	Selenoprotein	Nr.	Selenoprotein
1	Selenoprotein O	14	GPx4
2	Spleißform der TR1 oder -3	15	Selenoprotein M
3	Spleißform der TR1 oder -3	16-19	unbekannt
4	Spleißform der TR1 oder -3	20	15 kDa Selenoprotein
5	Spleißform der TR1 oder -3	21	Selenoprotein W
6	SPS2	?	Selenoprotein S (human 21,1 kDa)
7-9	unbekannt	*	Selenoprotein T (human 18,9 kDa)
10	D3	?	Selenoprotein K (human 10,8 kDa)
11	D2	?	Selenoprotein V (human 34,6 kDa)
12	GPx3	?	Selenoprotein I (human 45,2 kDa)
13	GPx1	?	Selenoprotein H (human 13,4 kDa)

\* in der SDS-PAGE nachgewiesen

ABBILDUNG 4.27: Autoradiogramm der <sup>75</sup>Se-markierten Proteine nach 2D-Gelelektrophorese sowie Zuordnung der gefundenen Proteinspots

## 4.6 Etablierung des *in vitro*-Modells der Blut-Hirnschranke

Das Gewebe des Gehirns wird von zahlreichen Blutgefäßen durchzogen. Diese werden von cerebralen Endothelzellen ausgekleidet und auf der Seite des Hirngewebes von Endfüßen der Astrocyten umschlossen und von ihnen in ihrer Morphologie und Funktion beeinflusst. Diese zelluläre Struktur an der Grenzfläche Blutgefäß/Hirngewebe wird als Blut-Hirnschranke bezeichnet.

### 4.6.1 Primäre Astrocyten

Die Präparation der Astrocyten wurde wie im Abschnitt 3.4.1 (Seite 42 *f.*) beschrieben durchgeführt. Durch diese Vorgehensweise konnte jedoch nur eine gemischte Gliazell-Kultur erhalten werden. Die gewonnenen Zellen aus dem Cortex neugeborener Wistar Ratten wurden auf poly-L-Lysin beschichteten Kulturgefäße ausplattiert (mit jeweils 2 Gehirnen / 75 cm<sup>2</sup>). Diese Vorkultur konnte durch mechanischen Schütteln teilweise von den nicht ramifizierten Mikroglia befreit werden. Nach zehn Tagen der Kultivierung wurden sie an das Hahn-Meitner Institut transportiert und dort nach weiteren zwei Tagen experimentell verwendet.

#### 4.6.1.1 Immuncytochemische Charakterisierung

Zum immuncytochemischen Nachweis von Astrocyten wurde das spezifisch in Astrocyten vorkommende Intermediärfilament GFAP gewählt und indirekt über ein Antikörper gekoppeltes Fluorophor visualisiert. Um die Zahl der Mikroglia abschätzen zu können, wurden diese gleichzeitig mit einem Fluorophor-gekoppelten Isolectin B4 sichtbar gemacht.

Die Kulturen wurden, wie ausführlich in Kapitel 3.4.1 beschrieben, behandelt. Für die mikroskopische Auswertung wurden die Kulturen der primären Astrocyten nach 12 – 14 Tagen durch Trypsinbehandlung aus dem Kulturgefäß abgelöst und auf Deckgläschen kultiviert. Nach der Fixierung der Zellen wurden sie mit entsprechender Antikörper-Lösung inkubiert und zur Mikroskopie auf Objektträger übertragen. In Abbildung 4.28 sind Bilder der anti-GFAP gefärbten Astrocyten mit den anti-CDw137 gefärbten Mikroglia sowie die anti-GFAP gefärbten Astrocyten allein in stärkerer Vergrößerung abgebildet.

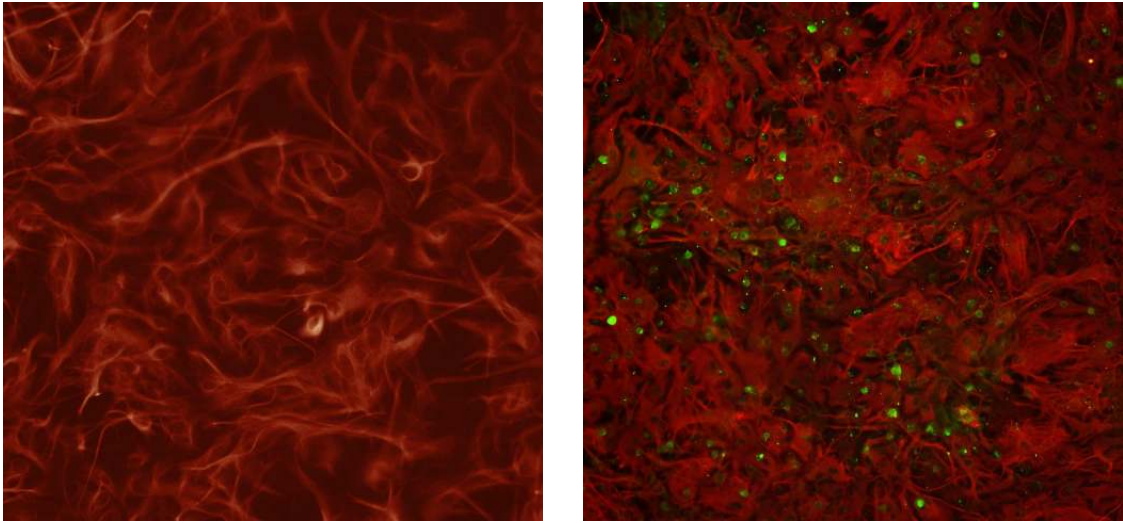


ABBILDUNG 4.28: Immunofärbung von GFAP in primären Astrocyten (links) und Immunofärbung von GFAP in primären Astrocyten und zusätzliche Färbung der Mikroglia (rechts)

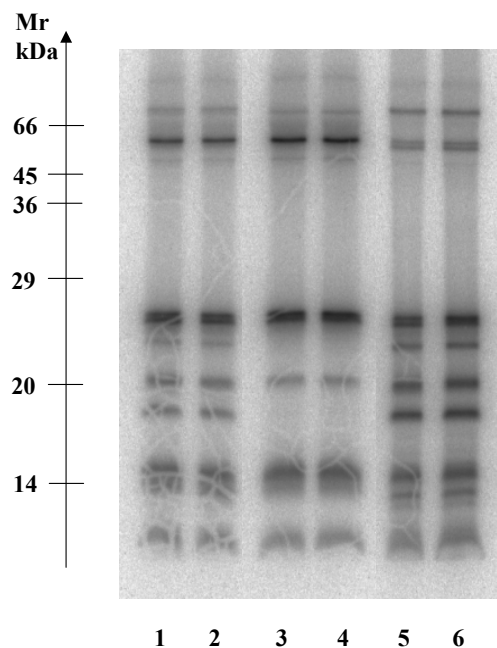
In der Abbildung 4.28 ist durch diese immunocytoologische Färbung eine dichtgewachsene Astrocytenkultur sichtbar gemacht (rot). In der rechten, kombinierten Aufnahme ist durch die zusätzliche Färbung des IB4 erkennbar, dass dem Monolayer aus Astrocyten aktivierte Mikrogliazellen aufsitzen (grün).

Abschließend kann festgestellt werden, dass durch die Präparation und die anschließende Kultivierungsdauer Gliazellkulturen erhalten werden können, die größtenteils Astrocyten und nur einige Mikrogliazellen enthalten. Die hier angewandte Präparation primärer Astrocyten aus den Cortices neugeborener Wistar-Ratten und die anschließende Kultivierung einschließlich des mechanischen Entfernens der Mikroglia liefert ausreichend reine Astrocyten-Kulturen, die für die Untersuchungen in dieser Arbeit verwendet werden konnten.

### 4.6.2 Markierung der primären Astrocyten mit $^{75}\text{Se}$

Die primären Astrocyten wurden, wie schon in dem vorangegangenen Abschnitt beschrieben, nach zehn Tagen der Kultivierung zum Hahn–Meitner Institut transportiert. Die Astrocyten–Kultur wurde auf eine neue Kulturflasche mit der doppelten Wachstumsfläche ( $150\text{ cm}^2$ ) ausplattiert. Nach vier Stunden wurden die Zellen mit  $^{75}\text{Se}$  markiert. Die markierten Zellkulturen wurden nach einer Proliferationszeit von fünf Tagen geerntet, in  $20\text{ mM Tris pH }7.4$  aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung lysiert. Die Zelllysate wurden durch Zentrifugation bei  $120\,000 \times g$  in eine cytosolische (Überstand) und mikrosomale Fraktion (Pellet) getrennt. Aus diesen Fraktionen konnten erste Informationen zur Lokalisation der entsprechenden selenhaltigen Proteins gewonnen werden. Die Proteine der beiden Fraktionen wurden durch Gelelektrophorese nach Lämmli getrennt. Nach Färben und Trocknung der Gele wurden die mit  $^{75}\text{Se}$ -markierten Proteine durch Autoradiographie detektiert.

Die Autoradiogramme dieser Zellen sind in Abbildung 4.29 dargestellt. Das Autoradiogramm der  $^{75}\text{Se}$ -markierten Kultur der primären Astrocyten zeigt ein ähnliches Bandenmuster der selenhaltigen Proteine, wie schon aus dem vorangegangenen Abschnitt 4.3.1.2 (S.79 *ff.*) bekannt ist.



1 + 2: Zell–Lysate, 3 + 4: Cytosole, 5 + 6: Pellet nach  $120\,000 \times g$

ABBILDUNG 4.29: Autoradiogramm der selenhaltigen Proteine der primären Astrocyten aus neugeborenen Wistar–Ratten

In den Molekularmassenbereichen von ca. 74 kDa und ca. 57 – 53 kDa wurden in allen Fraktionen  $^{75}\text{Se}$ -markierte Proteinbanden und bei ca. 50 kDa schwache Banden detektiert. In allen Fraktionen wurden die Banden bei ca. 25 – 23 kDa, 20 kDa und 18 kDa gefunden, wobei die 18 kDa-Bande nicht in den Cytosolen vorkam. Sie stammt wahrscheinlich von einem membrangebundenen Protein. Weiterhin wurde in den Lysaten und Cytosolen bei 15 – 14 kDa breitere Banden gefunden. In den Pellets war dieser Bereich auf 15 kDa eingegrenzt. Wahrscheinlich lagen bei diesem Massenbereich in den Lysaten und Cytosolen mehrere selenhaltige Proteine. In den Pellets wurde eine  $^{75}\text{Se}$ -markierte Bande bei 14 – 13 kDa detektiert, die in den übrigen Fraktionen fehlte. In allen Fraktionen wurden in gleicher Stärke Banden bei 10 kDa nachgewiesen.

Die Ergebnisse aus den Markierungen der primären Astrocyten mit dem Radiotracer  $^{75}\text{Se}$  stimmen mit den Ergebnissen aus den markierten Hirngeweben und auch mit denen der markierten Zell-Linien überein d.h. die Muster der selenhaltigen Proteine sind im wesentlichen gleich. Die Kulturen der primären Astrocyten wurden für die Co-Kultivierung mit rBCEC4 verwendet.

### 4.6.3 Das in vitro-Modell der Blut-Hirnschranke

Für die Co-Kultivierung von Zellen in vitro wurde das “Cell Culture Insert-System” der Firma Falcon (Heidelberg) benutzt. Es besteht aus 6-Well-Testplatten und jeweils sechs Filtereinsätzen, die in die Wells eingehängt werden. Den Boden der Filtereinsätze bildet eine poröse Membran aus PET (Polyethylenterephthalat), deren Poren einen Durchmesser von  $0,4\ \mu\text{m}$  haben und die Membran in einer Dichte von  $1,0 \cdot 10^8$  Poren/cm<sup>2</sup> überziehen. Die Fläche der Membran pro Filtereinsatz beträgt  $4,2\ \text{cm}^2$ .

Nach dem Einsetzen des Filtereinsatzes in das Well hat die Membran  $0,9\ \text{cm}$  Abstand zu dessen Boden. In Abbildung 4.30 ist das hierfür verwendete “Cell Culture Insert-System” dargestellt. Dieses System bietet wegen der Permeabilität der Membran gute Bedingungen für die Kultivierung zweier verschiedener Zelltypen, die sich gegenseitig konditionieren. Die Möglichkeit, die so gewachsenen Zellen separat voneinander zu ernten ist gleichzeitig gegeben. Aus diesen Gründen wurde dieses System der Kultivierung als Modell der in vivo-Situation der sich gegenseitig beeinflussenden Zellen an der Blut-Hirnschranke gewählt. Die geringe Größe der Membran bietet jedoch nur wenig Wachstumsfläche und limitiert damit die Probenmenge.

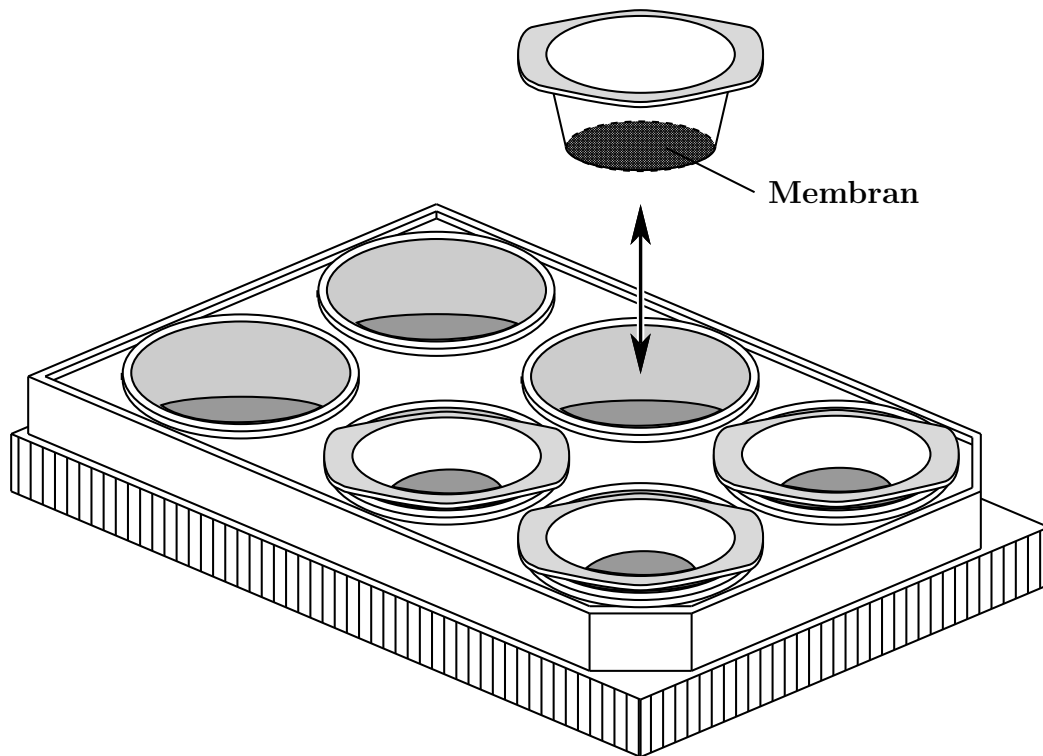


ABBILDUNG 4.30: Skizze des verwendeten "Cell Culture Insert-System"  
(nicht maßstabsgetreu)

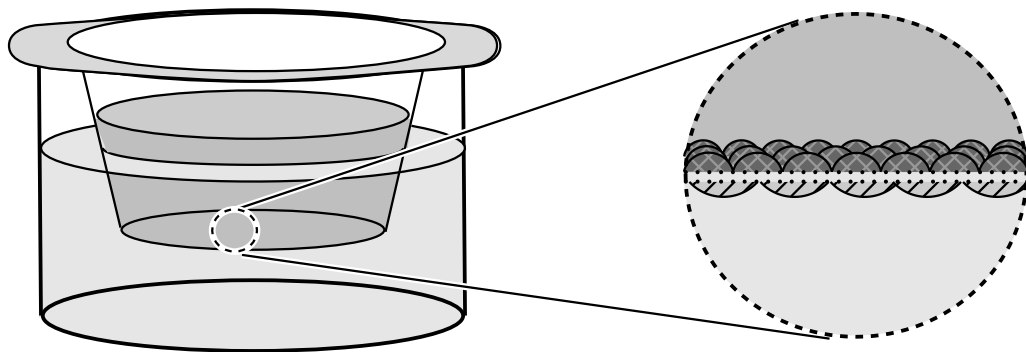


ABBILDUNG 4.31: Schematische Darstellung der Co-Kultur aus primären Astrocyten und immortalisierten cerebralen Endothelzellen rBCEC4 in dem verwendeten "Cell Culture Insert-System"

#### 4.6.4 Die Co-Kultivierung von Astrocyten und cerebralen Endothelzellen

Für diese Aufgabenstellung wurden primäre Astrocyten aus neugeborenen Wistar-Ratten (P2-P3) mit der immortalisierten Zell-Linie aus Wistar-Ratten rBCEC4 co-kultiviert. Die Zellen wurden auf den gegenüberliegenden Seiten der Membranen der Filtereinsätze kultiviert: die Astrocyten auf der unteren Membranseite und die Zellen der cerebralen Endothelzell-Linie rBCEC4 auf der oberen Membranseite der Filtereinsätze. Die Abbildung 4.31 auf Seite 95 zeigt eine schematische Darstellung der beschriebenen Co-Kultur aus primären Astrocyten und immortalisierten cerebralen Endothelzellen rBCEC4.

Bevor jedoch die Co-Kultur in zwei Schritten aufgebaut werden konnte, musste jeweils die oberen Membranseiten der Filtereinsätze für die Kultivierung der rBCEC4-Zellen mit Rattenschwanz Collagen Typ I beschichtet werden. Anschließend wurden im ersten Schritt die Astrocyten ( $6 \cdot 10^4/\text{cm}^2$ ) auf der unteren Membranseite der Filtereinsätze kultiviert.

Nach drei Tagen wurde das Kulturmedium der Astrocyten in der unteren Kammer erneuert, die cerebralen Endothelzellen rBCEC4 in die obere Kammer des Filtereinsätze ( $1,3 \cdot 10^4/\text{cm}^2$ ) gesät und mit dem Kulturmedium der rBCEC4 überschichtet. Die Zellen dieser Co-Kultur konnten nach einer Kultivierungszeit von drei Tagen separat voneinander geerntet und proteinchemisch untersucht werden.

#### 4.6.5 Vorversuche zur Markierung der Co-Kultur mit $^{75}\text{Se}$

Die Co-Kulturen wurden nach der beschriebenen Vorgehensweise aufgebaut. Vier Stunden nach dem Ausplattieren der rBCEC4 wurde zu dem Kulturmedium der oberen Kammer  $^{75}\text{Se}$  als Selenit zugesetzt und dieser Ansatz mit nicht-radioaktivem Natriumselenit bis zur gewünschten Selenitkonzentration ergänzt. Nach einer Proliferationszeit von 3 Tagen wurden die Zellen der Astrocyten und der rBCEC4 getrennt voneinander geerntet. Sie wurden jeweils in 20 mM Tris pH 7.4 aufgenommen, mittels Ultraschallbehandlung lysiert und durch Zentrifugation bei  $120\,000 \times g$  in eine cytosolische- und eine mikrosomale Fraktion getrennt. Durch Gelelektrophorese nach Lämmler wurden die Proteine der Fraktionen getrennt und durch Autoradiographie die  $^{75}\text{Se}$ -markierten Proteine nachgewiesen. Anhand der Ergebnisse wurde die experimentellen Parameter verbessert.



Hierbei waren insbesondere die kleinen Wachstumsflächen der Filtereinsätze, die nur geringe Probenmenge zuließen, problematisch. Daher wurden die Co-Kulturen stärker mit  $^{75}\text{Se}$  markiert. Weiterhin wurden, um eine ausreichende Proteinmengen zu erhalten, drei 6-Well-Platten mit je sechs Filtereinsätzen parallel und unter denselben Wachstumsbedingungen kultiviert. Die geernteten Zellen der primären Astrocyten und der rBCEC4 von den insgesamt achtzehn Filtereinsätzen wurden zusammen weiterverarbeitet.

## 4.7 Markierung der selenhaltigen Proteine aus co-kultivierten und mono-kultivierten Zellen

Zur Klärung der Frage nach einer möglichen Beeinflussung in der Expression von selenhaltigen Proteinen einer oder beider Zelltypen in der Co-Kultur wurden die Expressionsmuster von mono- und co-kultivierten primären Astrocyten und rBCEC4 miteinander verglichen. Dabei wurden die Kulturen mit  $^{75}\text{Se}$  markiert und ihre Proteine durch Gelelektrophorese nach Lämmli aufgetrennt. Es wurde angenommen, dass die Stärke der Expression mit dem Schwärzungsgrad im Autoradiogramm korreliert.

- Die primären Astrocyten wurden wie im Abschnitt 3.4.1 beschrieben präpariert und nach insgesamt zwölf Tagen der Kultivierung auf eine neue Kulturflasche mit der doppelten Wachstumsfläche ausplattiert.
- Zur Kultivierung der rBCEC4 wurden die Kulturplatten mit Rattenschwanz-Collagen Typ I beschichtet und die Zellen ( $1,4 \cdot 10^4/\text{cm}^2$ ) ausplattiert.
- Die Co-Kultur aus primären Astrocyten und rBCEC4 (cerebralen Endothelzellen) wurde wie im Abschnitt 3.4.2 beschrieben in zwei aufeinanderfolgenden Schritten aufgebaut und kultiviert.

Nach fünf Stunden wurden die Kultivierungsansätze mit  $^{75}\text{Se}$  markiert und mit nicht-radioaktivem Natriumselenit auf 35 nM eingestellt. Die so markierten Kulturen wurden nach dem Erreichen der Konfluenz geerntet, in jeweils 20 mM Tris pH 7.4 aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung lysiert. Die Zelllysate jeder Probe wurden durch Zentrifugation bei  $120\,000\times g$  in eine cytosolische- (Überstand) und mikrosomale Fraktion (Pellet) getrennt. Die Proteine der Fraktionen wurden durch Gelelektrophorese nach Lämmli getrennt. Nach ihrer Färbung und dem Trocknung der Gele

#### 4 Ergebnisse

wurden die  $^{75}\text{Se}$ -markierten Proteine durch Autoradiographie detektiert. Die Autoradiogramme der mono-kultivierten und der co-kultivierten Zellen sind in Abbildung 4.32 dargestellt.

Sie zeigten die schon bekannten Bandenmuster der selenhaltigen Proteine, mit interessanten Besonderheiten bei den co-kultivierten Zellen. Zur direkten visuellen Auswertung wurden jeweils gleiche Proteinmengen derselben Fraktionen eines Zelltyps, die unter verschiedenen Kulturbedingungen (Co-Kultur und Mono-Kultur) wuchsen in benachbarten Bahnen auf die SDS-PAGE aufgetragen.

Auffällig war, dass die  $^{75}\text{Se}$ -markierten Banden, die bei den mono-kultivierten Zellen bei 25 kDa lagen nach der Co-Kultivierung der Zellen bei geringfügig höheren Molekularmassen zu finden waren. Diese Beobachtung wurde bei beiden Zelltypen gemacht. Außerdem waren diese Banden in den mono-kultivierten Astrocyten deutlich stärker durch  $^{75}\text{Se}$  markiert. In den co-kultivierten rBCEC4 wurden die Banden bei 57 – 53 kDa stärker markiert.

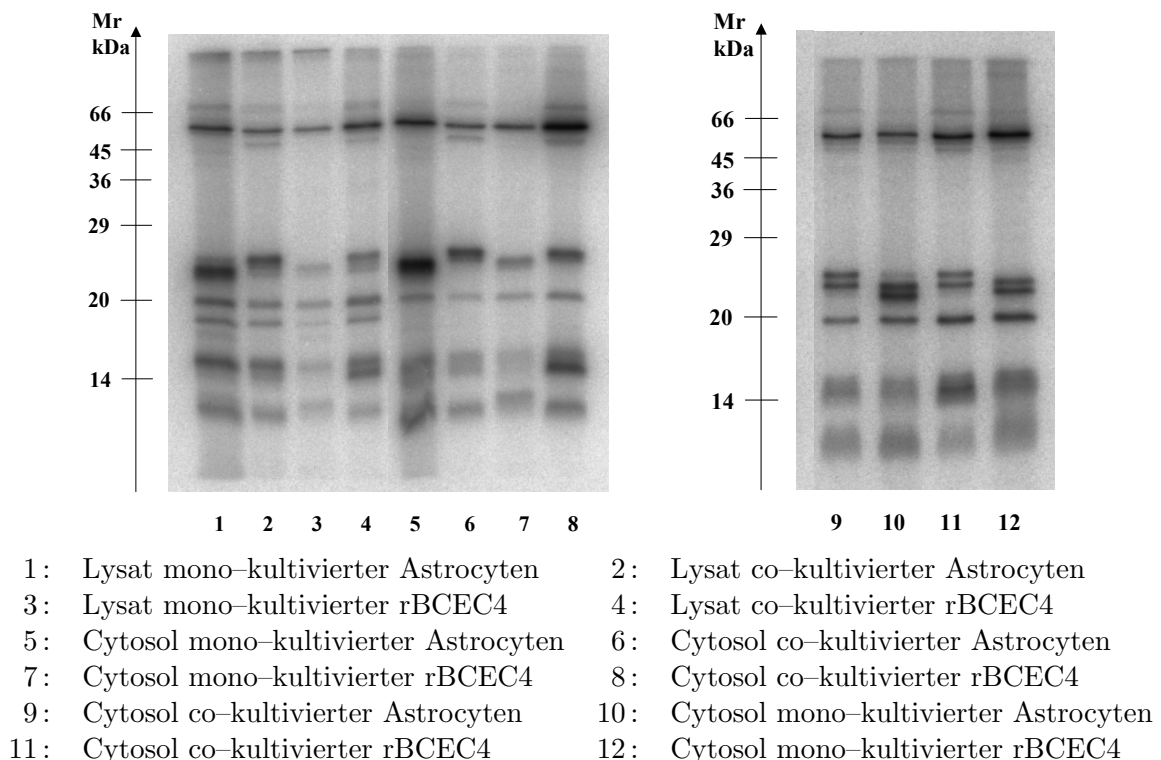


ABBILDUNG 4.32: Autoradiogramme der  $^{75}\text{Se}$ -markierten Proteine von mono- und co-kultivierten primären Astrocyten und von der Zell-Linie rBCEC4 der cerebralen Endothelzellen nach Gelelektrophorese

#### 4.7 Markierung der selenhaltigen Proteine aus co- und mono-kultivierten Zellen

Dies war besonders deutlich im Cytosol. Im Molekularmassenbereich von 15 – 14 kDa der rBCEC4 wurden zwei Banden getrennt, von denen die Bande der kleineren Masse unter der Wachstumbedingungen der Co-Kultur durch ihre stärkere Markierung auffiel.

Bei der Co-Kultivierung von primären Astrocyten und cerebralen Endothelzellen (rBCEC4) wie es dem zellulären Aufbau der Blut-Hirnschranke in vivo entspricht, scheint die Expression von selenhaltigen Proteinen in beiden beteiligten Zelltypen beeinflusst zu werden. Dabei ist besonders die Hochregulation eines selenhaltigen Proteins der Molekularmasse von 15 kDa in den rBCEC4 interessant. In schwächerer Ausprägung wurde dieser Effekt auch gefunden, wenn konditioniertes Kulturmedium der primären Astrocyten dem Kulturmedium der rBCEC4 zu 40 % zugesetzt wurde. Dies lässt vermuten, dass die Hochregulation hauptsächlich durch lösliche Mediatoren, die im konditionierten Kulturmedium der Astrocyten enthalten waren, induziert worden war. Die zellulären Kontakte der beiden Zelltypen spielen dabei wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle.

Diesen hochinteressanten, proteinanalytisch gewonnenen Erkenntnisse der erhöhten Expressionsrate von selenhaltigen Proteinen in den Astrocyten wie auch in den Zell-Linie rBCEC4 (Endothelzellen) an der Blut-Hirnschranke in vitro, muss in weiteren Experimenten nachgegangen werden, um das zugehörige Gen zu identifizieren und seine Funktion aufzuklären.

##### 4.7.1 Expressionen selenhaltiger Proteine bei unterschiedlicher Selenversorgung

Einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Selengebe und der Permeabilität der Blut-Hirnschranke wurde bisher in Experimenten an Ratten gefunden. Der Mechanismus der dieser Permeabilitätserniedrigung verursacht ist unbekannt.

Durch die Markierung der Co-Kultur mit verschiedenen Selenkonzentrationen sollte untersucht werden, ob sich das Expressionsmuster der selenhaltigen Proteine bei unterschiedlichem Selenangebot ändert. Denkbar ist, dass die Expressionsrate einzelner Selenoproteine bei höheren Selenkonzentrationen erhöht wird. Dafür wurde drei Co-Kulturen mit unterschiedlichen Gesamt-Selenkonzentrationen von 2 nM, 40 nM und 80 nM im Kulturmedium angesetzt (je 6 Filtereinsätze). Die Co-Kultur und die Analyse wurde wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben durchgeführt.

Die erhaltenen Autoradiogramme der SDS-PAGE zeigten die bekannten Muster der exprimierten  $^{75}\text{Se}$ -markierten Banden in unterschiedlichen Schwärzungsgraden, die aber innerhalb einer Probe annähernd gleich blieben. Auch bei der Molekularmasse von 15 kDa im Cytosol von rBCEC4-Zellen wurde zwischen den unterschiedlichen Selenzusätzen keine unproportionale Änderung in der Expressionsstärke beobachtet. Bei allen Proben wurde im 14 – 15 kDa-Bereich die stärkere Schwärzung gefunden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Bei 10 kDa wurde eine interessante Beobachtung gemacht. Bei einer Selenkonzentration des Kulturmediums von 2 nM wurde bei 10 kDa keine  $^{75}\text{Se}$ -markierte Bande nachgewiesen. Sie wurde bei 40 nM schwach und mit 80 nM Selenzusatz deutlich nachgewiesen. Dies könnte die beobachtete erniedrigte Permeabilität der Blut-Hirnschranke bei höherer Selengabe mitverursachen.

Um diesen Hinweisen weiter nachgehen zu können wäre es notwendig an den Co-Kulturen die Permeabilitäten, beispielsweise durch Widerstandsmessungen zu bestimmen. Ziel wäre es die Permeabilität der Blut-Hirnschranke mit der Co-Kultivierung bei bestimmten Selenkonzentrationen zu korrelieren.

### 4.7.2 Untersuchungen durch 2–dimensionale Gelelektrophorese

Durch die 2–dimensionale Auftrennung der Cytosole von rBCEC4 (cerebrale Endothelzellen) nach ihrer Co-Kultivierung sollte überprüft werden, ob eventuell selektiv ein Spot im Bereich von 15 kDa in den Endothelzellen hochreguliert wird oder ein zusätzlicher Spot nachweisbar ist. Auch die Cytosole der primären Astrocyten wurden auf Besonderheiten des Expressionsmusters untersucht. Daher wurden die  $^{75}\text{Se}$ -markierten Cytosole beider co-kultivierten Zellen einer 2D-Gelelektrophorese unterworfen und Autoradiogramme angefertigt.

In der Abbildung 4.33 sind Autoradiogramme beider Zelltypen dargestellt. Sie lieferten ähnliche Expressionsmuster der selenhaltigen Proteine, wie aus den vorangegangenen Abschnitten schon bekannt ist.

Es soll an dieser Stelle nur auf die Unterschiede bei einzelnen Spots eingegangen werden. Insgesamt wurde diese 2–dimensionale Proteintrennung in zahlreichen Versuchen wiederholt. Dabei konnte aber im Autoradiogramm der rBCEC4 kein selenhaltigen

#### 4.7 Markierung der selenhaltigen Proteine aus co- und mono-kultivierten Zellen

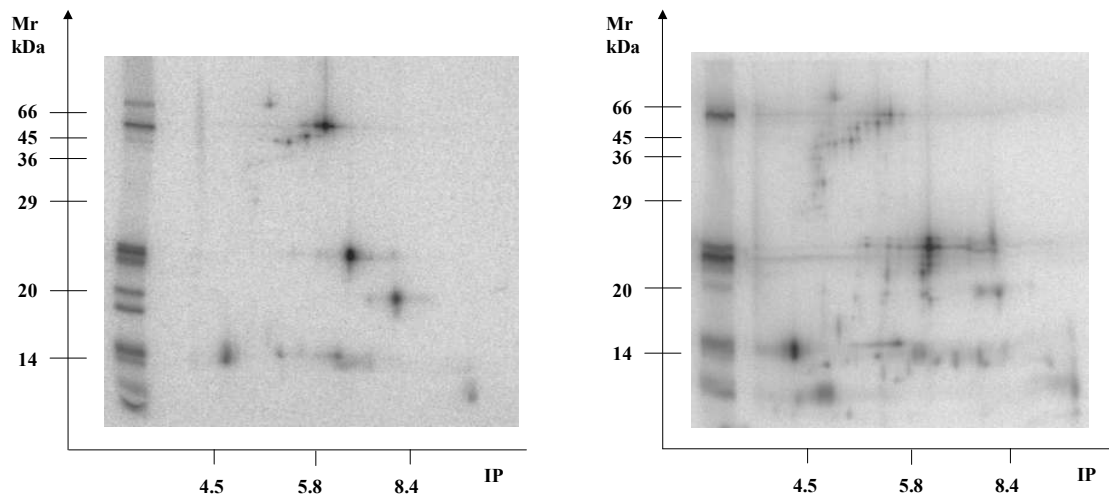


ABBILDUNG 4.33: Autoradiogramme der  $^{75}\text{Se}$ -markierten Proteine des Cytosols der co-kultivierten der rBCEC4 (links) und der primären Astrocyten (rechts) nach 2-dimensionaler Gelelektrophorese

Proteinspot mit der Molekularmasse von 15 kDa gefunden werden, der für die in der SDS-PAGE beobachtete erhöhte Schwärzung bei 15 kDa verantwortlich sein kann. Stattdessen wurde im Autoradiogramm der co-kultivierten primären Astrocyten zwei weitere  $^{75}\text{Se}$ -markierte Proteinspots gefunden, einer bei 15 kDa mit dem IP-Wert von 5.4 – 5.6 und ein zweiter bei 10 kDa mit einem IP-Wert von 4.6 – 4.8. Der 15 kDa Proteinspot mit einem IP 5.4 – 5.6 ähnelte einem  $^{75}\text{Se}$ -markierten Proteinspot im Cytosol der Endothelzellen.

In dieser Arbeit konnte in Analogie zu anderen hochregulierten Proteinen an der Blut-Hirnschranke auch eine Regulation und Induktion von selenhaltigen Proteinen gefunden werden [202]. Diese durch elektrophoretische Methoden der Proteintrennung gewonnenen sehr interessanten Erkenntnisse über  $^{75}\text{Se}$ -markierte Proteine an der Blut-Hirnschranke und ihre Regulation durch lösliche Mediatoren erfordern zu ihrer Klärung zusätzliche experimentellen Methoden, z.B. wäre interessant, ob ein bestimmtes Cytokin die Hochregulation bewirkt.

