

# 5 Diskussion der Ergebnisse

Das Spurenelement Selen ist für die Entwicklung und die Gesundheit von höheren Säugern essentiell. Über die biologische Rolle der Selenoproteine im Gehirn ist noch wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Verteilung von Selen und der exprimierten Selenoproteinen im ZNS aufgeklärt werden und Unterschiede zwischen den Hirnregionen und den Zelltypen des Gehirns bestimmt werden. So sollten Hinweise auf die Funktionen und die Wirkorte der Selenoproteine im Gehirn erhalten werden. Anhand eines Modells der Blut-Hirnschranke sollte dem Zusammenhang zwischen Selen und der Permeabilität der Blut-Hirnschranke und seinen molekularen Ursachen nachgegangen werden. Es sollten hierfür elementanalytische, zellbiologische und proteinchemische Methoden eingesetzt werden.

## 5.1 Analyse des Gehirn-Selengehaltes

Für die Analyse der Selenverteilung im Hirngewebe wurden Wistar-Ratten verwendet, die entweder mit einem Futter mit ausreichender Selenmenge (Se(+)-Futter) oder mit einem Selenmangel-Futter (Se(-)-Futter) ernährt worden waren. Das Gehirn wurde in Regionen unterteilt, die groß genug waren, um ausreichende Probemengen für die Experimente zu erhalten. Präpariert wurden: Hirnstamm, Kleinhirn und Großhirn, letzteres wurde weiter in Hippocampus und in die in dieser Arbeit als Vorderhirn und Hinterhirn bezeichneten Teile des Großhirns unterteilt (siehe Kapitel 3.3.1.5, S.36). Als Kontrollgewebe wurden die Hypophyse, Leber und Niere verwendet. Die Selengehalte in den Gesamtgeweben wurden mittels INAA und in den Cytosolen der Hirnproben mit Hilfe der AAS bestimmt.

Das Gehirn unterschied sich von den anderen Geweben vor allem durch seine relativ geringe Abnahme des Selengehaltes während der unzureichender Selenaufnahme. Die Leber und die Niere der Se(-)-Tiere hatte den überwiegenden Teil ihrer Selenmengen verloren und wiesen nur noch Restgehalte von 1,3 % bzw. 8,6 % der Werte der Kontrolltiere auf. Dagegen verringerte sich der Selengehalt im Gehirn nur um etwa 30 %, wobei die Abnahme in allen untersuchten Hirnregionen nahezu gleich war. Die statistische Auswertung dieser Messwerte nach dem t-Test ergaben hoch signi-

fikante Unterschiede zwischen gleichen Geweben beider Gruppen bzw. den Geweben innerhalb einer Gruppe, was auf sehr klar unterscheidbare Selenwerte und eine saubere Probenpräparation und – Verarbeitung schließen lässt. Die Werte entsprechen den publizierten Daten für die Gewebe der Leber, Niere, Hypophyse und des Gehirns (gesamtes Organ) von Behne und Mitarbeitern [131]. Sie fanden bei Untersuchungen der Selengehalte gewebespezifische Retentionfaktoren. Die Leber wies den geringsten und das Gehirn den höchsten Retentionsfaktor auf.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen der Ratten mit ausreichender Selenversorgung (Se(+)) zeigten, dass sich die höchste Konzentration im Kleinhirn von der niedrigsten im Hirnstamm um den Faktor 1,6 unterschied. Aus diesen erstmals durchgeführten Untersuchungen über die Selenverteilung zwischen verschiedenen Hirnregionen geht hervor, dass der Selengehalt innerhalb des Gehirns wenig variiert und die bevorzugte Selenversorgung alle Regionen im gleichen Maße betrifft. In den Cytosolen der Leber und der Niere wurden sehr ähnliche Werte für die Verringerung der Selengehalte bei Selenmangel gefunden wie in den Gesamtgeweben. Überraschend waren die Ergebnisse bei den Gehirnproben. In allen untersuchten Hirnregionen mit Ausnahme des Kleinhirns waren die Abnahmen der Selengehalte in den Cytosolen geringer mit 8 - 10 % als in den Gesamtgeweben (30 %). Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, dass im Gehirn die membrangebundenen und kompartimentierten Selenoproteine im mittel ihre Seleninhalte stärker reduzieren als die cytosolischen Selenoproteine.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass bei der Ratte vor allem die Leber eine hohe Konzentration an cytosolischen Glutathion–Peroxidasen (63 %) besitzt [132]. Im Gehirn ist der Anteil an cytosolischen Glutathion–Peroxidasen dagegen deutlich geringer. Aus zahlreichen Arbeiten ist bekannt, dass die Expressionsrate der cytosolischen Glutathion–Peroxidase 1 GPx1 bei Selenmangel sehr stark reduziert wird [60, 71, 132] wie auch die Expression der Plasma-Glutathion–Peroxidase GPx3 bei Selenmangel absinkt. Sie sind in den cytosolischen Fraktionen enthalten und stehen an unterer Stelle in der Hierarchie der Selenoproteine [133]. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Reduktion der GPx1 und GPx3 im Gehirn, wegen ihrer geringeren Menge, nicht so stark ins Gewicht fallen wie in der Leber. Diese Eigenschaft könnten die stärkere Reduktion des Selenwertes im Cytosole der Leber gegenüber der des Gehirns zum Teil erklären. Insgesamt aber können die gefundenen Messwerte zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht ausreichend erklärt werden. Die Frage, welche Selenoproteine im ZNS bei Selenmangel am stärksten betroffen sind, ist vor allem im Hinblick auf die Rolle von Selenoproteinen bei neurodegenerativen Erkrankungen von großem Interesse.

## 5.2 Selenaufnahme ins Hirngewebe

Um die Kinetik der Selenaufnahme in Gewebe verfolgen zu können, wurden der Radiotracer  $^{75}\text{Se}$  i.p. appliziert und so eine metabolische Markierungen der Selenoproteine erreicht. Die Experimente wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt. Anschließend wurden die Aktivitäten bestimmt und die exprimierten  $^{75}\text{Se}$ -haltigen Proteine der Gewebe durch elektrophoretische Proteintrennung und Autoradiographie detektiert.

Überraschenderweise wurde, verglichen mit Milz, Leber und Niere, eine zeitverzögerte Selenaufnahme in das Hirngewebe gefunden. Nach 3 Stunden Markierungsdauer wurde im Gehirn nur eine  $^{75}\text{Se}$ -markierte Proteinbande bei 57 kDa gefunden, wogegen in den anderen genannten Geweben schon alle bekannten selenhaltigen Banden deutlich detektiert wurden. Erst nach 24-stündiger Markierung wurde das bekannte Expressionsmuster der  $^{75}\text{Se}$ -markierten Proteine deutlich detektiert. Durch den immunologischen Nachweis konnte gezeigt werden, dass die Proteinbande bei 57 kDa vom Selenoprotein P verursacht wurde war. Da die Tiere vor der Präparation nicht perfundiert wurden waren, ist die detektierte Proteinbande des Selenoprotein P zumindest teilweise von dem Selenoprotein P aus dem Blutplasma der gefüllten Kapillaren verursacht. Denn im  $^{75}\text{Se}$ -markierten Blutplasma wurde 3 Stunden nach der Markierung das als Selen-Transportprotein angesehene Selenoprotein P in großen Mengen nachgewiesen [203]. Daher kann aus diesen Ergebnissen nicht mit Sicherheit geschlossen werden, ob Selenoprotein P nach 3 Stunden als erstes Selenoprotein im Gehirn exprimiert wird. Jedoch kann gesagt werden, dass Selen zeitverzögert ins Hirngewebe aufgenommen und seine Selenoproteine verzögert exprimiert werden.

Nach der gängigen Vorstellung wird Selen nach seiner Aufnahme über die Nahrung in die Leber transportiert, dort in Selenoprotein P eingebaut und über das Plasma an alle anderen Gewebe verteilt. In den letzten Jahren wurden anhand von transgen erzeugten Tiermodellen neue Einblicke in den Stoffwechsel des Selens gewonnen [160, 177, 204]. Insgesamt konnte daraus geschlossen werden, dass der Transportweg des Selens nicht zwingend über hepatisches Selenoprotein P bewerkstelligt wird [180], aber im Fall des Hirngewebes Selenoprotein P essentiell zu sein scheint.

### 5.3 Expression der Selenoproteine in den Hirnregionen

Die elementanalytische Untersuchung des Gehirns wurde durch Untersuchungen der Expressionsmuster von Selenoproteinen durch elektrophoretische Verfahren erweitert. Dafür wurde den Se(+)- und Se(-)-Tieren 6 Tage vor ihrer Tötung  $^{75}\text{Se}$  als Natriumselenit i.p. appliziert und dadurch eine metabolische Markierung der exprimierten Selenoproteine erreicht. Präpariert wurden in einem ersten Versuch 10 verschiedene Gewebe einschließlich des Gehirns, dabei wurde die schon bekannte Hierarchie der Selenversorgung beobachtet sowie weitere experimentell bedeutsame Einblicke gewonnen. So ist die Aufarbeitung und proteinchemische Analyse der  $^{75}\text{Se}$ -markierten Proteine insbesondere aus dem Gewebe des Gehirns aus mehreren Gründen problematisch. Das Gehirn hat in der oben schon beschriebenen Hierarchie die höchste Priorität, es wird bevorzugt mit Selen versorgt. Dieser Umstand wird jedoch durch den geringen Gesamtselengehalt des Hirngewebes relativiert d.h. insgesamt wird das Gehirn trotz seiner hohen hierarchischen Stellung schwach mit  $^{75}\text{Se}$  markiert. Weiterhin weist das Hirngewebe einen hohen Lipidanteil auf, der die Analyse zusätzlich erschwerte. Aus diesen Gründen war es für die proteinchemische Untersuchung des Hirngewebes absolut notwendig, die Markierung zu optimieren indem  $^{75}\text{Se}$  hoher spezifischer Aktivität verwendet wurde.

Die  $^{75}\text{Se}$ -markierten Gehirn-Proben wurden nach derselben Vorgehensweise wie für die elementanalytischen Untersuchungen präpariert und die Gewebe-Homogenate und -Cytosole, außer dem Hypophysen-Cytosol, gewonnen. Die Ergebnisse der Proteintrennung in SDS-haltigen Acrylamidgelen und anschließender autoradiographischer Detektion mit Image-Platten zeigten für alle präparierten Regionen qualitativ gleiche Expressionsmuster der Selenoproteine. Es waren  $^{75}\text{Se}$ -markierte Proteinbanden bei den Molekularmassen 74 kDa, 57-53 kDa, 25 kDa, 23 kDa, 20 kDa, 18 kDa, 15 kDa und 10 kDa detektiert worden. In den Gewebe-Cytosolen wurden die  $^{75}\text{Se}$ -markierten 18 kDa Bande, von der bekannt ist, dass sie von einem membrangebundenen Selenoprotein stammt, nicht gefunden [122]. Interessant erschien die im Autoradiogramm etwas stärker geschwärmte Bande im Gewebe-Homogenat des Kleinhirns bei der Molekularmasse 15 kDa. Im Kleinhirn-Cytosol trat diese Schwärzung noch deutlicher hervor.

Die Gewebe-Homogenate der einzelnen Hirnregionen wurden durch differentielle Fraktionierung in ihre subzellulären Fraktionen getrennt. Bei dieser Trennung wurde festgestellt, dass in den sogenannten Kernfraktionen sowie den mitochondrialen und mi-

krosomalen Fraktionen hauptsächlich die selenhaltigen Proteine bei 15 kDa, 18 kDa und 20 kDa enthalten waren. Die Schwärzungen in den Autoradiogrammen wurden für jede  $^{75}\text{Se}$ -haltige Proteinbande der Fraktionen quantitativ über die PSL-Einheiten der Image-Platten ermittelt und ihr prozentualer Anteil an der Gesamtschwärzung der markierten Proteinbanden einer Fraktion berechnet. Im Hirnstamm waren die Werte der Schwärzungen im Cytosol bei 23 kDa sowie in der Kernfraktion und in der mitochondrialen Fraktionen bei 20 kDa gegenüber den anderen Regionen deutlich erhöht. Im Cytosol des Kleinhirns überstieg die Schwärzung bei 15 kDa die Werte in allen anderen Fraktionen um mehr als 12 %.

Bei der Bewertung dieser Ergebnisse muß bedacht werden, dass sich Hirnregionen sowohl funktionell wie auch zellulär unterscheiden. Daher konnte durch die subzellulären Fraktionierungen von präparierten, relativ großen Hirnregionen nur stark erhöhte Veränderungen in der Expressionsrate von selenhaltigen Proteinen erfasst werden. Entsprechend könnten Expressionsänderungen einzelner Zellkomplexe, die möglicherweise nur einen geringen Anteil an der gesamten Fraktion ausmachen nicht erfasst worden sein. Für das Kleinhirn wurde oben schon der regional höchste Selengehalt des Hirngewebes beschrieben. Die subzelluläre Fraktionierung und die anschließende Quantifizierung der gefundenen selenhaltigen Proteinbanden der SDS-PAGE des Kleinhirns deuten auf cytosolische Proteine mit der Molekularmasse 15 kDa hin. Im Hirnstamm waren die selenhaltigen Proteine bei 20 kDa und 23 kDa sehr stark markiert wurden. In dieser Region des Gehirns verlaufen große Nervenbahnen und nur einzelne Kernkomplexe, hier sind anscheinend die Selenoproteine bei 23 kDa (GPx1) und 20 kDa (GPx4) entscheidend. Beide Enzyme wirken antioxidativ, wobei GPx4 als einzige Glutathion-Peroxidase Phospholipid-Peroxide reduzieren kann und daher als Schutz der Membranen vor Lipidoxidationen benötigt wird.

Die Autoradiogramme der 2D-Gelelektrophoresen lieferten gute Ergebnisse, die Proteine sind scharf fokussiert worden und die Gele insgesamt gut miteinander vergleichbar. Interessant war in allen Hirnregionen die Trennung der Bande bei 15 kDa, hier konnten anhand ihrer IP-Werte vier  $^{75}\text{Se}$ -haltige Proteinspot bei 4.4 – 4.6, 4.8 – 5.0, 5.2 – 5.4 und 6.8 – 8.2 getrennt werden. Im Kleinhirn wurde durch die 2-dimensionale Proteintrennung eine stärkere Schwärzung eines Spots bei 15 kDa mit dem IP 4.8 – 5.0 gefunden. Im Molekularmassenbereich von 45 – 29 kDa wurden mehrere schwache Proteinspots gefunden, die in der SDS-PAGE offenbar nicht nachweisbar waren. Zusätzliche Unterschiede zwischen den Hirnregionen wurden durch diese Methode nicht gefunden. In dieser Arbeit wurden für das Kleinhirn mehrere richtungsweisende Ergeb-

nisse gewonnen und zwar sein erhöhter Selengehalt und die erhöhte Expressionsrate eines cytosolischen, selenhaltigen Proteins der Molekularmasse von 15 kDa. Durch die 2-dimensionale Proteintrennung konnte hier sogar ein einzelner Spot bei 15 kDa (IP 4.8 – 5.2) gefunden werden, der anscheinend die erhöhte Schwärzung im Autoradiogramm verursachte. Im Hinblick auf den morphologischen und zellulären Aufbau des Kleinhirns sind diese Ergebnisse interessant und könnten auf eine möglicherweise zelltyp-spezifische erhöhte Expressionsrate dieses 15 kDa-Selenoproteins hinweisen. Für zukünftige Experimente wäre es daher z.B. interessant den genauen Expressionsort durch immunhistochemische Techniken zu bestimmen.

### 5.4 Expression von Selenoproteinen in Zelltypen des Gehirns

Das Hirngewebe setzt sich aus verschiedenen Arten von Zellen zusammen. Zur Klärung der Frage nach den zellulären Expressionsmuster von Selenoproteinen im Gehirn wurden mit folgenden Zell-Linien gearbeitet: Neuronen (HT22, aus Maus), Mikroglia (BV2, aus Maus), Astrocyten (U-373, aus Mensch), Oligodendrocyten (OLN-73, aus Ratte) und cerebralen Endothelzellen (rBCEC4, aus Ratte). Diese wurden typgerecht kultiviert und für die Untersuchung der von ihnen exprimierten selenhaltigen Proteine mit  $^{75}\text{Se}$  markiert. Die Analyse der aus Zellkulturen gewonnenen Zell-Lysaten hatte gegenüber dem Hirngewebe einige vorteilhafte Eigenschaften. Da dem Kulturmedium der neu ausplattierten Zellen einmalig  $^{75}\text{Se}$  zugesetzt wurde und dieser Ansatz bis zur Ernte der Zellkultur nicht verändert wurde, waren alle selenhaltigen Proteine einer Zelle gleich stark markiert. Auch der bei der elektrophoretischen Proteintrennung des Hirngewebes ungünstig wirkende hohe Lipidanteil war in den *in vitro* gewonnenen Proben nicht vorhanden. Aus diesen Gründen konnten sehr gute Proteintrennungen durch SDS-PAGE und 2-dimensionale Gelelektrophorese durchgeführt werden, die scharfe  $^{75}\text{Se}$ -markierte Proteinbanden im Autoradiogramm lieferten.

Mit den  $^{75}\text{Se}$ -markierten Zell-Lysaten jedes Zelltyps wurden vergleichende Studien der Expressionsmuster durchgeführt. Wie die Homogenate des markiertem Hirngewebes wurden sie jeweils einem Zentrifugationsschritt bei  $120\,000 \times g$  unterzogen, wodurch die cytosolische von der pelletierten Proteinfractionen getrennt wurde. Pelletiert wurden bei dieser Zentrifugation alle membrangebundenen und kompartimentierten Proteine, so dass sie in einer ersten relativ groben Einteilung von den cytosolischen Proteinen unterschieden werden konnten. Die Proteine aller Fraktionen einer Zell-

Linie wurden in SDS-Gelelektrophoresen nach ihren Molekularmassen getrennt und die  $^{75}\text{Se}$ -markierten Proteine autoradiographisch detektiert.

Im Abschnitt 4.3.1.2 (S. 79 ff.) sind diese Ergebnisse in einer Tabelle zusammengestellt. Dabei wurden bis auf kleine Abweichungen in allen verwendeten Zell-Linien grundsätzlich ähnliche Expressionsmuster gefunden. Einzelne Zelltypen wiesen kleine Unterschiede auf. Im Gegensatz zu dem markierten Gewebe wurden in den Autoradiogrammen der Zellkulturen zusätzliche  $^{75}\text{Se}$ -markierte Banden zu den im oberen Text schon genannten Banden detektiert. In den Lysaten sowie in den Pellets der OLN-73 und der rBCEC4 wurde bei der Molekularmasse von 74 kDa stärker markierte Banden als in den anderen Zellen detektiert. Weiterhin wurde in diesen Zellen neben der 25 kDa-Bande eine markierte Bande bei ca. 22 kDa gefunden. Diese Molekularmasse ist möglicherweise durch die andere Spezies, aus denen die Zell-Linien erzeugt wurden, bedingt. In den Proben der HT22 und BV2 wurden bei 16 kDa eine  $^{75}\text{Se}$ -markierte Proteinbande gefunden. Da diese Proteinbande in den Cytosolen und Pellets gefunden wurde, könnte sie von einem membran-assoziierten Protein verursacht worden sein.

Auffällig waren 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 Zellen deutlich nachgewiesen werden konnte. In den Pellets aller Zell-Linien wurde bei ca. 34 kDa eine  $^{75}\text{Se}$ -markierte Proteinbande nachgewiesen, die in den Hirngewebe nicht detektiert worden war.

In Erweiterung dieser Proteintrennung und um eine bessere Zuordnung zu schon bekannten Selenoproteinen zu ermöglichen, wurden mit den Lysaten und den Cytosolen der Zellen 2-dimensionale Gelelektrophoresen durchgeführt. Überraschende Ergebnisse wurde bei dem Vergleich der 2D-Gele aller Zellen gefunden. Dort wurden  $^{75}\text{Se}$ -markierte Proteinspots bei 15 kDa mit IP-Werten von 4.6 – 4.8 und 7.8 – 8.2 nachgewiesen, wobei nur in den rBCEC4 weitere Spots mit IP-Werten bei 5.2 – 5.6 sowie 5.8 – 6.2 detektiert worden waren. Im Hirngewebe lagen bei dieser Masse auch insgesamt vier Proteinspots bei vergleichbaren IP-Werten, so dass anscheinend zwei Spots spezifisch von in Endothelzellen exprimierten selenhaltigen Proteinen stammen. Interessanterweise betrifft das auch den im Kleinhirn-Cytosol stärker markierten Proteinspot. In den Autoradiogrammen aller verwendeten Zell-Linien wurden  $^{75}\text{Se}$ -markierte Proteinspots bei 16 kDa und IP-Werten von 4.8 – 5.2 detektiert. Auch bei der Molekularmasse 10 kDa wurde in allen Zellen ein  $^{75}\text{Se}$ -haltiger Spot gefunden, der jedoch in den BV2-Zellen deutlich stärker nachgewiesen wurde. In diesen Zellen wurden ins-

gesamt bei 12 – 9 kDa Schwärzungen im Autoradiogramm nachgewiesen, die aber nicht gut fokussiert erschienen, diese Beobachtungen stimmen mit den Beobachtungen der 1-dimensionalen Proteintrennung der BV2-Zellen überein. Insgesamt deuten diese zellulären Studien auf ein/zwei endothel-spezifisch exprimierte Selenoproteine hin, deren Massen im SDS-Gel bei 15 kDa mit IP-Werten von 5.2 – 5.6 sowie 5.8 – 6.2 liegen. Dabei könnte es sich z.B. um Untereinheiten eines Dimers handeln, deren isoelektrischen Punkten kleine Differenzen zeigen.

Das Selenoprotein P konnte durch den spezifischen Antikörper, außer in den U-373 in allen Zell-Cytosolen der verwendeten Zell-Linien nachgewiesen werden.

### 5.5 Zuordnung gefundener <sup>75</sup>Se-markierter Proteine zu bekannten Selenoproteinen

Der Versuch die nachgewiesenen Proteinspots durch Vergleiche mit aus publizierten Daten berechneten Molekularmassen und IP-Werten den in silico identifizierten Selenoproteinen zuzuordnen war zum Teil erfolgreich. Es konnten Selenoprotein O, Selenoprotein T und Selenoprotein M beobachteten Proteinspots mit guten Wahrscheinlichkeiten zugeordnet werden.

So stammten die detektierten Proteinspots bei ca. 74 kDa mit dem IP von 4.8 – 5.0 wahrscheinlich von dem bisher nur in silico identifiziertem Selenoprotein O [69]. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf ein Transmembranprotein hin. In Lokalisationsversuchen durch in situ-Hybridisierungen wurde eine ubiquitäre, diffuse Verteilung beobachtet, wobei keine Zellkörper erkennbar waren (pers. Mitteilung Dr. A. Bräuer). Diese Beobachtung würde ebenfalls auf ein Protein hinweisen, dass transmembran, entlang der Dendriten lokalisiert ist.

Die Spots bei ca. 32 kDa sowie 27 kDa und den IP-Werten von 5.4 – 5.8 könnten den Massen nach von den Deiodasen 1 und -3 verursacht worden sein. Diese Proteine sind membran-assoziiert, was auch ihr Vorhandensein sowohl in den Cytosolen als auch in den Pellets erklärt. Die Proteine der Deiodasen schienen allgemein durch elektrophoretische Proteintrennung nur in seltenen Fälle in Gewebe-Proben jedoch besser in den Proben der kultivierten Zellen nachweisbar zu sein. Die genaue Zuordnung wird durch fehlende Vergleichsmöglichkeiten erschwert.



## 5.5 Zuordnung gefundener $^{75}\text{Se}$ -markierter Proteine zu bekannten Selenoproteinen

Die 18 kDa-Bande, die in den pelletierten Fraktionen nach 1-dimensionaler Protein-trennung gefunden wurde, könnte vom Selenoprotein T stammen, dessen Funktion noch unbekannt ist [65]. Beschrieben wurde es zuerst als Membranprotein der Mitochondrien [122]. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich vermuten, dass es auch in anderen intrazellulären Membranen enthalten ist. Seine fehlende Nachweisbarkeit nach 2D-Elektrophorese könnte durch den pH-Bereich der verwendeten IPG-Strips bedingt sein, wobei es, wegen seines stark basischen IP-Wertes über das basische Ende des Strips hinaus gelaufen sein könnte.

Bei ca. 16 kDa und den IP-Werten 4.8 – 5.2 wurde in den Proben der HT22 und BV2 ein markierter Proteinspot gefunden, dieses Protein wurde bereits von unserer Gruppe als peri-nucleäres Protein beschrieben [200]. Hierbei könnte es sich um das *in silico* erkannten Selenoprotein M handeln. Beschrieben ist von diesem Protein, dass es an peri-nucleäre Membranen assoziiert ist, wodurch auch erklärbar würde, warum es in den Proben der Zellen manchmal nur in den Cytosolen und einige Male auch in den pelletierten Fraktionen gefunden wurde.

Der Proteinspot bei 15 kDa und dem IP von 4.5–4.8 ist auf das 15 kDa-Selenoprotein zurückzuführen, das im Prostata-Epithel gefunden wurde [119]. Sein Vorhandensein wurde auch im Hirngewebe der Ratte belegt [201].

## 5.6 Expression selenhaltiger Proteine an der Blut–Hirnschranke

In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise auf einen Einfluss von Selen auf die Blut-Hirnschranke. Der Zusammenhang wurde insbesondere durch Untersuchungen von Öztas und seinen Mitarbeitern [184] deutlich. Dabei wurde eine verminderte Permeabilität der Blut–Hirnschranke während erhöhtem oxidativen Streß durch Selen-supplementation nachgewiesen. Der molekulare Mechanismus, der die Abnahme der Permeabilität der Blut–Hirnschranke verursacht, ist noch völlig unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Modell der Blut–Hirnschranke aus primären Astrocyten und der Zell–Linie cerebraler Endothelzellen rBCEC4 etabliert. Um die *in vitro*–Bedingungen den *in vivo*–Eigenschaften anzugleichen, wurden beide Zelltypen aus Wistar–Ratten gewonnen. Die hier angewandte Technik der Isolierung der Astrocyten aus dem Cortex neugeborener Wistar–Ratten lieferte gute Zellkulturen aus Astrocyten und wenigen Mikrogliazellen. Auch die durch die Markierungen mit  $^{75}\text{Se}$  erhaltenen Autoradiogramme der SDS–PAGE zeigten mit den Ergebnissen der *in vivo*–Untersuchungen übereinstimmende Muster exprimierter selenhaltiger Proteine. Daher wurden die so erzeugten primären Zellkulturen zur Co–Kultivierung mit den rBCEC4 verwendet. Die Kultivierung der beiden Zelltypen, deren Geno – und Phänotypen sich wechselseitig bedingen und die anschließend separat voneinander geerntet werden sollten, wurden in einem Kultivierungssystem aus 6-Well-Testplatten mit Filtereinsätzen vorgenommen. Im Abschnitt 3.4.2. wurde sehr ausführlich der schrittweise Aufbau der Co–Kultur beschrieben. Die Markierung der Zellen mit  $^{75}\text{Se}$ , sowohl in Mono–Kultur wie auch in Co–Kultur wurden für die Fragestellung optimiert.

Um den Einfluß der Co–Kultivierung auf die Expression selenhaltiger Proteine zu bestimmen wurden die exprimierten Selenoproteine der mono–kultivierten und die co–kultivierten Zellen miteinander verglichen. Die Expression von selenhaltigen Proteinen beider Zelltypen wird durch die Co–Kultivierung beeinflusst [202]. Die  $^{75}\text{Se}$ –markierten Lysate der co–kultivierten rBCEC4 zeigten in der SDS–Gelelektrophorese bei der Molekularmasse 15 kDa eine deutlich erhöhte Schwärzung. Das gleiche Ergebnis wurde in etwas schwächerer Ausprägung bei einem Zusatz von konditioniertem Kulturmedium der primären Astrocyten zum Kulturmedium der Mono–Kulturen von rBCEC4 gefunden. Daher kann vermutet werden, dass dieser Effekt in den rBCEC4 durch lösliche Mediatoren der Astrocyten induziert wurde, die mit dem konditionierten Kulturmedium auf die rBCEC4 übertragen worden waren.

Durch Versuche, bei denen verschiedene Mengen an  $^{75}\text{Se}$  zugesetzt wurden, sollten Hinweise auf die erforderliche Mindest–Selenkonzentration gewonnen werden, die die Hochregulation der markierten 15 kDa Bande. Hieraus ergaben sich aber keine neuen Ergebnisse bezüglich der markierten 15 kDa–Proteinbande. Es wurde beobachtet, dass die 10 kDa Bande bei geringen Selenzusätzen nur schwach nachweisbar waren. Dieses Ergebnis belegt, dass es sich hierbei um das Selenoprotein W handelt, von dem bekannt ist dass seine Expression annähernd linear mit der Selenversorgung ansteigt [118].

Die Ergebnisse der 2D–Gelelektrophorese mit den  $^{75}\text{Se}$ –Zellysaten ergaben leider nicht die eindeutige Zuordnung eines verstärkten Spots in den rBCEC4, aber neue  $^{75}\text{Se}$ –Proteinspots in den Astrocyten, die nur in den co–kultivierten Astrocyten gefunden wurden. Sie lagen bei 15 kDa und IP–Werten von 5.4 – 5.6 sowie 10 kDa und dem IP–Wert von 4.6 – 4.8. Die Position des 15 kDa–Spots war bei derselben Masse und annähernd demselben IP (5.4 – 5.6) wie auch im Cytosol der Endothelzellen gefunden worden. Hier scheint ein selenhaltiges Protein in den Astrocyten durch die Co–Kultivierung angeschaltet worden zu sein.

Die Eigenschaft der Hochregulation von spezifischen Proteinen in den Zellen der Blut–Hirnschranke und der damit verbundenen Ausbildung besonderer Schrankeigenschaften, ist seit längerem bekannt [152, 153]. Dass aber auch Selenoproteine der Endothelzellen betroffen sind, wurde bisher noch nicht beschrieben. Diese Ergebnisse weisen deutlich auf die Induktion von spezifischen Selenoproteinen an den Blut–Hirnschranke hin, die möglicherweise die besondere Dichte der Blut–Hirnschranke bei Selenzusatz mitbestimmt. Daher ist es von großem biochemischen und medizinischen Interesse die beteiligten Gene zu identifizieren und funktionell zu charakterisieren.