

**Identifizierung von Spurenelementproteinen im gastrointestinalen
Trakt der Ratte und Humanzelllinien unter Berücksichtigung des
Selen-Mangels**

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

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Torsten Bartz
aus Berlin

Dezember, 2008

Gutachter der eingereichten Dissertation:

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

Disputation am: 29.05.2009

In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,
die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben,
während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.
Isaac Newton

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe „Spurenelementforschung in den Biowissenschaften (SF 6)“ am Helmholtz Zentrum Berlin für Materialien und Energie unter der Leitung von Herrn Dr. Kyriakopoulos angefertigt.

Mein Dank gilt

Herrn Dr. A. Kyriakopoulos für das interessante Thema, das mir viel Freude bereitet hat, sowie die sehr engagierte Betreuung, Geduld und Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Dietrich Behne für die Übernahme des Gutachtens und für die wertvollen Ratschläge bei den analytischen Problemen.

Herrn Prof. Dr. U. Abram für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau Dr. D. Alber, sowie dem Team der NAA-Gruppe für die Bestrahlung der Proben und Auswertung der Gammaskpektren.

Herrn Dr. Ch. Wolf für die viele Ratschläge, Geräteeinweisungen, sowie die fachliche Hilfe bei der Lösung zahlreicher analytischer Probleme.

Frau A. Graebert beim Umgang mit der Zelllinie und Frau A. Söte für die Unterstützung bei der Zelllinie, sowie der ÄKTA.

Herrn Dr. A. Plotnikov für die Lösung sämtlicher IT-Probleme und für die Hilfe bei der Analyse der Dot-Blots.

Herrn J. Bartel für seine Vielseitigkeit und Zuverlässigkeit bei all seinem Mitwirken.

Herrn D. Schmidt ganz besonders für seine Hilfsbereitschaft und Wissen im Bereich der Biochemie.

Herrn Luigi Sparacio für seine immer „offene Tür“ und Freundschaft.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die überaus angenehme Arbeitsatmosphäre.

Herrn Dr. Pohl und Herrn Dr. Wacker von der WITA GmbH für die Durchführung der MALDI-MS sowie Herrn Dr. M. Jünger Aebersold Lab, Institute for Molecular Systems Biology, ETH Zürich, Schweiz für die Durchführung der LC/ESI-MS/MS; Herrn J. Franke und Dr. G. Niggemann für die Tierhaltung und Präparation.

Katja für die enorme Unterstützung, Motivation und den benötigten Rückhalt, sowie Lisa für die einfache Anwesenheit, aber auch meiner gesamten Familie, insbesondere meiner Mutter.

Susanne Schuck-Zöller, Joachim Zöller, Monika Danquah, Michael Bannmann und Klaus-Dieter Zahn, die meine Arbeit mit großem Interesse verfolgt haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Materialien und Methoden	5
2.1	Materialien	6
2.1.1	Chemikalien	6
2.1.2	Radiotracer ⁷⁵ Se	6
2.1.3	Versuchstiere	6
2.1.4	Zelllinie	7
2.1.5	Antikörper	7
2.2	Methoden	8
2.2.1	Probenvorbereitung	8
2.2.1.1	Homogenisierung der Gewebe und Zellen	8
2.2.1.2	Differenzielle Zentrifugation	8
2.2.1.3	Mikrowellenunterstützter Druckaufschluss	9
2.2.2	Biochemische Methoden	9
2.2.2.1	Proteinbestimmung nach Bradford	9
2.2.2.2	Glycin-SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (SDS-PAGE)	10
2.2.2.3	Tricin-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Tricin-PAGE)	11
2.2.2.4	Zwei-dimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE)	11
2.2.2.5	Zwei-dimensionale Gelelektrophorese (NEPHGE)	12
2.2.2.6	Doppelte SDS-PAGE (dSDS-PAGE)	12
2.2.2.7	Coomassiefärbung von Polyacrylamid-Gelen	12
2.2.2.8	Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen	13
2.2.2.9	Western Blot	13
2.2.2.10	Immunochemische Detektion	14
2.2.2.11	Autoradiographie	14
2.2.2.12	Zellvitalitätstest	15
2.2.2.13	MALDI-MS	15
2.2.2.14	LC/ESI-MS/MS	15
2.2.3	Analytische Methoden	16
2.2.3.1	Instrumentelle Neutronen Aktivierungsanalyse (INAA)	16
2.2.3.2	Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS)	17
2.2.3.3	Graphitrohr-Atom-Absorptionsspektrometrie (GF-AAS)	19
2.2.3.4	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Kopplung an die ICP-MS (HPLC-ICP-MS)	21
2.2.3.5	Laserablation mit Kopplung an die ICP-MS (LA-ICP-MS)	22
2.2.3.6	Statistische Auswertung	24
3	Zielsetzung	25
4	Ergebnisse	26
4.1	Bestimmung der Spurenelementverteilung	26
4.1.1	Konzentrationsbestimmung mittels INAA	26

4.1.1.1	Immunochemischer Nachweis der subzellulären Kompartimente durch differenzielle Ultrazentrifugation	29
4.1.1.2	Bestimmung der Spurenelementkonzentrationen in den subzellulären Fraktionen mittels INAA	31
4.1.1.3	Spurenelementverteilung in den subzellulären Fraktionen mittels LA-ICP-MS ..	36
4.1.2	Konzentrationsbestimmung mittels ICP-MS	42
4.1.3	GF-AAS	47
4.1.3.1	Methodenentwicklung.....	47
4.1.3.2	Konzentrationsbestimmung mittels GF-AAS	50
4.2	Zusammenfassung.....	53
4.3	Speziationsanalyse	55
4.3.1	Detektion spurenelementhaltiger Proteine mittels SEC-ICP-MS	55
4.3.1.1	Arsen im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren	57
4.3.1.2	Cadmium im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren	58
4.3.1.3	Kobalt im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren	59
4.3.1.4	Cäsium und Rubidium im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren	60
4.3.1.5	Kupfer im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren	61
4.3.1.6	Eisen im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren	63
4.3.1.7	Mangan im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren	64
4.3.1.8	Molybdän im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren	65
4.3.1.9	Nickel im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren	66
4.3.1.10	Selen im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren	67
4.3.1.11	Titan im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren	68
4.3.1.12	Vanadium im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren	69
4.3.1.13	Zink im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren	70
4.3.1.14	Speziationsanalyse des Zellzytosols der Zelllinie HT29	71
4.4	Zusammenfassung.....	73
4.5	Zellkulturversuche	74
4.5.1	Zellvitalitätstest (MTT) mit Molybdän	74
4.5.2	SEC-ICP-MS der Zelllinie HT29 nach Inkubation mit Molybdän	75
4.6	Zusammenfassung.....	76
4.7	Biochemische Trennverfahren und Autoradiographie	77

4.7.1	Auftrennung ⁷⁵ Se markierter Proteine mittels SDS-PAGE und Detektion des Tracers durch Autoradiographie.....	77
4.7.1.1	Auftrennung der ⁷⁵ Se-Proteine in den Homogenaten verschiedener Gewebe mittels SDS-PAGE und Detektion des Tracers durch Autoradiographie	77
4.7.1.2	Auftrennung der ⁷⁵ Se-Proteine im Homogenat der humanen Karzenomzelllinie HT29 mittels SDS-PAGE und Detektion des Tracers durch Autoradiographie	79
4.7.2	Untersuchungen zur Selenoproteinverteilung mittels 2D-Gelelektrophorese und autoradiographischer Detektion	80
4.7.2.1	Untersuchungen zur Selenoproteinverteilung mittels 2D-Gelelektrophorese und autoradiographischer Detektion in der Zunge.....	80
4.7.2.2	Untersuchungen zur Selenoproteinverteilung mittels 2D-Gelelektrophorese und..... autoradiographischer Detektion im Magen	81
4.7.2.3	Untersuchungen zur Selenoproteinverteilung mittels 2D-Gelelektrophorese und autoradiographischer Detektion im Magen	82
4.7.2.4	Untersuchungen zur Selenoproteinverteilung mittels 2D-Gelelektrophorese und autoradiographischer Detektion im Dickdarm.....	83
4.7.3	Unterschiede des Proteoms im Verdauungstrakt der Ratte in Abhängigkeit vom Selenstatus: Lokalisation und Identifizierung.....	84
4.7.3.1	Unterschiede des Zunge-Proteoms der Ratte in Abhängigkeit vom Selenstatus: Lokalisation und Identifizierung	85
4.7.3.2	Unterschiede des Magen-Proteoms der Ratte in Abhängigkeit vom Selenstatus: Lokalisation und Identifizierung	89
4.7.3.3	Unterschiede des Dünndarm-Proteoms der Ratte in Abhängigkeit vom Selenstatus: Lokalisation und Identifizierung	95
4.7.3.4	Unterschiede des Dickdarm-Proteoms der Ratte in Abhängigkeit vom Selenstatus: Lokalisation und Identifizierung	96
4.8	Zusammenfassung.....	97
4.9	Detektion und Lokalisation von Spurenelementproteinen mittels Immunotests	99
4.9.1	Immunochemischer Nachweis von Superoxid dismutase (SOD)	99
4.9.2	Immunochemischer Nachweis von Dermatopontin (DPT).....	100
4.9.3	Immunochemischer Nachweis von Lysyl oxidase (LOX).....	101
4.9.4	Immunochemischer Nachweis von Metallothionein (MT-I/MT-II)	102
4.9.5	Immunochemischer Nachweis des 15 kDa Selenoprotein (Sep15)	103
4.9.6	Immunochemischer Nachweis der Plasma Glutathion peroxidase (GPx3)	104
4.10	Zusammenfassung.....	105
4.11	Identifizierung des 7 kDa-Molybdän-bindenden Proteins	106
4.12	Zusammenfassung.....	111
5	Diskussion	112
6	Zusammenfassung.....	120
7	Literaturverzeichnis.....	124
	Erklärung.....	136

Veröffentlichungen.....	137
Lebenslauf.....	140
Anhang.....	141

1 Einleitung

Zu der Gruppe der Mineralstoffe gehören auch die Spurenelemente. Für Spurenelemente gibt es zwei gebräuchliche Definitionen. Die eine besagt, dass Spurenelemente in verschiedenen Medien in Massenanteilen von weniger als 50 mg/kg vorkommen. Die zweite Definition beschreibt Spurenelemente als die chemischen Elemente, die mit weniger als 0,01 % an der Körpermasse beteiligt sind, und bezieht sich somit auf das Biosystem des Lebewesens [1]. Mit einem Gesamtgehalt von 4,2 g für Eisen und 2,3 g für Zink im Körper sind diese beiden Elemente die Spurenelemente, die am häufigsten vorkommen [2]. Unterteilt werden können Spurenelemente in essentielle Spurenelemente und nicht essentielle Spurenelemente. Nicht essentielle Spurenelemente kann aber bedeuten, dass deren essentielle Funktion oder nützliche Aufgabe noch nicht bekannt ist. So kann man heute auch nicht mehr von toxischen Elementen sprechen, sondern von toxisch wirkenden Mengen und Konzentrationen. Für zahlreiche der in hoher Konzentration toxisch wirkenden Elemente wurde inzwischen nachgewiesen, dass sie in niedrigen Gehalten essentiell sind und dass Mangelerkrankungen auftreten, wenn sie nicht in ausreichender Menge im Körper vorhanden sind. Für den gesunden Organismus ist daher eine optimale Versorgung innerhalb der Grenzen zwischen beginnendem Mangel und beginnender Vergiftung notwendig. Spurenelemente, deren essentielle Funktion nachgewiesen wurde oder die als essentiell gelten, sind Arsen, Kobalt, Chrom, Kupfer, Eisen, Mangan, Molybdän, Nickel, Selen, Vanadium und Zink [3,4]. Die Form, in der Elemente dem Körper zugeführt werden, hat einen starken Einfluss auf die Aufnahme, die Anreicherung, den Transport und die Aktivität im lebenden Organismus. Für die Sicherstellung der Versorgung mit essentiellen Spurenelementen hat der Organismus hoch spezielle Mechanismen entwickelt, die die Aufnahme, Speicherung oder den Transport bewirken. So gibt es eine Vielzahl von Proteinen, die Metalle transportieren oder speichern können. Auch bei der Umwandlung von Metallen von ihrer anorganischen in eine bioverfügbare Form für die Aufnahme bzw. Ausscheidung, sind Proteine bzw. Enzyme beteiligt. Viele der Spurenelemente sind an Proteine gebunden und spielen eine wichtige biochemische oder physiologische Rolle im Körper. Außerdem sind sie wichtiger Bestandteil bei der Synthese oder strukturellen Stabilität [5] von Proteinen und Nukleinsäuren sowie als Antioxidantien zum Schutz vor reaktiven Sauerstoffverbindungen wie zum Beispiel in der Superoxid Dismutase (Kupfer/Zink, Mangan) und Glutathion Peroxidase (Selen). Transportproteine wie das Transferrin (Eisen) oder Albumin (Zink) übernehmen die Verteilung von Elementen im Körper. Speicherproteine wie das Ferritin (Eisen) binden Elemente bei Überschuss und gleichen eine unzureichende Versorgung durch deren Remobilisierung aus.

Arsen gehört zur 5. Hauptgruppe mit der Ordnungszahl 33 und besitzt eine atomare Masse von 74,92 u. Die biologische Bedeutung des Arsens für den Menschen ist noch nicht vollständig geklärt. Vermutlich wirkt es als Inhibitor für freie SH-Gruppen bestimmter Enzymsysteme und verhindert somit deren Wirkung. Meerestiere wie Muscheln enthalten besonders viel Arsen und dienen dem Menschen als Hauptquelle für die Arsenaufnahme.

Cadmium gehört zur 2. Nebengruppe mit der Ordnungszahl 48 und besitzt eine atomare Masse von 112,41 u. Ob Cadmium essentiell für den Organismus ist, konnte noch nicht vollständig geklärt werden. Der Transport von aufgenommenem Cadmium erfolgt durch Bindung an Metallothionein [6]. Die Aktivierung der Biosynthese des Metallothioneins wird unter anderem durch Cadmium induziert [7]. Die Akkumulation dieses Cadmium-Metallothioneinkomplexes erfolgt in der Leber und Niere und kann zur Schädigung dieser Organe führen. Im Fall der Niere kann dies eine Proteinurie zur Folge haben [8].

Kobalt gehört zur 8. Nebengruppe mit der Ordnungszahl 27 und besitzt eine atomare Masse von 58,93 u. Als essentielles Spurenelement ist es Bestandteil von Vitamin B₁₂ (Cobalamin) und wird durch Darmbakterien synthetisiert. Ein Mangel an Cobalamin führt zu Anämie und neurologischen Schäden [9]. Eine Überdosis an Kobalt kann zu Haut-, Lungen-, Magenerkrankungen, Leber-, Herz-, Nierenschäden und Krebsgeschwüren führen [10].

Chrom gehört zur 6. Nebengruppe mit der Ordnungszahl 24 und besitzt eine atomare Masse von 52,00 u. Physiologisch haben Chromverbindungen zusammen mit Insulin Bedeutung für den Glucoseabbau im Blut. Von toxikologischer Bedeutung sind nur die Chrom(VI)-Verbindungen. Sie sind mutagen und schädigen die DNA. Gelangen sie über die Atemwege in den Körper, können sie das Lungengewebe schädigen. Bei einer chronischen Exposition auf diesem Weg besteht ein erhöhtes Risiko für Lungenkrebs [1].

Die Alkalimetalle Rubidium und Cäsium mit den Ordnungszahlen 37 bzw. 55 besitzen atomare Massen von 85,47 u bzw. 132,91 u. Über die physiologische Wirkung von Cäsium auf den Menschen ist wenig bekannt. Rubidium hingegen wirkt im zentralen Nervensystem und beeinflusst dort die Konzentration von Neurotransmittern [11]. Ein Einsatz von Rubidium als antidepressiver Wirkstoff wird diskutiert. Ein Rubidiummangel kann bei Dialysepatienten auftreten [12,13].

Kupfer gehört zur 1. Nebengruppe mit der Ordnungszahl 29 und besitzt eine atomare Masse von 63,55 u. In geringen Konzentrationen wirken Kupferionen antibakteriell. Der tägliche Bedarf beim Menschen liegt bei ca. 2 mg [14]. Als Bestandteil des Hämocyanins, welches als Blutfarbstoff dem Sauerstofftransport in vielen Weichtieren und Gliederfüßern dient. In höheren Lebewesen ist es wichtiger Bestandteil vieler Enzyme. Als Bestandteil der Atmungskette kommt Kupfer in der Cytochrom oxidase vor, welche in den Mitochondrien lokalisiert ist. Überdies sind Kupferproteine an Redoxprozessen und antioxidativen Schutzsystemen beteiligt (Superoxid dismutase) [15]. Weiterhin werden sie für die Synthese von Bindegewebsproteinen benötigt [16-18]. Kupfermangelerscheinungen im Körper können sich durch Störungen des zentralen Nervensystems und der Bildung von Elastin oder Kollagen äußern.

Eisen gehört zur 8. Nebengruppe mit der Ordnungszahl 26 und besitzt eine atomare Masse von 55,85 u. Eisen ist als Fe^{2+} und Fe^{3+} essentiell für alle Organismen. Über die Nahrung wird das Eisen dem Körper zugeführt. Dabei wird über die Magensäure das Eisen aus der Nahrung herausgelöst und teilweise im Darm resorbiert. Als Transferrin wird es dann ins Blut transportiert und zum Aufbau von Hämoglobin im Knochenmark, Ferritin in der Leber, Myoglobin oder Cytochrom im Muskel sowie im Enzym Katalase, das in den Peroxisomen der Zellen das im Stoffwechsel entstehende Wasserstoffperoxid abbaut, und anderen Enzymen genutzt, die wichtige Funktionen in Atmungs- und Sauerstofftransportvorgängen ausüben [1]. Man kann die Eisenproteine in drei Gruppen unterteilen: Eisenporphyrinproteinen, Eisenschwefelproteine und Eisenproteine.

Mangan gehört zur 7. Nebengruppe mit der Ordnungszahl 25 und besitzt eine atomare Masse von 54,94 u. Das in zahlreichen Enzymen enthaltene Mangan wird u.a. zum Aufbau von Cholesterin oder Blutgerinnungsfaktoren benötigt. Es ist Bestandteil der antioxidativ wirkenden Superoxid dismutase (Mn-SOD), welche die Reduktion von H_2O_2 katalysiert [19]. Ein Mangel kann sich in Störungen des Fett- und Sexualhormonstoffwechsels äußern.

Molybdän gehört zur 6. Nebengruppe mit der Ordnungszahl 42 und besitzt eine atomare Masse von 95,94 u. Das Molybdän ist primär Bestandteil des Molybdän-Cofaktors der Molybdänenzyme in der löslichen Zellfraktion (Xanthin oxidase und Aldehyd oxidase) und der mitochondrialen Außenmembran [20-23]. Die Aldehyd oxidase ist strukturell und chemisch mit der Xanthin oxidase eng verwandt und beeinflusst dennoch unterschiedliche katalytische Prozesse. Obwohl beide Enzyme die Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin katalysieren, erfolgt die Umwandlung von Xanthin zu Harnsäure nur durch die Xanthin oxidase. Ein Mangel an Molybdän bzw. dem Molybdän-Cofaktor führt zu gleichzeitigem Verlust der Sulfid oxidase-, Aldehyd oxidase- und Xanthin oxidase-Aktivität. Charakteristisch für Molybdän-Cofaktormangel-Patienten sind neurologische Schäden, die in den meisten Fällen zu frühem Kindstot aufgrund der geringen Konzentration der Sulfid oxidase, die den Organismus, insbesondere das Gehirn, vor toxischen Mengen an Sulfid schützt [24].

Nickel gehört zur 8. Nebengruppe mit der Ordnungszahl 28 und besitzt eine atomare Masse von 58,70 u. Zusammen mit Eisen kommt Nickel in Hydrogenasen vor. Unklar ist hierbei, ob das Nickel darin notwendigerweise oder ersatzweise anstelle von Eisen vorkommt [25].

Selen gehört zur 6. Hauptgruppe mit der Ordnungszahl 34 und besitzt eine atomare Masse von 78,96 u. Lange Zeit wurde angenommen, dass Selen im menschlichen Körper nur eine toxische Wirkung hat. Durch zahlreiche Versuche wurde jedoch nachgewiesen, dass es sich bei Selen um ein Element handelt, welches für den Organismus lebensnotwendig ist. Das essentielle Spurenelement Selen ist Bestandteil von Selenoproteinen und wird in diese in Form von Selenocystein, der „21. Aminosäure“, während der Proteinbiosynthese eingebaut [26]. Seit 1998 ist auch die 22. proteinogene Aminosäure Pyrrolysin (Derivat des Lysins) bekannt, die in Methyltransferasen der Archaeobakterien gefunden wurde [27]. Als Selenoproteine werden die Proteine bezeichnet, die Selenocystein in ihrer Aminosäuresequenz enthalten, wohingegen selenbindende Proteine Selenomethionin enthalten. Dieses wird allerdings nicht spezifisch, sondern zufällig statt Methionin oder mit einer noch ungeklärten Bindungsform in Proteinsequenzen eingebaut. In Studien an der amerikanischen Bevölkerung wurde durch langjährige Versorgung mit erhöhten Dosen von Selenomethionin ein deutlicher Rückgang der Krebserkrankungen an Lunge, Dickdarm und Prostata belegt [28]. Die Selenoenzyme haben u.a. protektive Eigenschaften in Bezug auf oxidativen Stress [29]. Der Mangel kann zu Abwehrschwäche, Herz- Kreislauf- und Gelenkerkrankungen führen. Weiterhin wurde festgestellt, dass ein Selenmangel zu Unfruchtbarkeit beim Mann führt. Die Keshan-Krankheit ist eine in China auftretende Herzmuskelschwäche, die aus dem Verzehr der regional angebauten und sehr selenarmen Feldfrüchte resultiert [30]. Die erhöhte Aufnahme von Selen (> 300 mg/Tag) lässt das Element toxisch wirken. Dies führt zu Symptomen wie Haarausfall, Ermüdung, Reizbarkeit, Übelkeit, Erbrechen und Zyanose, welchen letztendlich der Tod folgt. Mehr als 30 Selenoproteine in verschiedenen Gewebekompartimenten und subzellulären Zellkompartimenten der Ratte konnten mittels Radiotracer-Techniken gezeigt werden [31]. Bis heute gehören zu den bekannten eukaryotischen Selenoproteinen vier Gluthationperoxidasen, drei Thyroid-Hormon-Deiodinasen, drei Thioredoxin-Reduktasen, Selenophosphat-Synthetase 2, das 15 kDa Selenoprotein sowie die Selenoproteine P, T, W, N und R [32]. Die Mehrheit der Selenoproteine übt eine bisher unbekannt Funktion aus. Alle Selenoproteine jedoch, deren Funktion bekannt ist, katalysieren Redoxreaktionen und sind somit an wichtigen Zellabläufen beteiligt.

Titan gehört zur 4. Nebengruppe mit der Ordnungszahl 22 und besitzt eine atomare Masse von 47,88 u. Über physiologische Wirkungen von Titan ist nichts bekannt.

Vanadium gehört zur 5. Nebengruppe mit der Ordnungszahl 23 und besitzt eine atomare Masse von 50,94 u. Charakteristisch für Vanadium ist, dass es sowohl anionisch als Vanadat, als auch kationisch vorkommt und in beiden Formen mit Proteinen in Wechselwirkung treten kann. Vanadate besitzen große Ähnlichkeit zu Phosphaten und haben dementsprechend ähnliche Wirkungen. Da Vanadat stärker an geeignete Enzyme bindet als Phosphat, ist es in der Lage, Enzyme der Phosphorylierung zu blockieren und so zu steuern [1].

Zink gehört zur 2. Nebengruppe mit der Ordnungszahl 30 und besitzt eine atomare Masse von 65,38 u. Es zählt zu den wichtigsten essentiellen Spurenelementen und ist Bestandteil von vielen Enzymen. Es erfüllt wichtige Funktionen des Stoffwechsels und wirkt als Stabilisator biologischer Membranen und ist ein Bestandteil DNA-bindender Proteine (Zinkfinger-Proteine). Ein Zinkmangel kann u.a. zu Störungen des Immunsystems, Veränderungen des Haut- und Knochenbaus sowie zu Wachstumsstörungen führen.

Das Verdauungssystem der Ratte ist dem des Menschen sehr ähnlich. Es umfasst den Rachen mit der Zunge und den Speicheldrüsen, die Speiseröhre, den Magen und den Darm. Dieser unterteilt sich in Duodenum, Dünndarm, Blinddarm und Dickdarm. In das Duodenum münden der Gallengang aus der Leber und die Bauchspeicheldrüse. Abbildung 1 zeigt schematisch den Verdauungstrakt der Ratte.

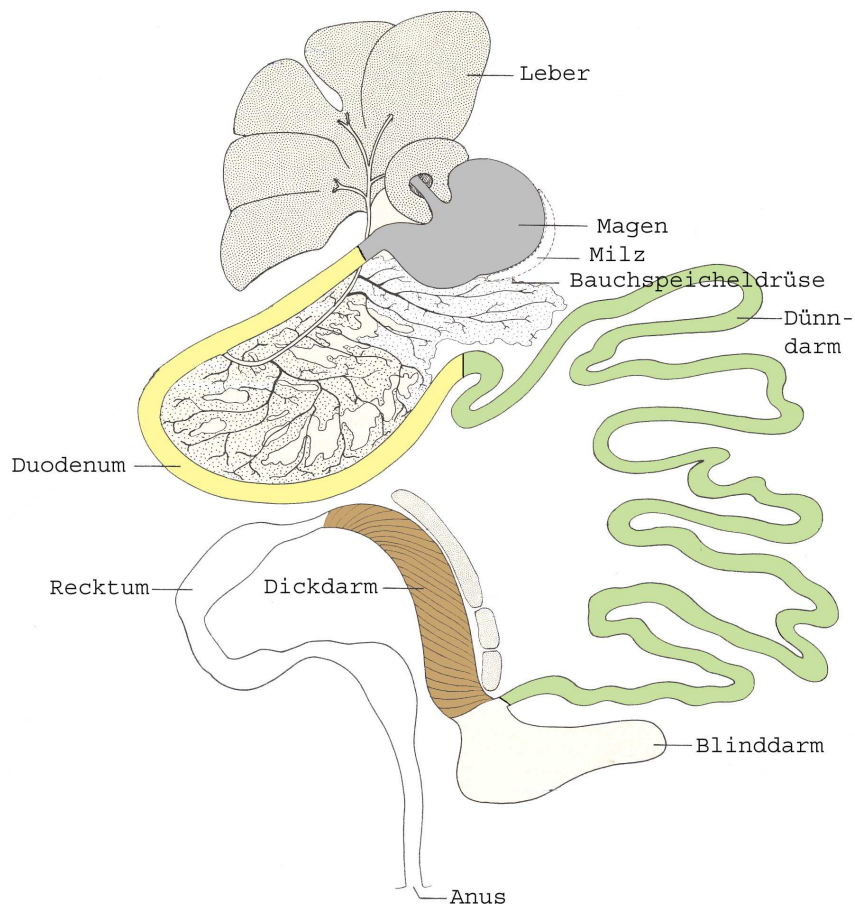


Abb. 1: Schematische Darstellung des Verdauungstraktes der Ratte

Die Nahrung wird im Rachenraum grob zerkleinert und mit Speichel geschmeidig gemacht. Durch das im Speichel enthaltene Enzym Speichel-Amylase beginnt die Verdauung von Stärke in der Nahrung. Über die Speiseröhre, die Längsmuskeln sowie ringförmige Muskeln besitzt, wird durch peristaltische Bewegungen die Nahrungsmasse in den Magen befördert. Ein Schließmuskel verhindert den Rückeintritt der Nahrungsmasse in die etwa 2 mm durchmessende Speiseröhre.

Der Magen besitzt ca. 0,5 % der Körpermasse der Ratte. Er ist ein sackförmiges Gebilde mit zwei sich deutlich unterscheidenden Regionen. Weißlich-durchscheinend mit Schleim-, aber ohne Verdauungsdrüsen stellt sich eine der beiden Regionen dar. Die zum Ausgang des Magens hin gelegene Region ist rötlich-grau, hochvaskulär und muskulär. Sie weist zahlreiche interne Längsfaltungen sowie Verdauungsdrüsen auf. Durch einen pH-Wert von 3,6, der im Magen herrscht, wird die Wirkung der Speichel-Amylase gehemmt und ermöglicht dem Verdauungsenzym Pepsin, Proteine zu hydrolysieren. Über einen Schließmuskel am Ausgang des Magens können nur geringe Mengen an vorverdauter Nahrung auf einmal in das Duodenum gelangen.

Mit einer Länge von ca. 9-10 cm stellt das Duodenum den ersten Abschnitt des Darmes dar. Die Mukosa des Duodenums bildet kammartige Falten von 1 mm Stärke und 5 mm Länge quer zur Längsachse des Verdauungsschlauches. In das Duodenum mündet der Gallengang aus der Leber. Aufgrund einer fehlenden Gallenblase im Vergleich zum Menschen besitzt die Ratte einen Schließmuskel, der die Abgabe des Gallensekrets in das Duodenum kontrolliert. Neben der Vielzahl an metabolischen Funktionen, die die Leber erfüllt, dient das in der Leber gebildete Gallensekret der Fettverdauung, indem es die Lipide emulgiert und für fettspaltende Enzyme (Lipasen) in kleine, angreifbare Tröpfchen zersetzt. Das Gallensekret ist leicht basisch, um den aus dem Magen austretenden Nahrungsbrei zu neutralisieren, so dass die Verdauungsenzyme der Bauchspeicheldrüse nicht gehemmt werden. Die wichtigsten funktionellen Bestandteile sind

jedoch die Gallensalze, denen eine zentrale Rolle in der Fettverdauung zukommt. Zahlreiche Pankreasgänge münden aus der Bauchspeicheldrüse in das Duodenum (beim Menschen mündet nur ein Hauptgang ins Duodenum). Der Bauchspeichel enthält neben Pankreas-Lipase und -Amylase die Vorstufe des Trypsins. Die Lipase hydrolysiert Fette zu Fettsäuren und Glycerol, die Amylase hydrolysiert Stärke und Dextrin zu Maltose. Durch das Trypsin werden einige Aminosäuren aus den Proteinen freigesetzt. Der Großteil jedoch liegt aber immer noch in Form von Polypeptiden vor.

Durch eine Länge von ca. 115 cm wird genügend Oberfläche für die Nährstoffaufnahme durch die Darmwand des Dünndarms zur Verfügung gestellt. Die Muskulatur des Dünndarms ähnelt der der Speiseröhre, so dass peristaltische Bewegungen möglich sind. Dadurch wird der Nahrungsbrei durchmischt und weiterbewegt. Die Innenwand ist in transversale Falten geworfen, die zum einen die Oberfläche erhöhen, zum anderen als natürliche Schwellen die Durchmischung unterstützen. Sie sind außerdem von zahlreichen Zotten überzogen, die die Oberfläche noch weiter vergrößern. Der gesamte Dünndarm ist der Hauptort der Verdauung. Hier nimmt die Darmwand die Nahrungsbestandteile (Kohlenhydrate, Eiweißstoffe, Fette, Vitamine und Salze) auf, die durch die Verdauungsenzyme am Ende des Verdauungsvorganges entstanden sind. Das Ileum, welches das Ende des Dünndarms markiert, ist darüber hinaus noch für die Immunabwehr zuständig.

Die Länge des Dickdarms beträgt im Vergleich zum Dünndarm gerade mal ein Sechstel. Wenn die Nahrung den Dickdarm erreicht, ist die Verdauung weitgehend abgeschlossen. Im Dickdarm erfolgt die Resorption von Wasser, wodurch der Nahrungsbrei verdickt wird [33].

2 Materialien und Methoden

In dieser Arbeit wurden elementanalytische Methoden und Radiotracer-Techniken mit biochemischen Methoden kombiniert. Die Beschreibungen der Methoden erfolgen weiter unten. Detaillierte Angaben sind im Experimentellen Teil dieser Arbeit zu finden.

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Grundsätzlich wurden nur Chemikalien der Qualität „zur Analyse“ oder besser verwendet. Das deionisierte Wasser stammte aus einem Milli-Q-System der Firma Millipore (Eschborn, Deutschland) und hatte einen Leitwert $\geq 10\text{M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$.

2.1.2 Radiotracer ^{75}Se

Die Versuchstiere sowie die Zellkultur wurde *in vivo* bzw. *in vitro* mit ^{75}Se markiert. Dieses Nuklid hat eine Halbwertszeit von 120,6 Tagen und zerfällt durch Elektroneneinfang zu ^{75}As . Da das eingefangene Elektron meist aus der innersten Elektronenschale stammt, wird in dieser ein Platz frei und Elektronen aus den äußeren Schalen rücken nach, wobei charakteristische Röntgenstrahlung emittiert wird. Die emittierten γ -Strahlen haben Energien von 121,1 keV, 136,0 keV, 264,7 und 279,5 keV. Zur Erzeugung des ^{75}Se wurde angereichertes, elementares ^{74}Se ca. 180 Tage im Forschungsreaktor BERII des Helmholtz Zentrum Berlin mit Neutronen bestrahlt. Mit konzentrierter Salpetersäure wurde das Selen zu seleniger Säure oxidiert. Diese wurde mit Natronlauge neutralisiert und in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen.

2.1.3 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden sechs Monate alte, männliche Wistar Ratten (*Rattus norvegicus*, Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden in der Abteilung Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Charité am Campus Benjamin Franklin bei einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus (12 h) gehalten. Die Ratten erhielten ein spezielles Futter und deionisiertes Wasser. Eine Sorte des Futters bestand aus einem Selenmangelfutter mit einer Selen-Konzentration von 3-7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Trockenmasse, bei der anderen Sorte handelte es sich um selenadäquates Futter, welchem Natriumselenit zugegeben wurde und das eine Selenkonzentration von 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Trockenmasse enthielt. Für die Versuche wurden die Ratten mit dem Selenmangelfutter über mehrere Generationen ernährt.

Die Markierung der Ratten mit ^{75}Se erfolgte durch intraperitoneale (ip) Verabreichung *in vivo* durch 0,5 ml einer physiologischen Kochsalzlösung, in der das radioaktive Natriumselenit enthalten ist, mit einer spezifischen Aktivität von 75 MBq. Die Tötung der Tiere erfolgte fünf Tage nach der Applikation, um eine Metabolisierung des ^{75}Se zu gewährleisten.

2.1.4 Zelllinie

HT29/B6 Zellen sind Subclone der humanen kolorektalen Karzenomzelllinie HT29, die sich bekannter Maßen differenziert, wenn sie ohne Glucose kultiviert wird. HT29/B6 sind intestinale Epithelzellen und wachsen zu einem Monolayer heran. Sie bilden einen apikalen Bürstensaum sowie interzelluläre Schlussleisten. Weiterhin wurden typische Eigenschaften von Kolonepithel, wie die Sekretion von Mukus (Schleim) und Chlorid, nachgewiesen [34]. Die Zellen wurden in Kulturflaschen mit einem Zellkulturmedium (RPMI 1640 mit 2 % stabilisiertem N-acetyl-L-Alanin-L-Glutamin und 2,0 g/l NaHCO₃, Biochrom KG, Berlin, Deutschland) mit 10 % fetalem Kälberserum, 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom) bei 37°C und einer Atmosphäre von 95 % Luft und 5 % CO₂ kultiviert. Der Wechsel des Kulturmediums sowie die Trypsinierung mit anschließender Neuaussaat, im Verhältnis 1:8, erfolgte alle vier Tage. Für analytische Untersuchungen wurden das Kulturmedium abdekantiert, die Zellen dreimal mit PBS-Puffer gewaschen und vom Boden der Zellkulturflasche abgeschabt. Anschließend wurden die Zellen bei 200 x g zentrifugiert und sorgfältig vom PBS-Puffer abdekantiert. Die radioaktive Markierung der Zellen erfolgte durch die Zugabe von Natriumselenit mit einer spezifischen Aktivität von 6 kBq. Dabei wurde das Natriumselenit dem Nährmedium zugegeben und über vier Tage inkubiert.

2.1.5 Antikörper

Um einzelne Proteine zu identifizieren, kann u.a. das „Schlüssel-Schloß-Verhalten“ von Antikörper und Antigen ausgenutzt werden. Dazu wird ein zum gesuchten Protein (Antigen) passender Antikörper hergestellt, indem das gereinigte Protein oder eine synthetische Teilsequenz mehrfach in kleinen Dosen einer fremden Spezies (meist Kaninchen oder Maus) injiziert wird. Nach Einsetzen der Immunantwort kann der Antikörper aus dem Blut des Tieres gewonnen werden. Antikörper besitzen auf der einen Seite Gruppen, mit denen sie das Antigen binden, auf der anderen Molekülseite sitzen Gruppen, die es den Makrophagen und anderen Fresszellen ermöglichen, den Antigen-Antikörperkomplex zu „erkennen“. Für die immunochemischen Test wurden folgende Antikörper verwendet: rabbit-anti-human-Superoxid-Dismutase (SOD) von BioGenes (Berlin, Deutschland); mouse-anti-β-Actin von Sigma (Hamburg, Deutschland); goat-anti-rabbit-IgG von LiCor (Bad Homburg, Deutschland); goat-anti-mouse-IgG von LiCor (Bad Homburg, Deutschland); rabbit-anti-human-Dermatopontin (DPT) von BioGenes (Berlin, Deutschland); rabbit-anti-rat-Lysly Oxidase (LOX) von BioGenes (Berlin, Deutschland); native-lapine-Metallothionein (MT) von AbD-Serotech (Oxford, Großbritannien); mouse-anti-rabbit-Metallothionein (MT-I, MT-II) von Stressgen (Ann Arbor, USA); mouse-anti-rat-saures 15kDa-Selenoprotein (Sep15) von BioGenes (Berlin, Deutschland); mouse-anti-Glutathionperoxidase (GPx3) von BioGenes; mouse-anti-human anti hnRNP L (Zellkern-Marker) von abcam (Cambridge, Großbritannien); mouse-anti-Prohibitin (Mitochondrien-Marker) von Acris Antibodies (Hiddenhausen, Deutschland).

2.2 Methoden

2.2.1 Probenvorbereitung

Die Gewebeentnahme erfolgte durch die Betäubung der Versuchstiere mittels Flourene® und die darauf folgende Herzpunktion, bei der der größte Teil des Blutes entnommen wurde. Diese milde Art der Tötung setzt die Bildung von Stressproteinen stark herab. Die Gewebe wurden nach ihrer Entnahme bei -80°C bis zu ihrer Verwendung tiefgefroren.

Für die analytischen Untersuchungen wurde die Proben aufgetaut und mit bidest. Wasser gewaschen, um Speisereste, Haare, die durch die Entnahme der Gewebe anhafteten, und Kot zu entfernen. Ebenfalls wurde vorhandenes Fettgewebe entfernt. Für spätere Angaben der Elementkonzentrationen bezogen auf die Trockenmassen wurden die gereinigten Gewebe wieder eingefroren und lyophilisiert.

2.2.1.1 Homogenisierung der Gewebe und Zellen

Vor der Homogenisierung der Gewebe des Verdauungstrakts wurden diese mit bidest. Wasser gewaschen, wie unter 2.2.1 beschrieben. Mit Ausnahme der ⁷⁵Se markierten Tiere wurden die Organe mittels eines Glaspotters (Braun, Deutschland) und des Tris-HNO₃-Puffers von 2-3-fachem Volumen (pH 7,4) bezüglich der Feuchtmasse des Organs homogenisiert. Bindegewebsstücke und andere nicht zerkleinerte Feststoffe wurden durch Filtration durch eine, zuvor mit 5 % HNO₃ gereinigte, Gaze (Porengröße 80 µm) entfernt. Die Verwendung einer Mixtur von Proteaseinhibitoren wurde vermieden, da diese meistens EDTA (Ethylendiamintetraacetat) enthalten und die Metalle aus den Metall-Komplex-Proteinen entfernen würde.

Die Homogenisierung der ⁷⁵Se markierten Gewebe erfolgte durch den Einsatz eines Handhomogenisators, Polytron PT 1300 der Firma Kinematica (Littau-Luzern, Schweiz).

Mittels Ultraschall wurden die Zellen der Zellkultur HT29 in einem 2 fachen Volumen zur Zellmasse homogenisiert.

2.2.1.2 Differenzielle Zentrifugation

Durch differenzielle Zentrifugation wurden die gewonnenen Gewebekomponenten in ihre subzellulären Kompartimente getrennt. Die Zellorganellen nehmen unterschiedliche Funktionen wahr. Der Zellkern enthält unter anderem die genetische Information. Die Mitochondrien liefern durch oxidativen Abbau von Nährstoffen Energie. Das Endoplasmatische Retikulum (ER) ist zusammen mit den Ribosomen und dem Golgi-Apparat an der Proteinsynthese beteiligt. Lysosomen und Peroxisomen dienen beispielsweise dem Abbau von Makromolekülen. Eine Vielfalt von Stoffwechselprozessen finden im Zytosol statt [35]. Die Auftrennung in die Fraktionen Zellkerne, Mitochondrien, Mikrosomen (bestehend Lysosomen, Peroxisomen, Ribosomen, ER und Golgi-Apparat) und Zytosol ist durch die Anwendung spezifischer Puffersysteme und von unterschiedlichen Winkelbeschleunigungen sowie Zentrifugationszeiten möglich, da die Zellkompartimente verschiedene Größen und Dichten aufweisen.

Die Kernfraktion wurde durch Zentrifugation des Homogenats bei 1000 x g für 10 min erhalten. Das Sediment (Pellet) enthielt die Zellkerne, während der Überstand abdekantiert und bei 10000 x g für 35 min erneut zentrifugiert wurde. In dem dadurch entstehenden Pellet befanden sich die Mitochondrien. Der Überstand wurde abgenommen und bei 100.000 x g für 80 min nochmals zentrifugiert. Hierbei wurden die Mikrosomen (Pellet) vom Zytosol (Überstand) separiert [36]. Alle Sedimente wurden gewaschen, indem sie zweimal mit dem Homogenisierungspuffer resuspendiert und zentrifugiert wurden. Um die Kühlkette nicht zu unterbrechen wurde bei 4°C zentrifugiert. Verwendung fand eine Optima Max-XP Ultrazentrifuge mit einem MLA-55 Rotor der Firma Beckman Coulter (Fullerton, USA).

2.2.1.3 Mikrowellenunterstützter Druckaufschluss

Die Bestimmung der Spurenelemente mittels AAS und ICP-MS setzt voraus, dass die zu bestimmenden Elemente in Lösung vorliegen. Aus diesem Grund wurden die zuvor gefriergetrockneten Proben in PTFE (Polytetrafluoroethylen) Druckbehältern eingewogen und mit konz. HNO₃ (suprapur) und 30 % H₂O₂ versetzt. Innerhalb von 10 min wurde der Inhalt der Gefäße auf 180°C erhitzt und für 20 min konstant gehalten [37]. An diesem Punkt unterscheidet sich der mikrowellenunterstützte Aufschluss von anderen Aufschlussverfahren. Durch die Mikrowellenstrahlung werden die Dipole des vorhandenen Wassers in Rotation versetzt, durch die damit verbundene Reibung entsteht die Wärme im Gefäß. Bei anderen Aufschlussverfahren wird die Wärme von außen zugeführt. Das hat die Nachteile, dass zum einen die Aufheiz- und Abkühlungszeiten länger dauern, zum anderen steigen die Temperatur sowie der Druck am Zersetzungspunkt durch exotherme Reaktion schlagartig an. Bei dem druckkontrollierten Mikrowellenaufschluss kann die Leistung der Mikrowellenstrahlung an diesem Punkt automatisch verringert werden, sodass der Aufschluss wesentlich materialschonender verläuft.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt einer Probe kann kolorimetrisch nach der Methode von Bradford bestimmt werden [38]. Das Funktionsprinzip beruht auf einer Absorptionsverschiebung des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G-250 von 465 nm zu 595 nm in saurer Lösung [39]. Der Farbstoff bildet Komplexe mit kationischen sowie unpolaren und hydrophoben Seitenketten der Proteine. Dabei bindet sich der Farbstoff an aromatische und basische Aminosäuren wie Tryptophan oder Arginin. Des Weiteren gibt es Wechselwirkungen mit Lysin, Histidin, Tyrosin und Phenylalanin. Die mit den Proteinen gebildeten Komplexe stabilisieren den Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfonatform. Die Absorption korreliert direkt mit der Proteinkonzentration. Die Farbreaktion ist aber von Protein zu Protein verschieden, sodass eine Kalibrierung mit einem Standardprotein erforderlich ist. Für die photometrischen Messungen wurde ein Photometer der Firma Varian Typ: Carry 50 (Mulgrave, Australien) benutzt. Als Standardprotein wurde das bovine serum albumin (BSA) verwendet. Die hohe Empfindlichkeit sowie die geringe Störanfälligkeit sind Vorteile der Proteinbestimmung nach Bradford.

2.2.2.2 Glycin-SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine diskontinuierliche Gelelektrophorese. Sie ermöglicht das Auftrennen von Proteingemischen über die Molekulargröße. Laemmli entwickelte die Methode von Davis und Ornstein weiter [40-42]. Diese bestand aus Sammel- und Trenngel. Laemmli verwendete zudem noch sodium dodecyl sulfate (SDS), welches sich nach der Denaturierung des Proteins an die Peptidketten im Verhältnis von 1,4 g SDS : 1 g Protein anlagert. Das entspricht in etwa einem Molekül SDS pro drei Aminosäuren. Die so entstandenen, negativ geladenen Polypeptid-Mizellen besitzen ein konstantes Verhältnis von Ladung zu Molekulargewicht. Die Eigenladung des Proteins wird somit überdeckt. Als Matrix wird ein Co-Polymer aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid und Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem verwendet. Das Bisacrylamid führt zur Quervernetzung der Polyacrylamidstränge. Die mittlere Porengröße hängt von der eingesetzten Konzentration des Acrylamids und des Bisacrylamids ab. Der pH-Wert des Sammelgels beträgt 6,8. Unter diesen Bedingungen weisen die Chloridionen eine höhere Mobilität beim Anlegen einer Spannung auf, als die im Laufpuffer enthaltenen Glycinionen. Hinter den schnell wandernden Chloridionen kommt es zu einer Verarmung von Ladungsträgern und somit zu einer Verstärkung des elektrischen Feldes. Das Resultat ist ein Stapeleffekt der Proteine zwischen den Chlorid- und Glycinionen. Die Proteine laufen dann als eine scharfe Front in das Trenngel ein. Der pH-Wert des Trenngels beträgt 8,8. Das Glycin wird vollständig ionisiert und die Mobilität im elektrischen Feld erhöht sich. Das Trenngel wirkt wie ein Molsieb. Die Proteine werden dort ihrem Molekülradius nach aufgetrennt. Durch den Einsatz von Proteinstandards (Marker) kann den Proteinen in der Probe ein apparentes Molekulargewicht zugeordnet werden. Die Zusammensetzungen der Lösungen, die für die SDS-PAGE Verwendung fanden, sind in den Tabellen 1 und 2 wiedergegeben.

Acrylamid-/ N,N'methylenbisacrylamid-Lsg	30 % (w/v) 0,8 % (w/v)
SDS-Lsg	10 % (w/v)
TEMED (N,N,N'N'- Tetramethylethyldiamin)	0,06 % (v/v)
APS (Ammoniumpersulfat)	10 % (w/v)
Tris-HCL (Tris(hydroxymethyl)aminometan)	0,5 mol/L; pH 8,8

Tab. 1 Zusammensetzung der Lösungen für das Trenngel

Acrylamid-/ N,N'methylenbisacrylamid-Lsg	30 % (w/v) 0,8 % (w/v)
SDS-Lsg	10 % (w/v)
TEMED (N,N,N'N'- Tetramethylethyldiamin)	0,1 % (v/v)
APS (Ammoniumpersulfat)	10 % (w/v)
Tris-HCL (Tris(hydroxymethyl)aminometan)	0,5 mol/L; pH 6,8

Tab. 2 Zusammensetzung der Lösungen für das Sammelgel

Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer verdünnt und für 5 min bei 95°C erwärmt. Tabelle 3 zeigt die Zusammensetzung des Probenpuffers.

Glycerol	87 % (w/v)
SDS-Lsg	10 % (w/v)
DTT (Dithiothreitol)	0,2 mol/L
Tris-HCL	0,5 mol/L; pH 6,8
Bromphenolblau	0,2 % (w/v)

Tab. 3 Zusammensetzung des Probenpuffers

Der Laufpuffer bestand aus 50 mmol/L Tris, 200 mmol/L Glycin und 0,1 % (w/v) SDS. Die Trennung erfolgte bei 25 mA für ca. 2,5 h.

2.2.2.3 Tricin-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Tricin-PAGE)

Die Tricin-PAGE nach Schägger und von Jagow eignet sich besonders gut für die Auftrennung von Proteinen mit einer Molekularmasse von 1-100 kDa [43]. Die Methode unterscheidet sich von der nach Laemmli dadurch, dass anstelle von Glycin Tricin eingesetzt sowie der pH-Wert des Gels verringert wird. Die Besonderheit beim Einsatz von Tricin gegenüber Glycin liegt darin, dass sich die Laufgeschwindigkeiten von Tricin zu den Proteinen sich geringer unterscheiden. Die Proteine werden dadurch zwar weniger stark gesammelt, können aber dafür in einem größer porigen Gel getrennt werden. Kleinere Proteine, die in der Nähe des SDS laufen, geben deshalb schärfere Banden, da sie früher vom SDS getrennt werden.

2.2.2.4 Zwei-dimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE)

Die zwei-dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese eignet sich für die Trennung komplexer Proteingemische und kombiniert zwei unabhängige Trennverfahren. Im ersten Schritt werden die Proteine isoelektrisch fokussiert. Die Eigenladung des Proteins in Abhängigkeit zum pH-Wert des umgebenden Mediums ist die bestimmende Eigenschaft. Im elektrischen Feld wandert ein Protein in einem mit pH-Gradienten hergestellten Gel bis zu einem gewissen Punkt und verliert dort seine Nettoladung. An diesem, dem isoelektrischen Punkt (pI), ist die elektrophoretische Beweglichkeit aufgehoben, und die Proteine mit dem gleichen pI werden an dieser Stelle fokussiert. Im zweiten Schritt der Trennung lassen sich die so fokussierten Proteine in einer SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht separieren. Eine solche hochauflösende Methode wurde von Klose sowie von O'Farrell entwickelt [44,45]. Bei der Auftrennung von Proteingemischen mittels 2D-PAGE ist es möglich, die Gemische so hoch aufzulösen, dass auf einem Gel bis zu 10000 Proteine aufgetrennt werden können [46]. Ein weiterer Vorteil der 2D-PAGE ist die Flexibilität. Entsprechend der Probencharakteristik kann der pH-Gradient in der ersten Dimension sowie die Quervernetzung in der zweiten Dimension angepasst werden. Diese Methode findet neben der Proteomanalyse (Proteomics) auch in der klinischen Diagnostik breite Anwendung [47,48].

2.2.2.5 Zwei-dimensionale Gelelektrophorese (NEPHGE)

Bei der Kombination von isoelektrischer Fokussierung in der ersten Dimension und der SDS-PAGE in der zweiten Dimension werden Proteine mit einem pH-Wert von 4-7 aufgelöst. Allerdings werden basische Proteine in einem IEF/SDS-System, in dem Trägerampholyte verwendet wurden, nicht gut getrennt, da sie im Allgemeinen nur schlecht in das IEF-Gel einwandern [49]. Auch wenn mehr basische Ampholyte eingesetzt werden, ist die Ausdehnung des pH-Gradienten im basischen Bereich nur gering, weil auf Grund der Kathodendrift der tatsächliche Gradient pH 7,5 nicht wesentlich übersteigt. Durch die Anwendung der non equilibrium pH gradient electrophoresis (NEPHGE), wie von O'Farrell beschrieben, kann dieses Problem in der ersten Dimension umgangen werden [50]. Der Unterschied zur IEF besteht darin, dass die Proben bei der NEPHGE auf der sauren Seite des Gels aufgetragen werden. Des Weiteren wird im Gegensatz zur IEF die Fokussierungszeit verringert, so dass der pH-Gradient nicht vollständig erreicht wird. Dadurch werden die Proteine zwar nicht vollkommen an ihrem isoelektrischen Punkt fokussiert, dennoch werden sie entsprechend ihrer Landungsunterschiede getrennt.

2.2.2.6 Doppelte SDS-PAGE (dSDS-PAGE)

Die 2D-PAGE (IEF/SDS-PAGE) stellt in der Proteinbiochemie die Standardmethode zur hochauflösenden Trennung von Proteinen dar. Hierbei kann die Probenvorbereitung in Harnstoff-Puffern bei einigen Proteinen Probleme bereiten: so sind einige Spezies der chaotropen Solubilisierung unter diesen Bedingungen nicht bzw. nur schwer zugänglich. In diesem Fall lassen sich Proben alternativ in der doppelten SDS-PAGE (dSDS-PAGE) auftrennen [51]. Zwei einander nachgeschaltete Gele verschiedener Vernetzungsgrade nach Lämmli oder Schägger und von Jagow dienen als erste- bzw. zweite Dimension. Im Gegensatz zur 2D-PAGE, bei der die Proteine nach isoelektrischem Punkt und anschließend nach Molekulargewicht getrennt werden, macht man sich in der dSDS-PAGE die Hydrophobizität der unterschiedlichen Spezies zu Nutze. Hydrophobe Proteine binden verhältnismäßig größere Mengen an Natriumdodecylsulfat (SDS) und erfahren eine entsprechend höhere negative Ladung. In Gelen mit niedrigerem Acrylamidgehalt führt dies zu einer relativen Mobilitätssteigerung. Bei größerem Vernetzungsgrad überwiegt hingegen der Molsiebeeffer und die Proteine werden entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Dient bei der dSDS-PAGE ein hochvernetztes Gel als erste und ein niedrigvernetztes Gel als zweite Dimension, so bilden hydrophobe Proteine Spots, welche über einer sich bildenden Protein-Diagonalen lokalisiert sind.

2.2.2.7 Coomassiefärbung von Polyacrylamid-Gelen

Nach der Elektrophorese werden die im Gel getrennten Proteine mit Hilfe des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blue G-250 sichtbar gemacht. Bei dieser Färbemethode liegt das gleiche Prinzip zu Grunde wie bei der Proteinbestimmung nach Bradford. Die Proteine werden vor und während des Färbens (30 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,2 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue G-250) denaturiert und ausgefällt, und werden somit im Gel fixiert. Zum Fixieren werden Ethanol/Essigsäure/Wassermischungen verwendet (30 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure). Überall dort, wo Proteine im Gel vorhanden sind, entstehen blaue, definierte Banden, die je nach Proteinkonzentration unterschiedlich stark eingefärbt sind. Mit dieser

Methode lassen sich noch bis zu 100 ng Protein in einer Bande, bzw. ca. 50 ng pro Spot einer 2D-PAGE, nachweisen [52].

2.2.2.8 Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen

Die Visualisierung der Proteine erfolgte bei der Silberfärbung nach einer modifizierten Methode nach Blum *et al.* [53]. Die Färbung beruht auf der Bildung von Komplexen aus Silberionen mit Glutamin-, Asparagin- und Cysteinseitenketten von Polypeptiden. In Gegenwart von alkalischem Formaldehyd werden die Silberionen zu elementarem Silber reduziert. Im Gel entstehen je nach Proteinmenge hell- bis dunkelbraune Spots. Das Formaldehyd vernetzt allerdings die Proteine im Gel über Methylenbrücken und verhindert die Elution der beim In-Gel-Verdau entstehenden Peptide, so dass eine eingeschränkte massenspektrometrische Identifizierung möglich ist. Aus diesem Grund wurde abweichend vom Originalprotokoll weniger Formaldehyd eingesetzt. Im Vergleich zur Coomassiefärbung ist die Silberfärbung weitaus sensitiver, so dass noch bis zu 10 ng Protein pro Bande oder 1 ng pro Spot einer 2D-PAGE nachgewiesen werden können. In Tabelle 4 sind die für die Silberfärbung verwendeten Lösungen wiedergegeben.

Fixierlösung	30 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure)
Reduktionslösung	0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat
Färbelösung	0,2 % (w/v) Silbernitrat
Entwicklerlösung	3 % (w/v) Natriumcarbonat, 0,05 % (v/v) Formaldehyd, 0,0004 % (w/v) Natriumthiosulfat

Tab. 4 Zusammensetzung für die Silberfärbung verwendete Lösungen

2.2.2.9 Western Blot

Als Western Blot wird der Transfer von Proteinen aus Gelen einer SDS-PAGE oder 2D-PAGE im elektrischen Feld auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid) bezeichnet [54]. Der Transfer erfolgt senkrecht zum Gel, wobei die Proteine Richtung Anode wandern und auf Grund von hydrophoben Wechselwirkungen auf der Oberfläche der Membran gebunden werden. Das Gel und die Membran werden zwischen zwei mit Puffer getränkten Filterpapieren gelegt, so dass eine Art Sandwich entsteht. Diese spezielle Methode wird auch als Semi-Dry Blotting bezeichnet [55]. Die Proteine sind auf diese Weise immunochemisch detektierbar, sind massenspektrometrisch zugänglich und können eingefärbt oder sequenziert werden. Verwendet wurde eine Apparatur der Firma Biorad (München, Deutschland).



Abb. 2 Anordnung der einzelnen Komponenten beim Semi-Dry Blotting

Das Filterpapier sowie die Membran wurden für ca. 20 min in Blotpuffer inkubiert (50 mmol/L Tris, 200 mmol/L Glycin und 20 % (V/V) Methanol). Nach dem Blotten wurde die Membran in

PBS-Puffer, Phosphat gepufferte Salzlösung, (20 mmol/L Natriumphosphat, 150 mmol/L NaCl, pH 7,4) gewaschen und in 10 % (w/v) Trockenmilch in PBS-Puffer über Nacht inkubiert, um die Membran zu maskieren, damit der primäre Antikörper nicht an ihr bindet.

2.2.2.10 Immunochemische Detektion

Bei diesem Verfahren werden die durch Blotten auf eine Nitrocellulosemembran übertragenen Proteine mit einem spezifischen primären Antikörper inkubiert. Ein zweiter Antikörper wirkt gegen den primären Antikörper. Dieser sekundäre Antikörper ist ein speziesspezifischer Antikörper, der zur Detektierung mit einem Fluorophor oder mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Die Detektion erfolge mit dem Odyssey Infrared Imaging System der Firma LI-COR (Lincoln, USA). Durch einen Laser wird der Fluorophor angeregt. Nach dem Verweilen im angeregten Zustand kann die Anregungsenergie sowohl als Fluoreszenz als auch in einem nicht strahlenden Prozess (z.B. Schwingungsrelaxation) abgegeben werden, woraufhin anschließend der Fluorophor in seinen Grundzustand zurückkehrt.

2.2.2.11 Autoradiographie

Auf eine „Imaging-Plate“ (IP) wird ein SDS-Gel, mit einer zuvor ^{75}Se markierten Probe, gelegt. Diese flexible Platte ist ca. 0,3-0,5 mm dick und besteht aus einer Grundschicht aus Polyester, einer Phosphor- und einer Schutzschicht. Der Hauptteil der IP ist die Phosphorschicht, die aus photo-stimulierbarem Phosphor besteht. Wenn man die IP radioaktiver oder Röntgenstrahlung aussetzt, so wird die Energie dieser Strahlung in der Phosphorschicht gespeichert. Erst durch die Bestrahlung mit Licht wird die gespeicherte Energie in Form von Licht emittiert. Dieses Phänomen wird auch als „photo-stimulated luminescence“ bezeichnet [56]. Eine bessere Image-Qualität sowie eine höhere Sensitivität bietet die Variante der Computerradiographie (CR). Bei dieser Variante werden anstelle des Phosphors sehr kleine Kristalle aus Bariumfluorobromid, welche mit Europium dotiert sind verwendet (BaFBr:Eu^{2+}) [57]. Das Auslesen der IP erfolgt mit einem He-Ne-Laser. Dieses Material emittiert Licht mit einer maximalen Intensität bei einer Wellenlänge von 390nm. Verwendet wurde ein Phospho-Imager Bas1000 der Firma Fuji. Das Löschen dieser IP erfolgt durch Bestrahlung mit Licht.

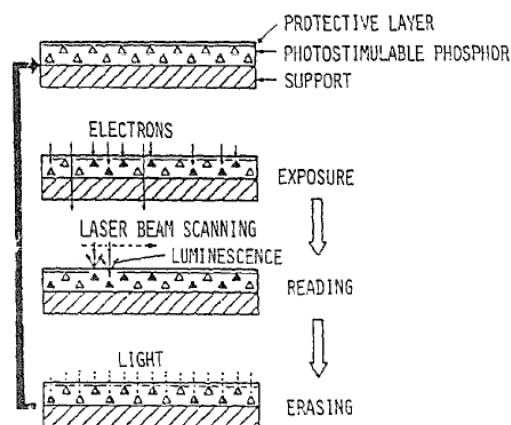


Abb. 2 Schematisches Diagramm für den Prozess der Aufnahme, des Auslesens und Löschen eines Image auf einer IP

2.2.2.12 Zellvitalitätstest

Die Reduktion von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) ist eine der meist verwendete Methoden für die Bestimmung des Zellwachstums. Diese Reduktion, so wird angenommen, findet nur in aktiven Mitochondrien lebender Zellen statt [58]. Die Höhe des Umsatzes von MTT zu schwer löslichem violetterem Formazan ist als Indikator für die Zellvitalität zu erachten. Ungefähr 1000 Zellen wurden jeweils mit 90 µl Zellkulturmedium in eine der 96 Kammern (Well Plate) für den Zellvitalitätstest aufgetragen. 10 µl einer 5 mg/ml MTT-Lösung wurden hinzu gegeben und die Zellen damit für 4 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium sehr vorsichtig entfernt, so dass möglichst keine Zellen mit entfernt wurden. In 100 µl HCl-saurem Isopropanol wurden die Zellen aufgelöst und die Absorption bei 570 nm mittels Photometer Opsys MR der Firma DYNEX Technologies (Berlin, Deutschland) bestimmt.

2.2.2.13 MALDI-MS

Die matrix-assisted laser desorption ionization – mass spectrometry (MALDI) ist eine gut geeignete Methode für die Analyse von Makromolekülen. Sie erweist sich seit ihrer Entwicklung in den 1980er Jahren als besonders effektiv für die Massenspektrometrie von Proteinen [59]. Die zu untersuchenden Proteine wurden aus dem Gel ausgestochen und mit 100 mM DTT reduziert. Die Dehydratisierung erfolgte mit 50 % sowie 80 % Acetonitril (v/v). Der tryptische Verdau geschah im Gel mit 50ng Trypsin in einem Puffer aus 25 nM Ammoniumbicarbonat (pH 8) bei 37°C. Die Peptidextraktion erfolgte dann mit 0,2 % Trifluoressigsäure (v/v), 20 % sowie 50 % Acetonitril (v/v). Nach Lyophilisierung wurde die Mischung in 0,2 % Trifluoressigsäure aufgenommen, entsalzt und zusammen mit α -Cyano-4-hydroxymethylsäure auf einen Target Chip gegeben und dort getrocknet. Die Peptide wurden zusammen mit der Matrix aus Methanol auskristallisiert. Die Matrix wurde so gewählt, dass sie die Energie des Lasers stark absorbiert. Mit kurzen, hochenergetischen Laserpulsen erfolgt bei diesem Verfahren die Anregung, die nach Relaxation im Kristallgitter zu explosionsartigen Teilchenablösungen an der Oberfläche des Kristalls führt. Gemeinsam mit der Matrix werden dabei die eingeschlossenen Analytmoleküle mit in das Vakuum des Massenspektrometers überführt und so der massenspektrometrischen Analyse zugänglich. Durch den tryptischen Verdau und das daraus resultierenden Spaltungsmuster können die Proteine mit Hilfe des tryptischen Fingerprints und einer Peptidatendbank identifiziert werden. Die Analysen wurden von der Firma Wita (Teltow, Deutschland) ausgeführt. Dort wurde ein Bruker Reflex III MALDI Massenspektrometer verwendet.

2.2.2.14 LC/ESI-MS/MS

Elektrosprayionisation (ESI) ist eine Technik zur Erzeugung von Ionen, die in der Massenspektrometrie (LC/MS) verwendet wird. Als Elektrospray wird ein Verfahren zur Zerstäubung von Flüssigkeiten mit Hilfe eines elektrischen Feldes bezeichnet. Das resultierende Spray enthält feine, geladene Tropfen mit einer schmalen Größenverteilung. Die Erzeugung der Ionen findet unter Atmosphärendruck statt und ist ein bevorzugtes Ionisationsverfahren zur Analyse von Biomolekülen bzw. zur Sequenzierung von Proteinen, da es sehr schonend für das Analytmolekül ist und kaum zu Fragmentationen führt. Die Analytlösung wird durch eine Metallkapillare geleitet, an deren Spitze eine Spannung angelegt ist. Durch die Spannung kommt

es zur Bildung eines elektrischen Feldes zwischen der Kapillare und einer Gegenelektrode. Das elektrische Feld durchdringt die Analytlösung und in ihr befindliche Ionen bewegen sich elektrophoretisch auf die Gegenelektrode zu. Dabei bildet sich an der Spitze der Kapillare ein Überschuss gleichartig geladener Ionen, die sich gegenseitig abstoßen und als feines Aerosol aus der Kapillare austreten. Die Art der Spannung, die an der Kapillare angelegt wird, bestimmt die Ladung der Ionen, die erzeugt werden. Des Weiteren werden bei dieser Ionisationsmethode häufig mehrfach geladene Molekülonen erzeugt, die zum Einen die Messung sehr großer Moleküle, wie z.B. ganzer Proteine, zum Anderen die Durchführung von MS/MS-Messungen, z.B. für die Sequenzierung von Peptiden, ermöglicht. Die Kopplung an ein LC-System (liquid chromatography), meistens RP-HPLC (reversed phase), gestattet die Analyse komplexerer Proben, da durch die LC eine Auftrennung der Analyten erfolgt [60]. Die von der Kapillarsäule eluierten Peptide können durch das Massenspektrometer für die CID-Analyse (collision-induced-dissociation) ausgewählt und deren Aminosäuresequenz abgeleitet werden.

Die zu untersuchenden Proteine wurden aus dem Gel ausgestochen und mit 10 mM DTT reduziert. Reduzierte Cysteine ließen sich durch Behandlung mit Iodacetamid alkylieren. Der In-Gel-Verdau geschah Trypsin in einem Ammoniumbicarbonat-Puffer (pH 8) bei 37°C. Die Peptidextraktion erfolgte mit Trifluoressigsäure sowie Acetonitril. Die extrahierten Proteine wurden mittels PepClean™ C-18 Spin Columns laut Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

2.2.3 Analytische Methoden

2.2.3.1 Instrumentelle Neutronen Aktivierungsanalyse (INAA)

Die INAA ist eine zerstörungsfreie Multielementanalysemethode. Im Gegensatz dazu ist bei optischen Elementanalysen wie der Atom-Absorptions-Spektrometrie und der Plasma-Emissions-Spektrometrie die Zerstörung der chemischen Verbindung, in der der Analyt vorliegt, erforderlich. Bei der Probenvorbereitung wird die zu untersuchende Probe getrocknet, homogenisiert und in hochreine Quarzampullen überführt. Nach Lyophilisierung und Wägung wird die Ampulle zugeschmolzen. Die Bestrahlung der Probe mit Neutronen erfolgt in einer kernnahen Position (DBVR) oder direkt im Kern (DBVK) des Kernreaktors BER II des Helmholtz Zentrum Berlin für eine bestimmte Zeit. Bei der DBVR (Drehbare-Bestrahlungs-Vorrichtung-am-Reflektor) werden Neutronenflussdichten von ca. $6,5 \cdot 10^{12} \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ thermischer Neutronen erreicht. Mit der DBVK (Drehbare-Bestrahlungs-Vorrichtung-im-Kern) wird eine Flussdichte thermischer Neutronen von $1,2 \cdot 10^{14} \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ erzielt. Entsprechend ihres Wirkungsquerschnittes fangen die Atome unterschiedlicher Elemente der Probe Neutronen ein. Die so erzeugten instabilen Kerne können unter Emission von γ -Quanten mit nuklidspezifischen Energien zerfallen, welche qualitativ auf die Elementzusammensetzung der Probe schließen lassen. Vor der Detektion des Gammaspektrums mittels eines hochreinen Germanium-Detektors werden die Ampullen von möglichen Verunreinigungen an der Außenwand mit Flußsäure, Ethanol, Aceton und bidestilliertem Wasser gewaschen. Um eine quantitative Aussage über die Elementgehalte treffen zu können, werden mit den Proben zeitgleich Elementstandards bekannter Konzentration (Mullelementstandard, Merck, Darmstadt, Germany) mitbestrahlt, und die Elementkonzentration durch den Vergleich der Zählraten ermittelt [61].

Die Aktivität eines neu gebildeten Isotops durch den Neutroneneinfang kann mittels der Aktivierungsgleichung berechnet werden:

$$A = n \cdot N_A \cdot \Phi \cdot \sigma \cdot f \cdot (1 - e^{-\lambda t_A}) \cdot e^{-\lambda t_E}$$

A = Aktivität [Bq]

n = Menge des Ausgangsisotops [mol]

N_A = Avogadrokonstante

Φ = Neutronenflussdichte [$\text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$]

σ = Wirkungsquerschnitt des Ausgangsisotops [cm^2]

f = Isotopenhäufigkeit

λ = Zerfallskonstante des entstandenen Isotops [s^{-1}]

t_A = Bestrahlungszeit [s]

t_E = Wartezeit nach der Bestrahlung [s]

Durch die gleichzeitige Verwendung von Referenzmaterial wie z.B. Bovine Liver (NIST, Gaithersburg, USA) lassen sich die Ergebnisse der Bestrahlung (Analyse) evaluieren.

Für die Konzentrationsbestimmung von Mangan wurde die die Bestrahlungsposition in der DBVR gewählt, während für die Bestimmung der Elemente Kobalt, Chrom, Cäsium, Eisen, Rubidium, Selen und Zink die DBVK bevorzugt wurde. In der Tabelle 5 sind einige Eigenschaften der Radionuklide wieder gegeben, die bei der Bestimmung der Gehalte mittels INAA zum Einsatz kamen.

Radionuklid	Halbwertszeit	γ -Energie [keV]
⁵⁶ Mn	2,58 h	847; 1811
⁶⁰ Co	5,27 a	1173; 1332
⁵¹ Cr	27,70 d	320
¹³⁴ Cs	2,06 a	796
⁵⁹ Fe	44,50 d	1099; 1292
⁸⁶ Rb	18,70 d	1077
⁷⁵ Se	120,64 d	136; 265
⁶⁵ Zn	244,30 d	1115

Tab. 5 Halbwertszeiten und zur Auswertung verwendete Energien der γ -Quanten einiger Radionuklide

2.2.3.2 Induktiv gekoppelte Plasmamassenspektrometrie (ICP-MS)

Die ICP-Massenspektrometrie ist eine sehr nachweisstarke Multielementmethode. Prinzipiell besteht ein ICP-Massenspektrometer aus fünf Komponenten, dem Probenzuführungssystem, der Anregungseinheit (Plasmafackel), dem Massenseparator, dem Detektor und der Datenverarbeitung. Der Probeneintrag in das Plasma erfolgt als Aerosol. Das Aerosol wurde in dieser Arbeit durch pneumatische Zerstäubung mittels eines konzentrischen Meinhard-Zerstäubers bzw. cross-flow-Zerstäubers erzeugt. Der Nachteil dieser Zerstäuber liegt in ihrer geringen Aerosolausbeute [62,63]. Um ein homogenes Aerosol in das Plasma zu überführen wurde dieses in einer temperierten Zerstäuberkammer (Scott-Kammer) von größeren Tröpfchen getrennt. Gelangt die Probe in das Plasma, so wird sie dort getrocknet, atomisiert und

überwiegend einfach positiv ionisiert [64]. Die Ionisation findet im heißesten Teil des Plasmas bei Normaldruck statt. Dort herrschen Temperaturen von bis zu 10000 K sowie eine hohe Ar^+ -Ionen- und Elektronendichte ($3 \cdot 10^{15} \text{ cm}^{-3}$). Das Plasma wird durch einen elektrischen Funken in einem hochfrequenten, elektromagnetischen Feld mit 500-2000 W Leistung erzeugt. Als Plasmagas wurde Argon verwendet. Die Plasmafackel besteht aus drei konzentrischen Röhren, durch die das Argongas strömt. Der äußere Argonstrom dient dazu, das Glas der Fackel zu kühlen. Das Argon im mittleren Rohr ist das eigentliche Plasmagas. Durch die innere Röhre gelangt das Gas, das vom Zerstäuber kommt, welches das Aerosol transportiert in die Plasmafackel. Bevor die erzeugten Ionen den Detektor erreichen, müssen sie ein Einlasssystem (Interface) passieren, da der Detektor sich in einem Hochvakuum befindet und die Ionen bei Normaldruck gebildet werden. Das Interface wirkt als 2-stufige Druckreduktionseinheit und besteht aus zwei kegelförmigen Lochblenden (Sampler und Skimmer). Hinter der ersten Lochblende (Sampler) wird ein Vorvakuum mit einem Druck von $2 \cdot 10^{-3}$ bar erzeugt (Extraktionsstufe). Das Analysenvakuum befindet sich nach dem Skimmer bei einem Druck von $8 \cdot 10^{-9}$ bar. In der Ionenoptik werden die aus dem Interface austretenden Ionen mit Hilfe elektrostatischer Linsen gebündelt. Die Optimierung der Flugbahn innerhalb der Ionenoptik kann nur für ein Isotop (Masse zu Ladungsverhältnis) erfolgen, während für alle anderen Ionen nur unter Kompromissbedingungen eine Flugbahn eingestellt werden kann. Dieser Effekt wird als Massendiskriminierung bezeichnet und hat zur Folge, dass trotz gleicher Konzentration für unterschiedliche Massen unterschiedliche Intensitäten erhalten werden. Nach dem Passieren der Ionenoptik werden die Ionen im Massenfilter (Quadrupol-Typ) nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/Z) getrennt und im Detektor registriert. Der Massenfilter besteht aus vier gleich langen, parallel ausgerichteten Stäben. An jeweils gegenüber liegende Stäbe wird jeweils gleich entweder ein positives oder negatives DC Potenzial angelegt. Dieses Gleichspannungsfeld überlagert ein oszillierendes Feld im Radiofrequenzbereich. Die Ionen gelangen in dieses Feld und beginnen planar um die Achse des Quadrupols zu oszillieren. Durch Variation der Felder kann ein bestimmter Bereich gescannt werden. Ionen und Moleküle mit dem gleichen m/Z -Verhältnis können nicht unterschieden werden. Deshalb kommt es in Quadrupol-Spektrometern häufig zu Isobaren- und Molekülinterferenzen (spektrale Interferenzen).

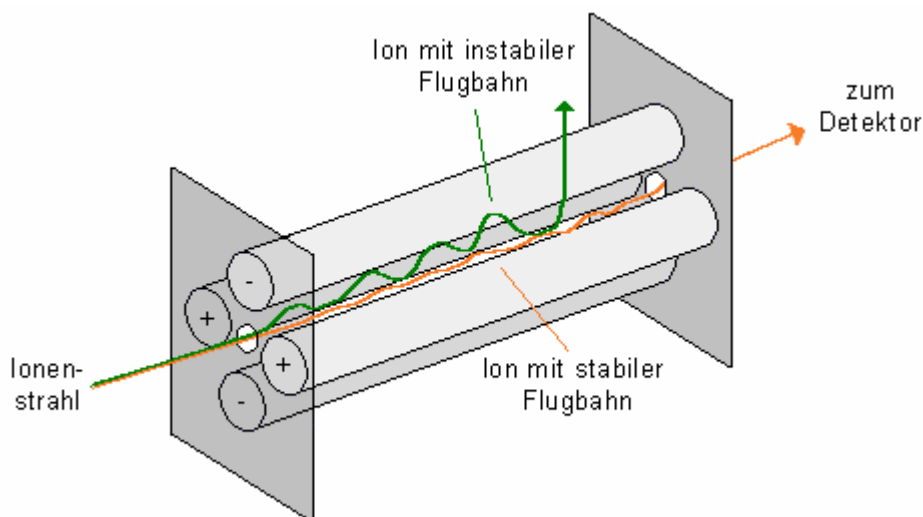


Abb. 3 Darstellung eines Quadrupols

Nicht spektrale Interferenzen haben ihre Ursache in Veränderungen in der Probenzufuhr, den Ionisierungsbedingungen, Verstopfungserscheinungen im Interface oder Verschmutzungen in der Ionenoptik [65]. Diese Effekte können durch die Verwendung interner Standards zum Teil kompensiert werden [66]. Für die Konzentrationsbestimmungen wurde eine Elan 6000

quadrupol-ICP-MS der Firma Perkin Elmer SCIEX (Rodgau-Jügesheim, Deutschland) verwendet. In Tabelle 6 sind die bei den untersuchten Proben möglicherweise auftretenden Interferenzen aufgeführt.

Element	m/Z	Häufigkeit [%]	Interferenz
⁴⁹ Ti	48,94787	5,50	⁹⁸ Mo ⁺⁺ , ³³ S ¹⁶ O, ³¹ P ¹⁶ O
⁵¹ V	50,94396	99,75	¹⁵ Cl ¹⁶ O, ¹¹ B ⁴⁰ Ar, ¹² C ³⁹ K, ¹⁴ N ³⁵ Cl
⁵² Cr	51,94051	83,79	¹² C ⁴⁰ Ar, ¹⁶ O ³⁶ Ar, ¹² C ⁴⁰ Ca
⁵⁵ Mn	54,93805	100,00	¹¹⁰ Cd ⁺⁺ , ¹⁶ C ³⁹ K, ¹⁵ C ⁴⁰ Ar
⁵⁷ Fe	56,93540	2,20	¹¹⁴ Sn ⁺⁺ , ¹¹⁴ Cd ⁺⁺ , ¹⁶ O ⁴¹ K, ¹⁶ O ¹ H ⁴⁰ Ar
⁵⁹ Co	58,93320	100,00	¹¹⁸ Sn ⁺⁺ , ⁴³ Ca ¹⁶ O, ²³ Na ³⁶ Ar, ¹⁸ O ¹ H ⁴⁰ Ar
⁶⁰ Ni	59,93079	26,10	¹⁶ O ⁴⁴ Ca, ¹²⁰ Sn ⁺⁺ , ²⁴ Mg ³⁶ Ar, ²⁰ Ne ⁴⁰ Ar
⁶⁴ Zn	63,92915	48,60	⁶⁴ Ni, ¹⁶ O ⁴⁸ Ti, ²⁴ Mg ⁴⁰ Ar, ⁴⁸ Ca ¹⁶ O, ²⁸ Si ³⁶ Ar
⁶⁵ Cu	64,92779	30,83	¹⁶ O ⁴⁹ Ti, ²⁵ Mg ⁴⁰ Ar, ¹³⁰ Ba ⁺⁺
⁷⁵ As	74,92160	100,00	⁵⁹ Co ¹⁶ O, ³⁵ Cl ⁴⁰ Ar, ³⁹ K ³⁶ Ar
⁸² Se	81,91671	9,20	⁸² Kr, ¹⁶ O ⁶⁶ Zn, ⁴² Ca ⁴⁰ Ar
⁸⁵ Rb	84,91180	72,17	⁴⁵ Sc ⁴⁰ Ar, ⁶⁹ Ga ¹⁶ O
⁹⁸ Mo	97,90541	24,13	⁹⁸ Ru, ⁵⁸ Fe ⁴⁰ Ar, ⁵⁸ Ni ⁴⁰ Ar, ⁸² Kr ¹⁶ O, ⁸² Se ¹⁶ O
¹¹² Cd	111,90276	24,13	⁹⁶ Mo ¹⁶ O, ⁷² Ge ⁴⁰ Ar, ¹¹² Sn
¹³³ Cs	132,90543	100,00	¹¹⁷ Sn ¹⁶ O, ⁹⁵ Mo ³⁸ Ar, ⁹⁷ Mo ³⁶ Ar
²⁰⁸ Pb	207,97664	52,40	¹⁹² Pt ¹⁶ O, ¹⁹² Os ¹⁶ O

Tab. 6 Wichtige Interferenzen der zu bestimmenden Elemente

Die bei den Messungen verwendeten Geräteparameter sind in Tabelle 7 wiedergegeben.

System	ELAN 6000 (Perkin Elmer)
Zerstäuber	Mikrokonzentrischer PFA-Zerstäuber Gas-flow: 0,88 l·min ⁻¹ Ar
Autosampler	AS-90
Sprühkammer	Scott-Sprühkammer (quartz)
Interner Standard	Ir, Y, Ge, Rh (10 µg/l)
Sweeps/reeding	10
Readings/replicate	1
Replicates	5
Mode	Peak hopping

Tab. 7: ICP-MS, Systemparameter

2.2.3.3 Graphitrohr-Atom-Absorptionsspektrometrie (GF-AAS)

Zu den optischen Elementanalysen gehört die Atom-Absorptionsspektrometrie (AAS). Grundlage der AAS ist die Fähigkeit von Atomen, im Grundzustand elektromagnetische Strahlung ganz bestimmter Wellenlänge zu absorbieren und dadurch in einen angeregten Zustand überzugehen. Der von mir verwendete AAnalyst 600 der Firma Perkin Elmer (Rodgau-Jügesheim, Deutschland) besitzt als Atomisierungseinrichtung ein mit pyrolytischem Graphit beschichtetes, querbeheiztes Graphitrohr mit Zeeman-Untergrundkorrektur. Als Strahlungsquellen dienen Hohlkathoden- (HKL) und elektrodenlose Entladungslampen (EDL). Sie enthalten die Elemente, die in der Probe bestimmt werden sollen. Kirchhoff formulierte den

Zusammenhang zwischen Emission und Absorption in einem allgemein gültigen Gesetz: Jeder Stoff kann die Strahlung der Wellenlänge absorbieren, die er selbst aussendet [67]. Für die Überführung des Analyten in den atomaren Zustand wird die zu untersuchende Probe mittels Mikropipette in das Graphitrohr geleitet. Durch elektrische Widerstandsheizung lassen sich die Graphitrohre auf Temperaturen von 20-3000°C aufheizen. Dabei wird in der Regel ein Temperaturprogramm durchlaufen, welches im ersten Schritt die Trocknung der Probe beinhaltet (130°C). Im zweiten Schritt wird die Probe pyrolysiert, um organische Komponenten oder leicht flüchtige Elemente zu entfernen (ca. 400-1500°C), die während des dritten und eigentlichen Atomisierungsschritts (2000-2500°C) zu erhöhten nicht spezifischen spektralen Interferenzen, der Untergrundabsorption, führen. Der Ausheizschritt dient der Entfernung schwerflüchtiger Begleitsubstanzen. Die Matrixabtrennung ist einer der Gründe, weshalb die Graphitrohr-AAS um bis zu 1000-fach empfindlicher gegenüber der Flammen-AAS ist. Die Verwendung von Modifiern, im Fall von Selen und weiteren 20 Elementen $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ - $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, führt in den meisten Fällen zu einer höheren thermischen Stabilität des Analyten, so dass die Pyrolysetemperatur erhöht werden kann und dadurch zu einer besseren Matrixabtrennung ohne Analytverlust führt [68]. Im Idealfall wird die thermische Stabilität der Matrix gleichzeitig erniedrigt. Ein Inertgas (Argon) ist für die GF-AAS unerlässlich, da es zum einen das Rohr von außen als Schutzgas vor verstärktem Abbrand bei hohen Temperaturen bewahrt, und zum anderen das Innere des Rohres durchspült und die während der Trocknung oder Pyrolyse entstehenden gasförmigen Nebenprodukte entfernt. Außerdem zeigen viele Analytatomene eine hohe Affinität gegenüber Sauerstoff und würden mit dem Sauerstoff Oxide bilden. Im Atomisierungsschritt wird der Gasfluss gestoppt, um nicht die sich bildende Atomwolke herauszuspülen. Eine Möglichkeit, die Untergrundabsorption zu kompensieren, bietet der Zeeman-Effekt erreicht werden. Die Energieniveaus von Atomen in einem Magnetfeld werden in π - und σ -Komponenten aufgespalten. Im „normalen“ Zeeman-Effekt hat die π -Komponente dieselbe Wellenlänge wie die ursprüngliche Absorptionslinie und ist linear polarisiert. Die σ -Komponenten hingegen sind im Vergleich zur π -Komponente symmetrisch um den gleichen Betrag zu niedrigeren und höheren Wellenlänge verschoben. Sie sind zirkular und senkrecht zum Magnetfeld polarisiert [69].

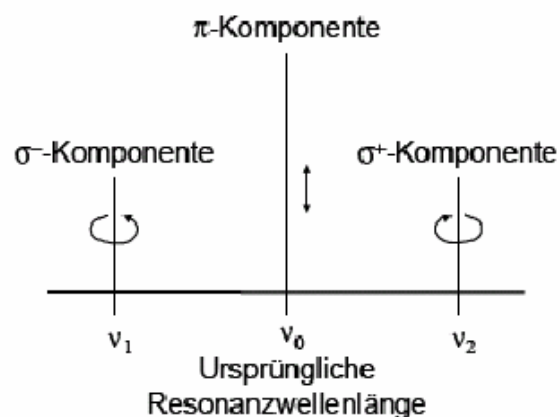


Abb. 4 Aufspaltung der Spektrallinie bei „normalem“ Zeeman-Effekt

Der „anomale“ Zeeman-Effekt ist weitaus häufiger als der „normale“. Der „anormale“ wird noch unterschieden nach der Zahl von π -Komponenten: Bei ungerader Anzahl bleibt die ursprüngliche Wellenlänge in einer Komponente erhalten, bei gerader Anzahl von π -Komponenten verschwindet die ursprüngliche Wellenlänge aus dem Spektrum. Die Signalkorrektur resultiert aus der Detektion der Gesamtabsorption, von der die

Untergrundabsorption subtrahiert wird. Die Schwächung des eingestrahnten Lichts hängt von der Konzentration des Analyten ab und folgt, für monochromatische Strahlung und großen Verdünnungen, dem Lambert-Beer'schen Gesetz.

$$E = \log \frac{I_0}{I_t} = \epsilon \cdot C \cdot d$$

- E Extinktion
- I_0 Intensität der ungeschwächten Strahlung
- I_t Intensität der transmittierten Strahlung
- C Konzentration des absorbierenden Stoffs [$\mu\text{g/L}$]
- d Länge der Absorptionsstrecke [m]
- ϵ dekadischer Extinktionskoeffizient [$\text{L m}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$]

2.2.3.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Kopplung an die ICP-MS (HPLC-ICP-MS)

Bei der HPLC (high performance liquid chromatography) handelt es sich um ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem die zu untersuchende Substanz über eine Trennsäule geleitet wird. Die in der Säule enthaltene Substanz wird als stationäre und der Eluent als mobile Phase bezeichnet. Für die Trennung von Proteinen in Zytosolen der von mir untersuchten Geweben verwendete ich die Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatography, SEC). Als eine der mit am häufigsten eingesetzten Methoden ist sie eine sehr schonende Variante der Säulenchromatographie für die Trennung von gelösten Makromolekülen. Es treten nur sehr geringe Wechselwirkungen des Probenmaterials mit der stationären Phase oder der mobilen Phase, dem Elutionsmittel, auf. Eine Denaturierung der Tertiär- oder Quartärstruktur von Proteinen sowie ein Verlust von Metallkomplexen werden dadurch minimiert oder treten im Idealfall gar nicht erst auf. Das Säulenmaterial, d.h. die stationäre Phase, besteht aus einem feinkörnigen, porösen Gel (Verbindung aus quervernetzter Agarose und Dextran) mit einer definierten Porengrößenverteilung. Der Trenneffekt beruht dabei auf einem umgekehrten Siebeffekt und die Retentionszeit ist logarithmisch proportional zur Molekülgröße. Große Moleküle, die nicht in die Poren eindringen können und somit nicht permeieren, eluieren im so genannten Ausschlusspeak. Im Gegensatz zu den kleiner werdenden Probenmolekülen werden sie durch das Zwischenkornvolumen gespült. Die kleineren Moleküle können, abhängig von ihrer Größe, in die Poren eindringen. Die Kleinsten von ihnen können letztlich auch in die kleinsten Poren eindringen und werden mit dem Permeationspeak (bzw. Salzpeak) ausgespült. 50mmol Tris(hydroxymethyl-)aminomethan (Tris-Puffer) wurde als Eluens verwendet und ist somit der gleiche Puffer, wie er zur Zytosolgewinnung benutzt wurde. Der pH 7,4 entspricht dem physiologischen pH-Wert und so kann angenommen werden, dass unter diesen Bedingungen am wenigsten Abweichungen vom nativen Zustand der Proteine, besonders im Hinblick auf die Metallbeladung, auftreten. In der Proteinbiochemie ist dieser Puffer ein gebräuchlicher Puffer für den pH-Bereich von 7,3-9,3 [70]. Er sorgt ausschließlich für den Transport der Probenbestandteile durch die Säule. Mit einem geeigneten Satz von Kalibriersubstanzen (Molmassenmarkern) lassen sich SEC-Säulen kalibrieren. Unter der Annahme einer nahezu kugelförmigen Molekülgestalt sowie Wechselwirkungsfreiheit besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem dekadischen Logarithmus der Molekülmasse und der Elutionszeit. Mit dieser Kalibrierung ist es möglich die Molmasse einer unbekannt Komponente abzuschätzen [71,72]. Der Nachteil der SEC ist das begrenzte Auflösungsvermögen, da mehrere Substanzen ähnlicher Molekülgröße oder Molekülform nahezu gleichzeitig und damit nicht aufgetrennt eluieren können. Durch die Kopplung der SEC

an die ICP-MS lassen sich unterschiedliche aber gleichzeitig eluierende Metalloproteine mit verschiedenen Metallen erfassen und in den jeweiligen Elementprofilen betrachten. Verwendet wurde ein HPLC-System HP 1100 der Firma Hewlett Packard/Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland). Es umfasst einen Degaser, eine quartanäre Pumpe, ein termostatisierbares automatisches Probenaufgabesystem (Autosampler) einen UV-Detektor für die gleichzeitige Aufnahme von bis zu vier verschiedenen Wellenlängen. Die Förderung des internen Standards erfolgte über eine weitere Doppelkolbenpumpe, HPLC-Pump 2248, der Firma Pharmacia. Die UV-Detektion geschah auf den Wellenlänge 280nm und 254nm. Bei 280nm liegt das Absorptionsmaximum für Proteine mit aromatischen Aminosäuren (Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin) [73]. Cysteine in der reduzierten Form koordinieren Metallionen über ihre SH-Gruppen [74]. Diese Metall-Thiolat-Bindungen weisen UV-Absorptionen im Bereich von 250nm auf. Aufgrund der starken Eigenabsorptionen des mit HNO₃ eingestellten Tris-Puffers wurde auf die Messung bei 204nm verzichtet, die im Absorptionsbereich (200-220nm) der Peptidbindungen von Proteinen liegt. Die Elementdetektion erfolgte durch eine Agilent 7500C ICP-MS der Firma Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland). Die System-Parameter der HPLC bzw. der ICP-MS sind in Tabelle 8 bzw. 9 wiedergegeben.

System	Agilent HP 1100
Säule	Superdex 75 PC 3,2 x 300 mm Amersham-Pharmacia
Vorsäule	GFC 3000 4x3 mm (Phenomenex security guard)
Eluent	50 mmol l ⁻¹ Tris-HNO ₃ , pH: 7,4
Interner Standard	Ir, Y, Rh (10 µg/l) 50µl·min ⁻¹
Flussrate	100 µl·min ⁻¹ bei 10 bar
Probenvolumen	20 µl
Detektor	UV 254 nm, 280 nm

Tab. 8: HPLC, Systemparameter

System	Agilent 7500c
Zerstäuber	Mikrokonzentrischer PFA-Zerstäuber Carrier-Gas: 0,82 l·min ⁻¹ Ar Make-up-Gas 0,27 l·min ⁻¹ Ar
Sprühkammer	Scott-Sprühkammer (quartz)
RF-Power	1300 W

Tab. 9: ICP-MS, Systemparameter

2.2.3.5 Laserablation mit Kopplung an die ICP-MS (LA-ICP-MS)

Für die Analyse der Dotblots von Homogenaten und subzellulären Fraktionen von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm wurde die Laserablation-Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma eingesetzt. Diesem analytischen Verfahren liegt die Fähigkeit des fokussierten Laserstrahls zugrunde, die Analysenprobe lokal abzutragen. Nach dem laserinduzierten Abtrag im Strom eines inerten Gases (Ar, He) entsteht eine Plasmawolke, die durch die Abkühlung in ein Aerosol überführt wird. Weiter wird das erzeugte Aerosol in die Fackel des induktiv gekoppelten Plasmas mit dem Strom des Trägergases geleitet, wo die

Aerosolpartikeln atomisiert und ionisiert werden. Die im Plasma erzeugten Ionen werden auf dem Massenspektrometer registriert, dabei entspricht das analytische Signal der Analytkonzentration am Ort der Erzeugung.

Das für die Analyse verwendete Laserablationssystem LSX-213 (Cetac, Omaha, NB, USA) stellt ein Festkörperlaser vom Nd:YAG-Typ mit der Güteschaltung (Q-Switching) und Vervielfachung der Strahlungsfrequenz durch die Anwendung von nicht-linearen optischen Medien dar. Als aktives Medium für die Erzeugung kohärenter Strahlung wird ein Stab aus dem mit Nd^{3+} dotierten Yttrium-Aluminium-Granat $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{15}$ (YAG) verwendet. Die Anregung der Elektronen im aktiven Medium erfolgt durch optisches Pumpen (mit Wasser umströmte Xe-Blitzlampe). Die am Ausgang des Resonanzraums erzeugte Laser-Strahlung (Ausgangsstrahlung) hat eine Wellenlänge von 1064 nm. Durch zwei optisch aktive Kristalle wird die Frequenz der Strahlung zuerst verdoppelt (532 nm), dann vervierfacht (266 nm) und schließlich durch die Zumischung von Ausgangsstrahlung verfünffacht (213 nm). Kürzere Wellenlängen begünstigen die Analyse von transparenten Objekten durch eine bessere Energiekopplung in der Probe und reduzieren ablationsbezogene Fraktionierungseffekte (Umverteilung von Analyten während der Ablation) durch eine stärkere Gewichtung nicht-thermischer Prozesse (Photoionisierung). Die maximale Pulsenergie von ca. 10 mJ wird durch die Optik auf ca. 4 mJ vermindert. Die Halbwertsbreite der Pulsdauer beträgt in etwa 4 ns. Die Fokussierung des Laserstrahls erfolgt durch eine Objektivlinse in der Nähe der Probenoberfläche. Der Durchmesser des Laserstrahls lässt sich durch eine Apparatur auf 10 μm bis zu 200 μm einstellen. Noch größere Strahldurchmesser lassen sich beim Bedarf durch kontrollierte Entfokussierung erreichen. Die Probe kann zusammen mit der Ablationskammer in X-, Y- und Z-Richtung während der Ablation durch Schrittmotoren mit konstanter Geschwindigkeit bewegt werden.

Die Ablation kann als überwiegend thermischer Verdampfungsprozess angesehen werden, wobei eine stationäre Verdampfungswelle für relativ lange Laserpulse (> ps-Bereich) angenommen wird [75]. Explosionseffekte sind, abhängig von der Pulsenergie, der Pulsdauersowie dem Verhältnis der Wärmeleitfähigkeit und der Aufheizrate des Probenmaterials, zu beobachten [76,77]. Eine explosionsartige Ablation führt zur Bildung großer Partikel, die im ICP-MS-Signal starke Schwankungen verursachen. Die Auswahl des Trägergases hat einen großen Einfluss auf die Partikelgröße; denn es kühlt das durch den Laser induzierte Plasma ab. Eine langsamere Abkühlung des Plasmas führt zu einer verstärkten Bildung größerer Partikel. Als Trägergas wird dementsprechend Helium eingesetzt. Es hat im Vergleich zu Argon eine bessere Wärmeleitfähigkeit. Außerdem kommt es bei Argon zu einer intensiveren Redepositionierung des ablatierten Probenmaterials rund um den Ablationskrater.

Bei der scannenden, räumlich aufgelösten Analyse wird das transiente analytische Signal in Bezug auf die bewegliche Position des Laserstrahls zur Probe betrachtet [78,79]. Dabei überlappen die Ablationsdurchmesser der einzelnen Laserpulse. Die Tiefe der Ablation hängt von der Anzahl der sich überlappenden Pulse ab und führt zu einem stufenförmigen Profil. Neben der Fraktionierung sowie der matrixabhängigen Ablationsrate ist die Signalverbreiterung durch den Transport des laserinduzierten Aerosols die wichtigste Störung [80,81]. Fraktionierung bedeutet dabei die Abweichung der Konzentrationsverhältnisse zwischen den Ionen der Elemente im Plasma der ICP und denen, die sich aus der Zusammensetzung der Probe ergeben. Als Ursache für die Abweichung werden sowohl thermodynamische Gleichgewichte und den daraus resultierenden ungleichmäßigen Abtrag verschiedener Elemente des Probenmaterials während der Ablation, als auch die Elementumverteilung bei der Bildung der Aerosolpartikel unterschiedlicher Größe, diskutiert.

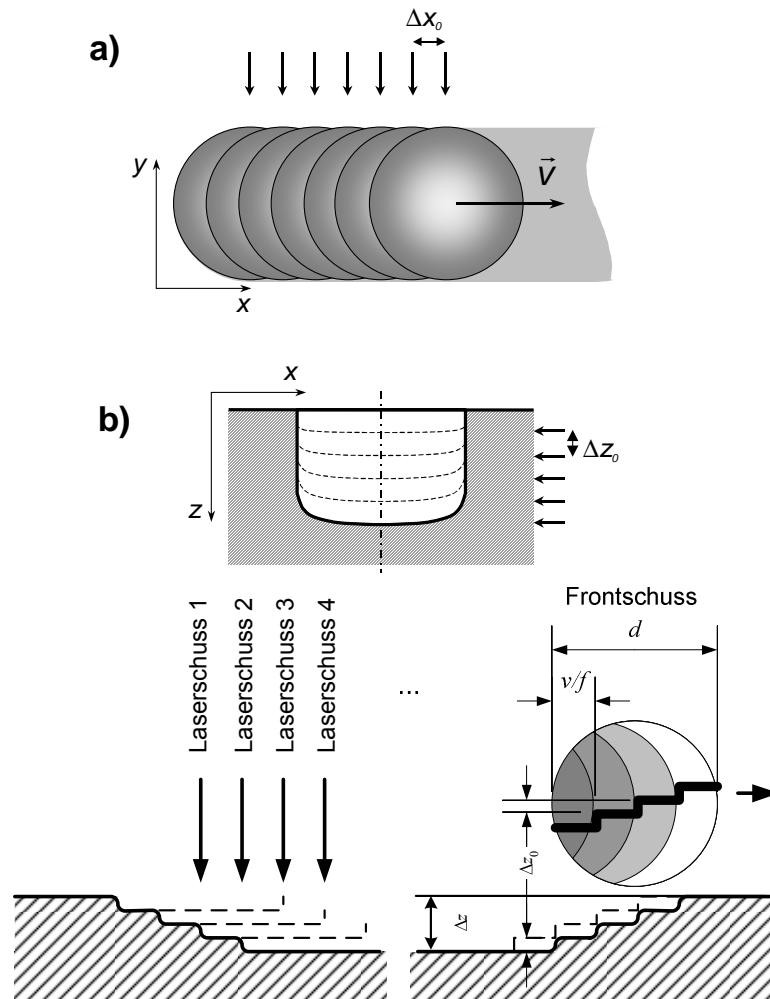


Abb. 5 a) Die Position des Laserstrahls bewegt sich entlang einer Linie auf der Probenoberfläche (laterale Profilanalyse). b) Die Tiefenprofilanalyse zeigt die pro Schuss entstehende Vertiefung des Kraters.

2.2.3.6 Statistische Auswertung

Die ermittelten Daten der analytischen Untersuchungen wurden mittels t-Test (Student's-Test) auf Signifikanz untersucht. Aus dem Vergleich der Prüfgröße mit tabellierten Signifikanzschranken kann die Irrtumswahrscheinlichkeit P bestimmt werden. Die Irrtumswahrscheinlichkeit reflektiert die Einstufung in ein Signifikanzniveau wider. P -Werte von $< 0,05$ werden als schwach signifikant, $P < 0,01$ als signifikant und $P < 0,001$ als hochsignifikant angesehen.

3 Zielsetzung

Die Bedeutung und die Rolle von Spurenelementen in Human- und tierischen Zellen ist seit längerer Zeit ein immer wichtiger werdendes Forschungsobjekt, weil auf molekularer Ebene über die Wirkung von Spurenelementen noch wenig bekannt ist.

Ziel der geplanten Arbeiten ist, durch die Kombination analytischer Methoden (INAA, AAS, ICP-MS, Ultra-Zentrifugation, Chromatographie und Radiotracer-Techniken) mit biochemischen/immunochemischen und molekularbiologischen Verfahren, die Verteilung von Spurenelementen und Spurenelementproteinen in Geweben des Gastrointestinaltraktes der Ratte sowie in Humanzelllinien zu identifizieren, lokalisieren und zu charakterisieren.

Aufgrund bereits bekannter Hinweise bezüglich der Beziehung zwischen Selen und dem Verdauungstrakt sollen auch Untersuchungen durchgeführt werden, um die Verteilung der exprimierten Gewebeproteine in Abhängigkeit vom Selenstatus zu überprüfen.

Mit Hilfe der induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS), der instrumentellen Neutronenaktivierungsanalyse (INAA), der Laserablation induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie und der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) sollen qualitativ und quantitativ die in einigen Gewebe des Verdauungstraktes vorhandenen Spurenelemente bestimmt werden. Durch die Online-Kopplung von HPLC und ICP-MS sollen erste Hinweise über metallhaltige Proteine in den Zytosolen durch Auftrennung der Proteine mittels Größenausschlusschromatographie mit anschließender Analyse der Elemente in den aufgetrennten Fraktionen erhalten werden.

Mittels elektrophoretischer Techniken, wie der SDS-PAGE, der 2D-PAGE (isoelektrische Fokussierung IEF/SDS-PAGE), sollen auch *in vivo* die mit Radiotracer markierten Proteine in den Homogenaten einiger Gewebe aufgetrennt und mit Hilfe der Autoradiographie die markierten Proteinbanden nachgewiesen werden. Mit Hilfe von Antikörpern, gerichtet gegen spezifische Proteine in den Homogenaten und in den verschiedenen Zellfraktionen, sollen durch Immunotests die Seleno- und auch andere Spurenelementproteine detektiert werden. Als Vergleichsgewebe soll das Stoffwechselorgan Leber hinzugenommen werden.

Überdies ist die Verteilung der exprimierten Proteine in einigen Gewebehomogenaten unter Berücksichtigung des Selenstatus zu untersuchen. Als Untersuchungsmethode sollte die 2D-Elektrophorese mit Giga-Gelen eingesetzt werden. Die daraus resultierenden Proteinverteilungsspektren sollen auf Unterschiede in der Proteinexpression mittels speziellen Computerprogrammen und Massenspektrometrie (MALDI-MS) analysiert werden. Im Falle der Identifizierung eines neuen, metallhaltigen Proteins in den Geweben des Gastrointestinaltraktes der Ratte, sollen Humanzelllinien durch Zusatz des entsprechenden Elements *in vitro* untersucht werden.

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung der Spurenelementverteilung

Für die Bestimmung der Spurenelementverteilung bzw. deren Konzentration wurden unter anderem analytische Methoden mit biochemischen Trennverfahren kombiniert. Dabei wurden die subzellulären Kompartimente durch differenzielle Zentrifugation in die Kern-, Mitochondrien-, Mikrosomen- und Zytosolfraktion fraktioniert. Mit Hilfe der INAA wurden die Spurenelementkonzentrationen in Geweben des gastrointestinalen Trakts der Ratte bestimmt. Außerdem wurden die Gehalte der Spurenelemente in den subzellulären Fraktionen ermittelt. Die Verteilung zusätzlicher Spurenelemente in den subzellulären Fraktionen erfolgte durch den Einsatz der LA-ICP-MS, da mit der INAA Elemente wie Kupfer in biologischen Proben häufig nur sehr schwer bestimmbar sind. Der Einsatz der ICP-MS für die Bestimmung der Gesamtgehalte ermöglichte die Erfassung weiterer Spurenelemente in der Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm, Dickdarm und dem Futter sowie der humanen Karzenomdickdarmzelllinie HT29. Die Gehaltsbestimmung mittels GF-AAS erfolgte zur Validierung der Ergebnisse durch die ICP-MS für die genannten Gewebe, da für einige Elemente starke Interferenzen bei der ICP-MS auftreten.

4.1.1 Konzentrationsbestimmung mittels INAA

Die Gesamtgehalte für die Elemente Kobalt, Chrom, Cäsium, Eisen, Mangan, Rubidium, Selen und Zink wurden mit Hilfe der INAA von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm ermittelt, um zu prüfen, ob das Futter mit unterschiedlichen Selenkonzentrationen, das die Versuchstiere bekamen, Einfluss auf die Elementkonzentrationen hat. Eine der beiden Gruppen von Versuchstieren bekamen Futter mit einer Selenkonzentration von 3-7 $\mu\text{g Se/kg}$. Die zweite Gruppe erhielt Futter mit einer Selenkonzentration von ca. 300 $\mu\text{g Se/kg}$. Die Konzentrationsangabe der Ergebnisse wird dabei auf das Trockengewicht der Probe bezogen. Die Gewebe von jeweils drei Tieren mit Selenmangel- (Se-) und Selen-adäquater (Se+) Ernährung sind für die Untersuchung verwendet worden. Abbildungen 6-13 zeigen graphisch die in der Tabelle 10-17 ermittelten Durchschnittswerte.

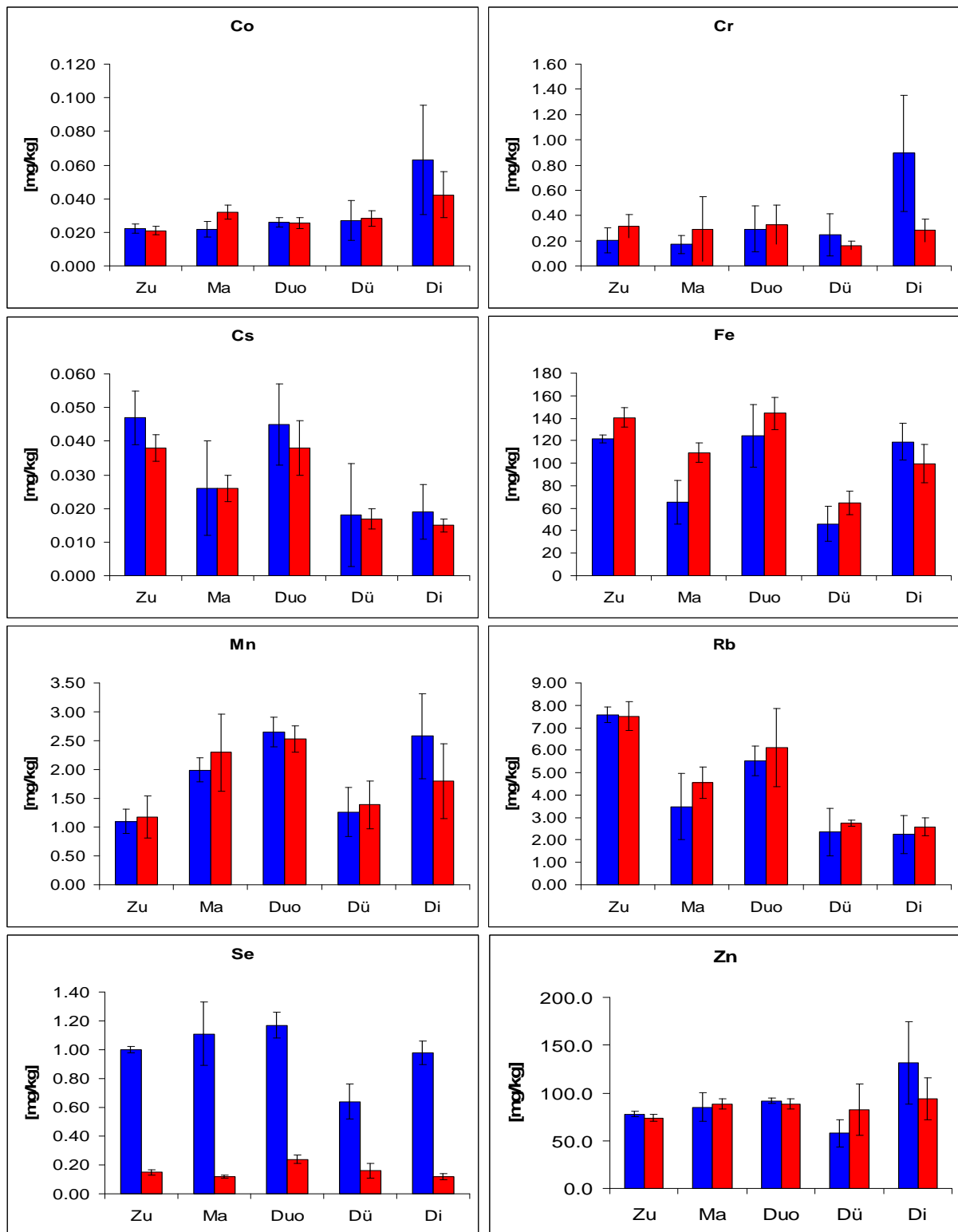


Abb. 6-13 Diagramme der Durchschnittswerte (Anzahl n = 3) der Konzentrationen von Kobalt, Chrom, Cäsium, Eisen, Mangan, Rubidium, Selen und Zink in Zu-Zunge, Ma-Magen, Duo-Duodenum, Dü-Dünndarm, Di-Dickdarm selenadäquat (blau) und selenmangel- (rot) ernährter Tiere.

Co			Cr		
Probe	Elementkonzentration [mg/kg]		Probe	Elementkonzentration [mg/kg]	
	Se+	Se-		Se+	Se-
Zu	0.022 ± 0.003	0.021 ± 0.003	Zu	0.20 ± 0.10	0.32 ± 0.09
Ma	0.022 ± 0.005	0.032 ± 0.004	Ma	0.17 ± 0.07	0.29 ± 0.26
Duo	0.026 ± 0.003	0.025 ± 0.003	Duo	0.29 ± 0.18	0.33 ± 0.15
Dü	0.027 ± 0.012	0.028 ± 0.005	Dü	0.25 ± 0.17	0.16 ± 0.04
Di	0.063 ± 0.032	0.042 ± 0.014	Di	0.89 ± 0.46	0.28 ± 0.09

Cs			Fe		
Probe	Elementkonzentration [mg/kg]		Probe	Elementkonzentration [mg/kg]	
	Se+	Se-		Se+	Se-
Zu	0.047 ± 0.008	0.038 ± 0.004	Zu	122 ± 4	141 ± 9
Ma	0.026 ± 0.014	0.026 ± 0.004	Ma	65 ± 20	109 ± 9
Duo	0.045 ± 0.012	0.038 ± 0.008	Duo	124 ± 28	144 ± 14
Dü	0.018 ± 0.015	0.017 ± 0.003	Dü	46 ± 16	65 ± 11
Di	0.019 ± 0.008	0.015 ± 0.002	Di	119 ± 16	100 ± 17

Mn			Rb		
Probe	Elementkonzentration [mg/kg]		Probe	Elementkonzentration [mg/kg]	
	Se+	Se-		Se+	Se-
Zu	1.10 ± 0.21	1.18 ± 0.37	Zu	7.57 ± 0.34	7.52 ± 0.63
Ma	1.99 ± 0.21	2.29 ± 0.67	Ma	3.48 ± 1.48	4.57 ± 0.69
Duo	2.65 ± 0.26	2.53 ± 0.23	Duo	5.53 ± 0.66	6.12 ± 1.74
Dü	1.26 ± 0.43	1.39 ± 0.41	Dü	2.35 ± 1.06	2.73 ± 0.14
Di	2.58 ± 0.74	1.80 ± 0.65	Di	2.25 ± 0.85	2.58 ± 0.40

Se			Zn		
Probe	Elementkonzentration [mg/kg]		Probe	Elementkonzentration [mg/kg]	
	Se+	Se-		Se+	Se-
Zu	1.00 ± 0.02	0.15 ± 0.02	Zu	78 ± 3	74 ± 4
Ma	1.11 ± 0.22	0.12 ± 0.01	Ma	85 ± 15	88 ± 5
Duo	1.17 ± 0.09	0.24 ± 0.03	Duo	92 ± 3	89 ± 5
Dü	0.64 ± 0.12	0.16 ± 0.05	Dü	58 ± 15	82 ± 27
Di	0.98 ± 0.08	0.12 ± 0.02	Di	132 ± 43	94 ± 22

Tab. 10-17 Tabellen geben die Durchschnittswerte (Anzahl n = 3) der Konzentrationen [mg/kg Trockenmasse] von Kobalt, Chrom, Cäsium, Eisen, Mangan, Rubidium, Selen und Zink in Zunge, Ma-Magen, Duo-Duodenum, Dü-Dünndarm, Di-Dickdarm selenadäquat (Se+) und selenmangel- (Se-) ernährter Tiere wieder.

Der Selengehalt in den Geweben der Tiere, die mit einer Selenmangeldiät ernährt wurden, ist deutlich geringer als in den Geweben der Tiere, die eine selenadäquate Nahrung erhielten. Die Gehalte unterscheiden sich um ca. eine Größenordnung für Zunge, Magen und Dickdarm. Beim Duodenum und Dünndarm fallen diese Unterschiede etwas geringer aus. Signifikante Unterschiede ($P < 0,01$) konnten für die Selengehalte in Magen und Dünndarm beobachtet werden. Als hochsignifikante Unterschiede ($P < 0,001$) können die Selenkonzentrationen in Zunge, Duodenum und Dickdarm betrachtet werden. Mit Ausnahme von Eisen in der Zunge und dem Magen (schwach signifikant mit $P < 0,05$), deren Gesamtgehalte für Selenmangeltiere geringfügig erhöht sind, sind keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Populationen erkennbar. Die Konzentrationen von Eisen betragen in den Organen Zunge, Duodenum und Dickdarm über 100 mg/kg, Im Dünndarm der beiden Populationen liegen die Konzentrationen bei 46 mg/kg für die Se(+)-Tiere und 65 mg/kg für Se(-)-Tiere sowie im Magen der Gruppe der Se-adäquat ernährten Tiere bei 65 mg/kg. Die höchste Konzentration an Kobalt war im Dickdarm mit 0,063 mg/kg für die Se(+)- bzw. mit 0,042 mg/kg für die Se(-)-Tiere zu

beobachten. Für Chrom wurde eine erhöhte Konzentration im Dickdarm der Se-adäquat ernährten Tiere festgestellt. Dieser Wert (0,89 mg/kg) ist jedoch, ähnlich der Kobaltkonzentration des Dickdarms der Se(+)-Tiere, mit einer hohen Standardabweichung behaftet. Die Alkalimetalle Cäsium und Rubidium sind inhomogen in den Geweben verteilt. Sie weisen die höchsten Konzentrationen in Zunge und Duodenum auf. Ebenso wie die genannten Alkalielemente Cäsium und Rubidium ist Mangan nicht homogen in den Organen des gastrointestinalen Trakts verteilt. Die Zinkgehalte in den Geweben können als nahezu gleich betrachtet werden und variieren in den Grenzen der Standardabweichung zwischen 80-90 mg/kg.

4.1.1.1 Imunochemischer Nachweis der subzellulären Kompartimente durch differenzielle Ultrazentrifugation

Für die Untersuchungen von Spurenelementen auf subzellulärer Ebene wurde auf eine Mixtur von Proteaseinhibitoren verzichtet. Ebenfalls wurde ein vereinfachter Homogenisierungspuffer aus 20 mmol Tris-HNO₃ (pH 7,4) verwendet, um mögliche Elementkontaminationen zu vermeiden. Die Güte der subzellulären Bestandteile (Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zytosol) ließ sich durch immunochemische Nachweisverfahren überprüfen. Dabei wurden die Fraktionen mit dem Antikörper hnRNP L, welcher gegen kernspezifische Proteine gerichtet ist, untersucht. Der Antikörper Prohibitin wurde zur Überprüfung der Fraktionen auf Mitochondrien eingesetzt. Der Superoxid dismutase-Antikörper ist gegen die zytosolische SOD gerichtet und wurde auf die Güte der durch differenzielle Ultrazentrifugation erhaltenen Fraktionen getestet. Die Überprüfung der Qualität der subzellulären Fraktionen wurde an einer Rattenleber durchgeführt und ist repräsentativ für die subzelluläre Fraktionierung der Gewebe des gastrointestinalen Trakts der Ratte. In Abbildung 14-16 sind die immunochemischen Tests für kernspezifische, mitochondriale und zytosolische Proteine wiedergegeben.

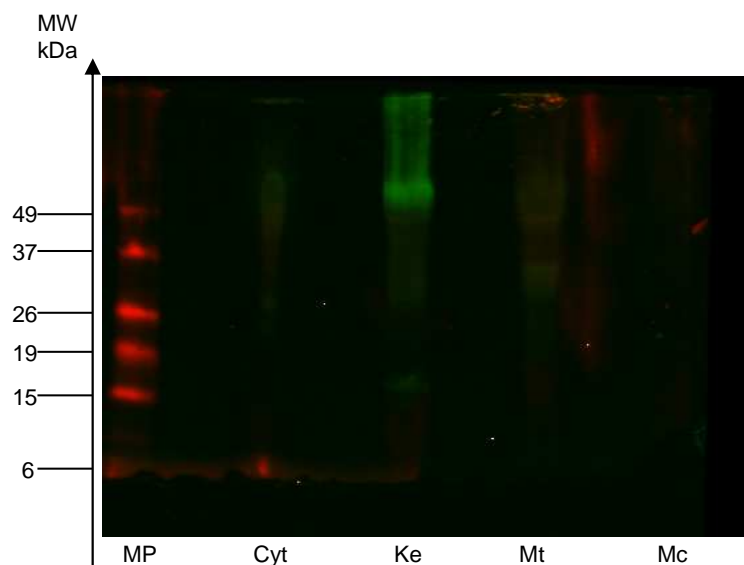


Abb. 14 Zellkernmarker hnRNP L in den subzellulären Leberfraktionen der Ratte; Cyt = Zytosol, Ke = Kerne, MT = Mitochondrien, Mc = Mikrosomen

Der Antikörpertest für hnRNP L zeigt die Präsenz kernspezifischer Proteine in der Kernfraktion bei einer Molekülmasse von 65 kDa.

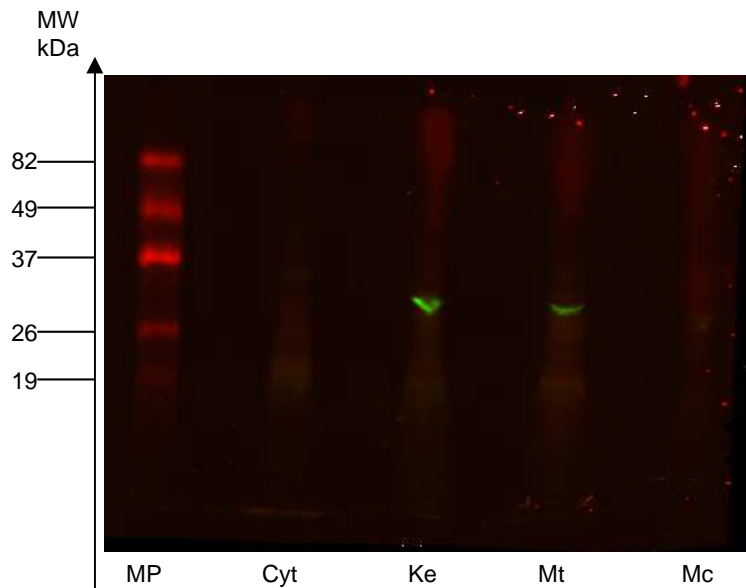


Abb. 15 Mitochondrienmarker Prohibitin in den subzellulären Leberfraktionen der Ratte; Cyt = Zytosol, Ke = Kerne, MT = Mitochondrien, Mc = Mikrosomen

Durch den Antikörpertest mit Prohibitin sind bei ca. 30 kDa positive Signale für die Anwesenheit mitochondrialer Proteine in der Kern- und Mitochondrienfraktion zu erkennen. Das angewendete vereinfachte Protokoll zur subzellulären Fraktionierung zeigt durch den immunochemischen Nachweis, dass eventuell schwere Mitochondrien bei der Trennung der Kernfraktion co-sedimentieren. Dies lässt sich oft nicht vermeiden.

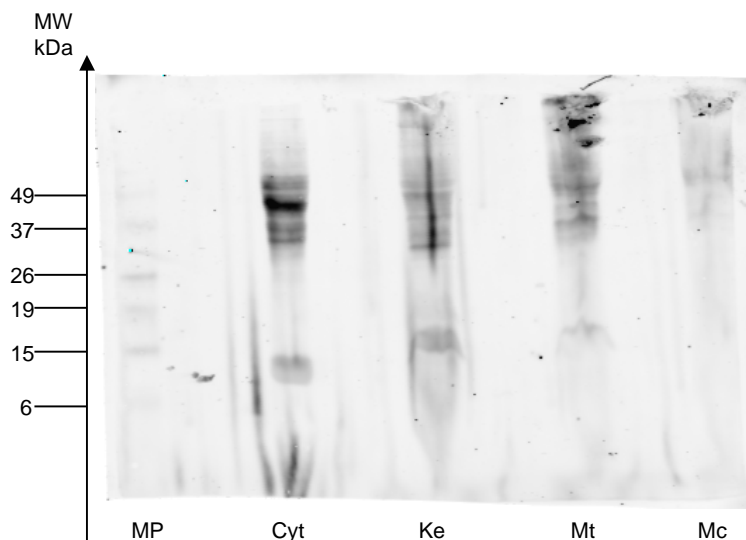


Abb. 16 Zytosolmarker SOD in den subzellulären Leberfraktionen der Ratte; Cyt = Zytosol, Ke = Kerne, MT = Mitochondrien, Mc = Mikrosomen

Für die Qualitätskontrolle der Fraktionierung wurde als Zytosolmarker ein Antikörper gewählt, der gegen die Superoxid dismutase der Isoform I gerichtet ist. Die SOD I ist ein rein zytosolisches Protein. Die Präsenz des SOD im Zytosol ist bei ca. 14 kDa zu erkennen. In den anderen Fraktionen ist in diesem Bereich kein Signal für einen positiven Antikörpertest zu beobachten.

4.1.1.2 Bestimmung der Spurenelementkonzentrationen in den subzellulären Fraktionen mittels INAA

Für die Verteilung der Spurenelemente und deren Konzentrationen in den subzellulären Fraktionen wurden die durch differenzielle Ultrazentrifugation erhaltenen subzellulären Kompartimente in hochreine Quarzampullen einpipettiert und anschließend lyophilisiert. Das Trockengewicht des bei der subzellulären Fraktionierung verwendeten Tris-Puffers wurde vor der Berechnung der Elementkonzentrationen substrahiert. Die Konzentrationsbestimmung von Kobalt, Chrom, Cäsium, Eisen, Mangan, Rubidium, Selen und Zink erfolgte für die Zellorganellen Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zytosol der Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm sowie Dickdarm selenadäquat und selenmangelernährter Tiere. Hierfür wurden von jeweils drei Tieren der beiden Populationen die subzellulären Fraktionen verwendet. Die Tabellen 1-5 zeigen die ermittelten Durchschnittswerte. Für die Elemente Kobalt und Chrom können keine Mittelwerte aus drei verschiedenen Tieren der beiden Gruppen angegeben werden. Zwei der drei Quarzampullen stammten aus einer anderen Charge. Während des Herstellungsprozesses der Ampullen traten für diese beiden Elemente inhomogene Kontaminationen auf. Fünf von zwölf Leerampullen hatten während der Messreihen Konzentrationen für Chrom von bis zu 0,24 mg/kg. Die Kobaltkontamination aller Leerampullen betrug bis zu 0,26 mg/kg. Für den dadurch einzigen erhaltenen Wert konnte lediglich die Standardabweichung der Messung angegeben werden. Für Konzentrationen, die unterhalb der Nachweisgrenze lagen, wurde der geringste Wert des Organs angegeben und mit <X (X=geringster Wert) gekennzeichnet. In den Tabellen 18-27 sind die erhaltenen Konzentrationen der Spurenelemente für die subzellulären Fraktionen der jeweiligen Organe der Se(+)- bzw. Se(-)-Tiere wiedergegeben.

Element	Elementkonzentration [mg/kg] von Zunge in Se(+)-Tieren			
	Kerne	Mitochondrien	Mikrosomen	Zytosol
Co	0.07 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.09 ± 0.01
Cr	2.47 ± 0.21	2.70 ± 0.54	5.00 ± 0.73	1.31 ± 0.29
Cs	<0.03	<0.03	0.05 ± 0.01	0.14 ± 0.04
Fe	96 ± 12	160 ± 23	363 ± 80	223 ± 37
Mn	1.40 ± 0.53	<1.00	<1.00	2.33 ± 0.67
Rb	<10.88	<10.88	<10.88	15.01 ± 4.43
Se	0.59 ± 0.08	0.68 ± 0.08	0.88 ± 0.28	1.43 ± 0.21
Zn	105 ± 14	136 ± 33	98 ± 10	146 ± 27

Tab. 18 Konzentrationen von Kobalt, Chrom, Cäsium, Eisen, Mangan, Rubidium, Selen und Zink für Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zytosol in der Zunge selenadäquat ernährter Ratten

Element	Elementkonzentration [mg/kg] von Zunge in Se(-)-Tieren			
	Kerne	Mitochondrien	Mikrosomen	Zytosol
Co	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.01
Cr	2.55 ± 0.23	2.40 ± 0.27	5.62 ± 0.65	3.51 ± 0.51
Cs	<0.03	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.03
Fe	118 ± 17	132 ± 37	769 ± 132	209 ± 14
Mn	1.83 ± 0.68	<1.00	<1.00	1.81 ± 0.14
Rb	<10.88	<10.88	<10.88	11.72 ± 1.19
Se	0.28 ± 0.04	<0.25	<0.25	<0.25
Zn	114 ± 6	151 ± 22	111 ± 36	174 ± 56

Tab. 19 Konzentrationen von Kobalt, Chrom, Cäsium, Eisen, Mangan, Rubidium, Selen und Zink für Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zytosol in der Zunge selenmangelernährter Ratten

Mit Ausnahme von Chrom und Selen gibt es keine signifikanten Unterschiede der Konzentrationen in den subzellulären Organellen der Zunge zwischen den beiden Populationen. Die fast doppelt so hohe Konzentration von Chrom im Zytosol der Se(-)-Zunge kann aber aufgrund der Anzahl der verwertbaren Messgrößen nicht als signifikant angesehen werden. Bei der Verteilung von Kobalt ist zu erkennen, dass sich die höchste Konzentration in den Mikrosomen von Se(+)- und Se(-)-Tieren befindet. Das gleiche ist auch für Chrom zu sehen. Die höchste Konzentration von Cäsium und Rubidium wurde im Zytosol erhalten. Der schwach signifikante Unterschied im Gesamtgehalt bei Eisen ist auf subzellulärer Ebene für die Zunge nicht zu erkennen. Eine um den Faktor 3 höhere Konzentration von Eisen ist in den Mikrosomen zu finden. Für den Mangangehalt in den subzellulären Organellen ist zu erkennen, dass in den Nuklei und im Zytosol die höchsten Konzentrationen zu finden sind. In der Kernfraktion der Se(-)-Zunge befindet sich das einzige über der Nachweisgrenze detektierbare Selen. Der Vergleich der Konzentrationen der beiden Kernfraktionen von Se(+)- und Se(-)-Zunge für Selen (0,59 mg/kg : 0,28 mg/kg) ist als signifikant ($P < 0,01$) einzustufen. Mit einer Konzentration von 1,48 mg/kg Selen im Zytosol liegt der Wert bei der Se(+)-Zunge nahezu doppelt so hoch wie in den übrigen Organellen. Die Verteilung von Zink kann für beide Populationen in der Zunge als homogen angesehen werden.

Element	Elementkonzentration [mg/kg] von Magen in Se(+)-Tieren			
	Kerne	Mitochondrien	Mikrosomen	Zytosol
Co	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.09 ± 0.01
Cr	0.96 ± 0.18	0.44 ± 0.06	0.75 ± 0.14	1.37 ± 0.21
Cs	<0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Fe	109 ± 8	115 ± 8	228 ± 4	75 ± 15
Mn	2.05 ± 0.35	2.21 ± 0.14	3.01 ± 0.14	2.69 ± 0.14
Rb	<0.83	1.38 ± 0.10	0.92 ± 0.13	7.50 ± 1.16
Se	0.92 ± 0.17	1.58 ± 0.05	2.35 ± 0.06	2.34 ± 0.04
Zn	152 ± 15	217 ± 21	171 ± 11	66 ± 11

Tab. 20 Konzentrationen von Kobalt, Chrom, Cäsium, Eisen, Mangan, Rubidium, Selen und Zink für Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zytosol des Magens selenadäquat ernährter Ratten

Element	Elementkonzentration [mg/kg] von Magen in Se(-)-Tieren			
	Kerne	Mitochondrien	Mikrosomen	Zytosol
Co	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.13 ± 0.01
Cr	1.11 ± 0.17	0.56 ± 0.18	0.94 ± 0.21	0.57 ± 0.16
Cs	<0.01	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.08 ± 0.01
Fe	175 ± 20	196 ± 23	348 ± 45	74 ± 21
Mn	2.80 ± 0.28	2.45 ± 0.35	3.05 ± 0.92	2.65 ± 0.49
Rb	<0.83	2.42 ± 0.78	1.36 ± 0.21	8.22 ± 0.16
Se	0.24 ± 0.04	<0.2	<0.2	0.21 ± 0.01
Zn	180 ± 63	189 ± 19	202 ± 37	80 ± 6

Tab. 21 Konzentrationen von Kobalt, Chrom, Cäsium, Eisen, Mangan, Rubidium, Selen und Zink für Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zytosol des Magens selenmangelernährter Ratten

Die Kobalt-Konzentrationen im Magen der Se(+)-Tiere ist homogen verteilt mit Werten von ca. 0,05 mg/kg. In den Se(-)-Tieren tritt die höchste Konzentration im Zytosol (0,13 mg/kg) auf. Die geringste Chromkonzentration wurde in den Mitochondrien (0,44 mg/kg) und die höchste im Zytosol (1,37 mg/kg) der Se(+)-Tiere festgestellt. Die Konzentration von Chrom ist in den Mitochondrien (0,56mg/kg) und im Zytosol (0,57mg/kg) der Se(-)-Tiere am geringsten. Für die Alkalimetalle Cäsium und Rubidium konnten die höchsten Konzentrationen für Se(+) und Se(-) im Zytosol festgestellt werden. In den Mikrosomen ist die Eisenkonzentration für selenadäquat und Se-mangelernährte Tiere am höchsten. Der Unterschied zwischen den Konzentrationen (Se(+) = 228 mg/kg, Se(-) = 348 mg/kg) in den Mikrosomen ist schwach signifikant (P < 0,05). Bei der Manganverteilung im Se(+)-Magen ist in den Mikrosomen der höchste Gehalt mit 3,01 mg/kg erkennbar, während in den subzellulären Fraktionen der Se(-)-Mägen das Mangan homogen verteilt ist. Wie aus dem signifikanten Unterschied für Selen aus dem Gesamtgehalt erwartet, sind die Unterschiede zwischen den subzellulären Kompartimenten von Se(+) und Se(-) ebenfalls signifikant (P < 0,01) bis hoch signifikant (P < 0,001). Die höchsten detektierbaren Gehalte in den Se(-)-Tieren waren in der Kernfraktion sowie im Zytosol. In den Se(+)-Tieren ist die Verteilung inhomogen. Die geringsten Konzentrationen von Zink sind für beide Populationen im Zytosol des Magens bestimmbar.

Element	Elementkonzentration [mg/kg] von Duodenum in Se(+)-Tieren			
	Kerne	Mitochondrien	Mikrosomen	Zytosol
Co	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.01
Cr	2.63 ± 0.27	0.45 ± 0.21	1.94 ± 0.27	0.75 ± 0.18
Cs	<0.02	<0.02	0.02 ± 0.01	0.08 ± 0.01
Fe	148 ± 48	139 ± 13	476 ± 76	74 ± 2
Mn	3.90 ± 0.42	2.40 ± 0.57	5.75 ± 1.77	2.30 ± 0.01
Rb	<6.09	<6.09	<6.09	7.67 ± 2.23
Se	0.62 ± 0.03	1.11 ± 0.23	1.24 ± 0.10	1.48 ± 0.28
Zn	236 ± 35	231 ± 25	269 ± 25	101 ± 6

Tab. 22 Konzentrationen von Kobalt, Chrom, Cäsium, Eisen, Mangan, Rubidium, Selen und Zink für Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zytosol des Duodenums selenadäquat ernährter Ratten

Element	Elementkonzentration [mg/kg] von Duodenum in Se(-)-Tieren			
	Kerne	Mitochondrien	Mikrosomen	Zytosol
Co	0.22 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Cr	7.01 ± 0.58	1.77 ± 0.25	1.35 ± 0.23	0.87 ± 0.22
Cs	<0.02	<0.02	0.03 ± 0.01	0.10 ± 0.02
Fe	134 ± 30	131 ± 37	487 ± 65	72 ± 9
Mn	4.70 ± 0.57	1.95 ± 0.21	5.21 ± 0.99	2.19 ± 0.28
Rb	<6.09	<6.09	<6.09	11.29 ± 1.87
Se	<0.13	<0.13	<0.13	0.17 ± 0.06
Zn	243 ± 33	257 ± 35	245 ± 59	113 ± 22

Tab. 23 Konzentrationen von Kobalt, Chrom, Cäsium, Eisen, Mangan, Rubidium, Selen und Zink für Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zytosol des Duodenums selenmangelernährter Ratten

In den Se(+)-Tieren ist Konzentration an Kobalt in den subzellulären Fraktionen homogen verteilt mit Werten von ca. 0,05 mg/kg. Bei den Se(-)-Tieren hingegen gibt es einen hohen Kobaltgehalt in den Kernen (0,22 mg/kg). Chrom kann im Duodenum der Se(+)-Tiere als inhomogen bewertet werden. Allerdings ist auch dort die Konzentration wie bei den Se(-)-Tieren in den Kernen am höchsten (Se(+) 2,63 mg/kg; Se(-) 7,01 mg/kg). Cäsium sowie Rubidium sind mit ihrer größten Konzentration im Zytosol zu finden. Für Eisen finden sich die höchsten Konzentrationen in den Mikrosomen (ca. 480 mg/kg). Bei der Verteilung von Mangan in den subzellulären Organellen konnten die höchsten Konzentrationen in der Kernfraktion bzw. in den Mikrosomen bestimmt werden. Sie betragen 3,90 mg/kg für die Se(+)-Tiere und 4,70 mg/kg für die Se(-)-Tiere. Selen ist in den Selenmangeltieren nur im Zytosol detektierbar. Dort konnte eine Konzentration von 0,17 mg/kg bestimmt werden. Ähnlich verhält es sich in den Se-adäquat ernährten Tieren. Dort konnte ebenfalls im Zytosol mit 1,48 mg/kg die größte Menge erfasst werden. Für alle untersuchten subzellulären Fraktionen konnten signifikante Unterschiede zwischen den Se-adäquat und Se-mangelernährten Tieren bestimmt werden. Die Zinkkonzentration ist im Zytosol beider Populationen am geringsten. Sie beträgt ca. 100 mg/kg.

Element	Elementkonzentration [mg/kg] von Dünndarm in Se(+)-Tieren			
	Kerne	Mitochondrien	Mikrosomen	Zytosol
Co	0.11 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.15 ± 0.01
Cr	2.77 ± 0.26	0.61 ± 0.21	2.61 ± 0.32	1.18 ± 0.23
Cs	<0.07	<0.07	<0.07	0.08 ± 0.01
Fe	123 ± 8	119 ± 26	280 ± 13	58 ± 17
Mn	2.05 ± 0.07	2.85 ± 0.06	1.52 ± 0.40	1.48 ± 0.23
Rb	<5.08	<5.08	<5.08	6.66 ± 2.23
Se	0.91 ± 0.12	1.46 ± 0.11	1.88 ± 0.18	1.49 ± 0.05
Zn	229 ± 32	307 ± 37	278 ± 26	126 ± 18

Tab. 24 Konzentrationen von Kobalt, Chrom, Cäsium, Eisen, Mangan, Rubidium, Selen und Zink für Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zytosol des Dünndarms selenadäquat ernährter Ratten

Element	Elementkonzentration [mg/kg] von Dünndarm in Se(-)-Tieren			
	Kerne	Mitochondrien	Mikrosomen	Zytosol
Co	0.07 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.01
Cr	2.25 ± 0.33	0.61 ± 0.14	0.99 ± 0.22	1.51 ± 0.24
Cs	<0.07	<0.07	<0.07	0.10 ± 0.02
Fe	149 ± 33	94 ± 11	235 ± 47	50 ± 12
Mn	2.15 ± 0.21	2.60 ± 0.14	1.11 ± 0.12	1.50 ± 0.12
Rb	<5.08	<5.08	<5.08	7.13 ± 2.68
Se	<0.12	0.16 ± 0.05	<0.12	0.20 ± 0.06
Zn	231 ± 27	323 ± 43	244 ± 14	113 ± 25

Tab. 25 Konzentrationen von Kobalt, Chrom, Cäsium, Eisen, Mangan, Rubidium, Selen und Zink für Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zytosol des Dünndarms selenmangelernährter Ratten

In den Mikrosomen der Se(+)-Tiere ist die Kobaltkonzentration mit 0,28 mg/kg am höchsten. Bei den Se(-)-Tieren hingegen ist der Gehalt an Kobalt im Zytosol (0,12 mg/kg) am höchsten. Der höchste Gehalt an Chrom wurde für die Se(+)-Tiere in der Kernfraktion (2,77 mg/kg) und in den Mikrosomen (2,61 mg/kg) detektiert. In der Kernfraktion der Se(-)-Tiere liegt dort der höchste Wert (2,25 mg/kg). Cäsium sowie Rubidium sind nur im Zytosol detektierbar. In den Mikrosomen lagen die Gehalte für Eisen bei 280 mg/kg für Se(+)- und 235 mg/kg für Se(-)-Dünndärme. Für das Spurenelement Mangan befinden sich die größten Mengen in den Mitochondrien gefolgt von den Nuklei. Selen konnte in den selenmangelernährten Tieren neben dem Zytosol (0,20 mg/kg) auch in den Mitochondrien (0,16 mg/kg) bestimmt werden. Beim Vergleich mit den selenadäquat ernährten Tieren enthält aber die mikrosomale Fraktion (1,88 mg/kg) die höchste Konzentration. Insgesamt lassen sich auch bei der Betrachtung der Selenkonzentration in den subzellulären Fraktionen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Populationen feststellen. Bei der Verteilung von Zink ist zu beobachten, dass für die Dünndärme von Se(+)- und Se(-)-Ratten die höchsten Konzentrationen in den Mitochondrien (ca. 320 mg/kg) bestimmt wurden, während in den Zytosolen die geringste Konzentration (ca. 120 mg/kg) zu finden ist.

Element	Elementkonzentration [mg/kg] von Dickdarm in Se(+)-Tieren			
	Kerne	Mitochondrien	Mikrosomen	Zytosol
Co	0.13 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.21 ± 0.02
Cr	2.09 ± 0.41	3.83 ± 0.55	1.51 ± 0.37	4.36 ± 0.72
Cs	<0.04	<0.04	<0.04	0.06 ± 0.02
Fe	120 ± 19	157 ± 14	621 ± 71	129 ± 26
Mn	3.51 ± 0.14	3.40 ± 0.71	1.32 ± 0.12	3.05 ± 0.49
Rb	<9.48	<9.48	<9.48	10.53 ± 1.48
Se	0.59 ± 0.15	0.86 ± 0.16	0.90 ± 0.41	2.32 ± 0.06
Zn	192 ± 9	247 ± 103	238 ± 45	191 ± 55

Tab. 26 Konzentrationen von Kobalt, Chrom, Cäsium, Eisen, Mangan, Rubidium, Selen und Zink für Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zytosol des Dickdarms selenadäquat ernährter Ratten

Element	Elementkonzentration [mg/kg] von Dickdarm in Se(-)-Tieren			
	Kerne	Mitochondrien	Mikrosomen	Zytosol
Co	0.19 ± 0.01	0.13 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.14 ± 0.02
Cr	4.44 ± 0.32	3.71 ± 0.61	1.95 ± 0.35	2.92 ± 0.58
Cs	<0.04	<0.04	<0.04	0.06 ± 0.01
Fe	85 ± 27	150 ± 16	655 ± 120	90 ± 23
Mn	3.30 ± 0.57	3.07 ± 0.66	1.50 ± 0.57	2.45 ± 0.64
Rb	<9.48	<9.48	<9.48	16.45 ± 2.37
Se	<0.22	<0.22	<0.22	0.28 ± 0.08
Zn	252 ± 50	198 ± 25	212 ± 45	203 ± 24

Tab. 27 Konzentrationen von Kobalt, Chrom, Cäsium, Eisen, Mangan, Rubidium, Selen und Zink für Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zytosol des Dickdarms selenmangelernährter Ratten

Im Dickdarm der untersuchten Se(+)- und Se(-)-Tiere befindet sich die geringste Menge an Kobalt in den Mitochondrien (0,21 mg/kg bzw. 0,14 mg/kg). Für das Element Chrom finden sich inhomogenen Verteilungen in den subzellulären Organellen. Im Zytosol der Se(+)-Tiere mit 4,36 mg/kg und in der Kernfraktion der Se(-)-Tiere (4,44 mg/kg) wurden die höchsten Gehalte an Chrom gefunden. Die Alkali-elemente Cäsium und Rubidium kommen in ihrer höchsten Konzentration im Zytosol vor. Sehr hohe Werte für Eisen sind in den Mikrosomen nachweisbar. Mit über 600 mg/kg für beide Populationen sind dort die höchsten Konzentrationen gemessen worden. Mit Ausnahme der mikrosomalen Fraktion ist Mangan homogen verteilt. In den Mikrosomen finden sich für Se(+)- und Se(-)-Tiere die geringsten Konzentrationen von ca. 1,40 mg/kg. Die Selengehalte für Se(+)- als auch Se(-)-Tiere sind im Zytosol (Se(+)) 2,32 mg/kg; Se(-) 0,28 mg/kg) am höchsten. Entsprechend dem Ergebnis der Gesamtgehalte sind auch bei der Verteilung des Selen in den subzellulären Fraktionen signifikante Unterschiede detektierbar. Zink ist in beiden Populationen auf subzellulärer Ebene mit Gehalten von ca. 200 mg/kg homogen verteilt.

4.1.1.3 Spurenelementverteilung in den subzellulären Fraktionen mittels LA-ICP-MS

Für die schnelle qualitative Bestimmung von Spurenelementen in den Zellfraktionen sowie Gewebehomogenaten wurde Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma und laserunterstützter Probenzufuhr eingesetzt. Dafür wurde ein Volumen von 5 µl der Probe auf die Oberfläche einer Polymermembran aufgetragen und getrocknet. Die Membran mit der getrockneten Probe wurde in eine mit Helium gespülte, geschlossene Kammer mittels gepulster Laserstrahlung und mit einer konstanten Pulswiederholungsrate, entlang einer durch (ungefähr) das Zentrum des Probenflecks gehenden Gerade, gescannt. Jeder Fleck wurde dreimal gescannt. Die laterale Geschwindigkeit der Verschiebung der Probe hinsichtlich des Laserstrahls (Scangeschwindigkeit) blieb während der Messung konstant. Das ablatierte Material wurde zur Plasmafackel eines ICP-Massenspektrometers mittels Heliumstroms transportiert. Am Massenspektrometer wurden transiente Signale von mehreren Analyten quasi-simultan aufgenommen. Aufgrund der möglichen Unterschiede beim Ablationsverhalten wurden die registrierten transienten Signale auf das Referenzsignal, das der Menge des ablatierten Materials proportional ist, normiert. Als Referenzsignal wurde das ¹³C-Signal angenommen. Die

Ablationsbedingungen wurden so eingestellt, dass die gesamte Menge des Analyten innerhalb der exponierten Oberfläche der Probe komplett entfernt wurde. Die Analytsignale beim zweiten Scan entlang der gleichen Linie waren unterhalb der Nachweisgrenze.

Alle aufgenommenen Signale wurden auf ein Gasblank korrigiert und dann auf die entsprechenden Werte des ^{13}C -Signals bezogen. Die erhaltenen korrigierten Profile der Analyt/ ^{13}C -Intensitätsverhältnisse wurden nach dem Abzug der Basislinie und einer 5-Punkt-Medianfilter-Glättung integriert. Als Basislinie diente eine Gerade zwischen den Schnittpunkten der Tangenten. Die Integralwerte für die Intensitätsverhältnisse wurden als proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe angenommen. Abbildung 17 zeigt grafisch die beschriebene Vorgehensweise am Beispiel ^{57}Fe eines Mitochondrienflecks vom Magen eines Se(-)-Tieres.

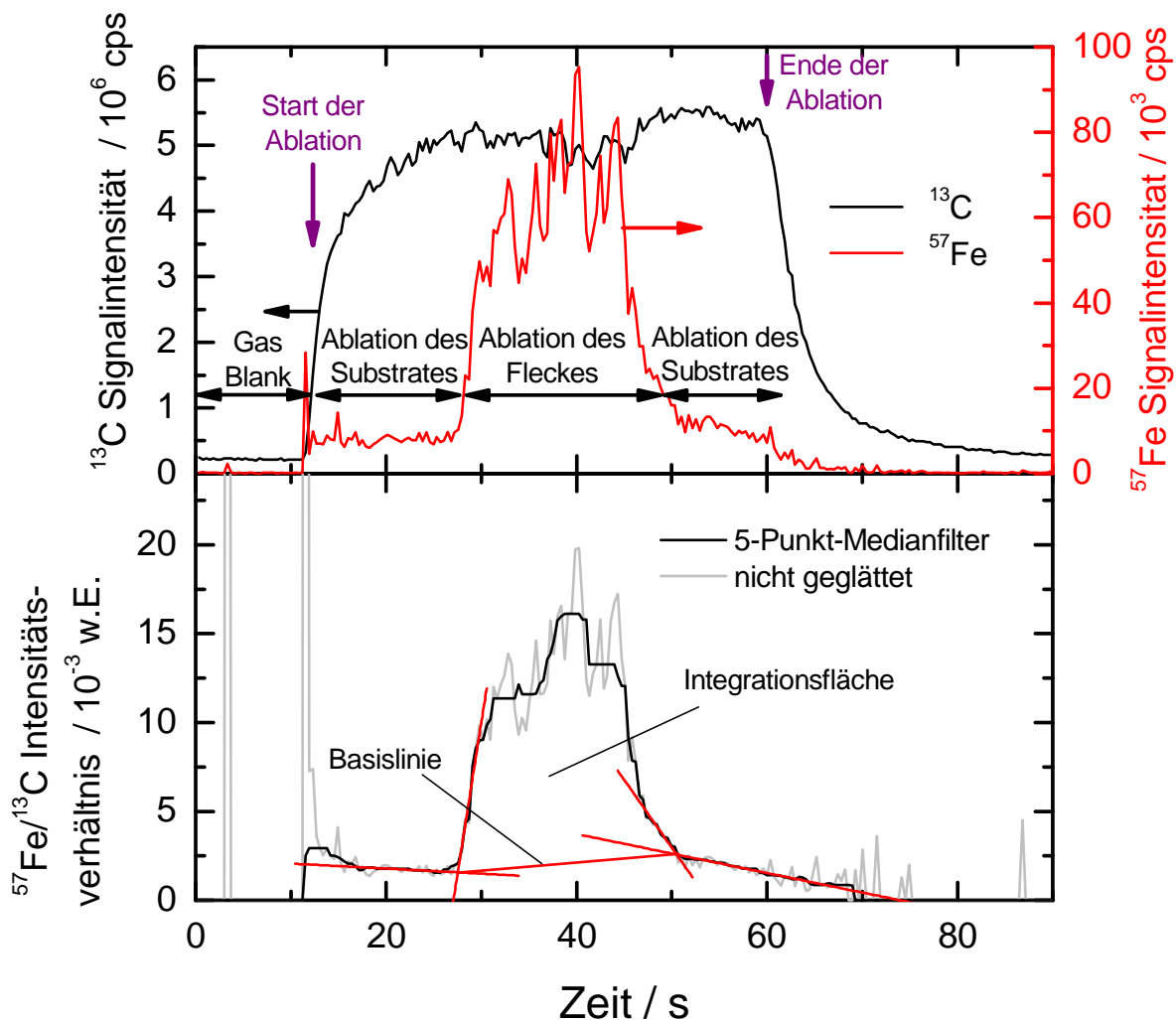


Abb. 17 Berechnung der Integralwerte am Beispiel für ^{57}Fe eines Mitochondrienflecks vom Magen eines Se(-)-Tieres

Die so erhaltenen Integrationsflächen oder quasi Konzentrationen wurden für die subzellulären Fraktionen (Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen, Zytosol) der Gewebe Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm exemplarisch für jeweils ein Tier mit selenadäquater bzw. Selenmangelnahrung verglichen. Abbildung 18 zeigt die transienten Signale am Beispiel für ^{57}Fe von den subzellulären Fraktionen eines Se(+)- und Se(-)-Tieres nach der Korrektur mit den erhaltenen Intensitäten des Referenzsignals (^{13}C).

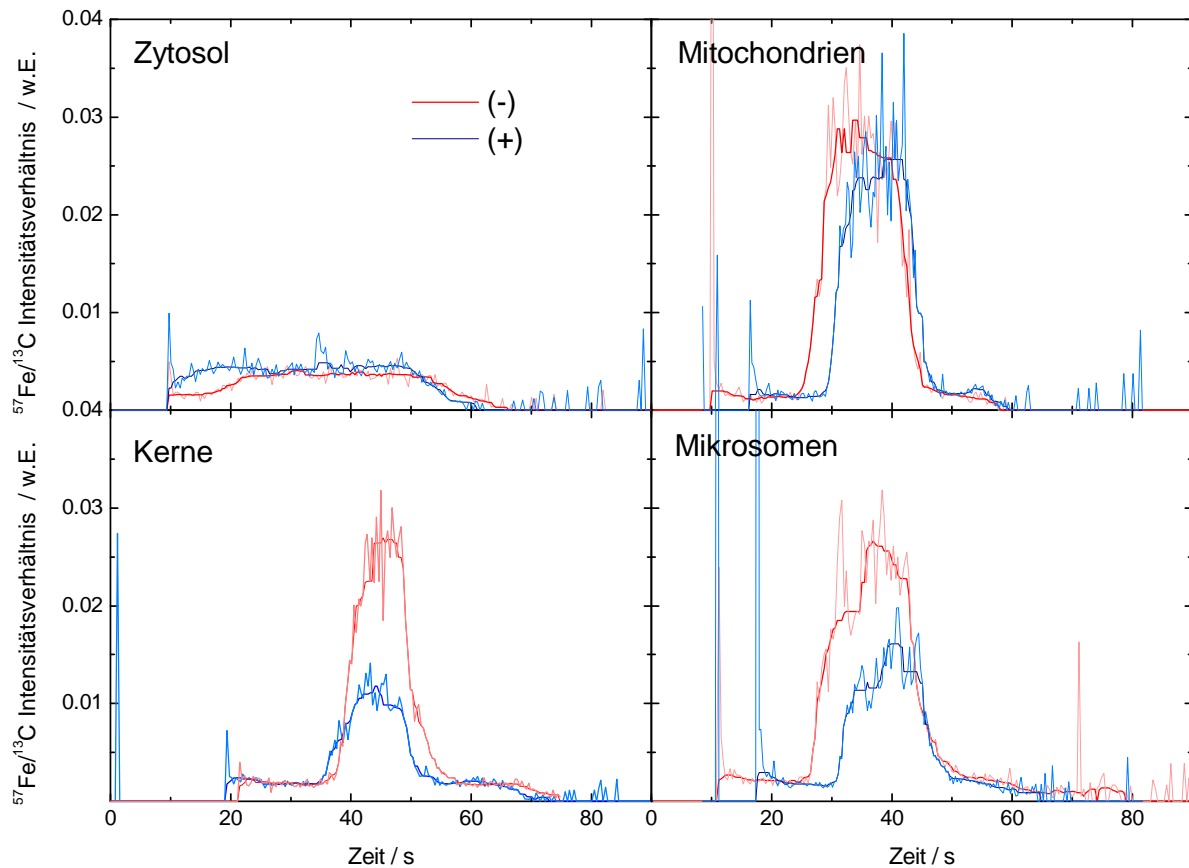


Abb. 18 Transiente auf ^{13}C korrigierte ^{57}Fe -Signale mit 5-Punkt-Medianfilter-Glättung für die Zellorganellen Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zytosol des Magens von Se(+)- und Se(-)-Tieren

Untersucht wurden die Elemente Vanadium, Nickel, Kupfer, Arsen, Molybdän und Cadmium. Die erhaltenen Integralwerte sind in den Tabellen 28-37 wiedergegeben.

Element	Integralwerte von Zunge in Se(+)-Tier			
	Kerne	Mitochondrien	Mikrosomen	Zytosol
V51	0.0086 ± 0.0008	0.0074 ± 0.0058	0.0110 ± 0.0059	-0.0024 ± 0.0010
Ni60	0.0590 ± 0.0124	0.0329 ± 0.0138	0.0319 ± 0.0072	0.0244 ± 0.0243
Cu65	0.8782 ± 0.0862	1.0537 ± 1.2694	0.3239 ± 0.0337	0.1044 ± 0.0404
As75	0.0121 ± 0.0073	0.0082 ± 0.0037	0.0337 ± 0.0493	0.0123 ± 0.0062
Mo98	0.0037 ± 0.0004	0.0030 ± 0.0001	0.0018 ± 0.0001	0.0080 ± 0.0101
Cd112	0.0067 ± 0.0026	0.0079 ± 0.0025	0.0156 ± 0.0153	0.0196 ± 0.0205

Tab. 28 Integralwerte von Vanadium, Nickel, Kupfer, Arsen, Molybdän und Cadmium für Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zytosol der Zunge selenadäquat ernährter Ratten

Element	Integralwerte von Zunge in Se(-)-Tier			
	Kerne	Mitochondrien	Mikrosomen	Zytosol
V51	0.0095 ± 0.0016	0.0094 ± 0.0031	0.0168 ± 0.0152	0.0163 ± 0.0093
Ni60	0.0360 ± 0.0059	0.0430 ± 0.0053	0.0317 ± 0.0046	0.0323 ± 0.0078
Cu65	7.3990 ± 1.1408	9.2187 ± 0.4678	1.2177 ± 0.0503	2.0678 ± 0.1014
As75	0.0123 ± 0.0026	0.0122 ± 0.0020	0.0068 ± 0.0039	0.0057 ± 0.0008
Mo98	0.0042 ± 0.0013	0.0044 ± 0.0010	0.0016 ± 0.0001	0.0046 ± 0.0001
Cd112	0.0119 ± 0.0044	0.0147 ± 0.0031	0.0092 ± 0.0029	0.0059 ± 0.0018

Tab. 29 Integralwerte von Vanadium, Nickel, Kupfer, Arsen, Molybdän und Cadmium für Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zytosol der Zunge selenmangelernährter Ratten

Die erhaltenen Messergebnisse zeigen, dass für die Zunge Cadmium und Arsen inhomogen in den subzellulären Fraktionen der beiden Populationen verteilt ist, während Nickel in nahezu gleichen Mengen in allen Fraktionen auftritt. Vanadium konnte für Se(-)-Zungen in höheren Mengen in den Mikrosomen und im Zytosol detektiert werden, während in der Se(+)-Zunge das Gleiche nur für die Mikrosomen gilt. Im Zytosol ist die Konzentration so gering, dass nach Korrekturrechnung der Wert negativ wurde und somit die Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Die Menge Kupfer ist in den Kernen sowie den Mitochondrien beider Populationen am höchsten. Molybdän ist in den subzellulären Fraktionen fast gleich verteilt, mit Ausnahme der Mikrosomen. Dort lässt sich die geringste Menge feststellen.

Element	Integralwerte von Magen in Se(+)-Tier			
	Kerne	Mitochondrien	Mikrosomen	Zytosol
V51	0.0098 ± 0.0054	0.0113 ± 0.0008	0.0189 ± 0.0156	0.0076 ± 0.0029
Ni60	0.0400 ± 0.0041	0.0399 ± 0.0103	0.0253 ± 0.0123	0.0342 ± 0.0076
Cu65	0.3457 ± 0.0912	0.5512 ± 0.0444	0.3595 ± 0.0782	0.1768 ± 0.0211
As75	0.0122 ± 0.0047	0.1140 ± 0.1709	0.0209 ± 0.0168	0.0114 ± 0.0023
Mo98	0.0093 ± 0.0004	0.0199 ± 0.0029	0.0120 ± 0.0024	0.0143 ± 0.0020
Cd112	0.0153 ± 0.0083	0.0171 ± 0.0090	0.0181 ± 0.0153	0.0083 ± 0.0044

Tab. 30 Integralwerte von Vanadium, Nickel, Kupfer, Arsen, Molybdän und Cadmium für Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zytosol des Magens selenadäquat ernährter Ratten

Element	Integralwerte von Magen in Se(-)-Tier			
	Kerne	Mitochondrien	Mikrosomen	Zytosol
V51	0.0144 ± 0.0072	0.0162 ± 0.0107	0.0164 ± 0.0069	0.0114 ± 0.0124
Ni60	0.0296 ± 0.0116	0.0332 ± 0.0052	0.0362 ± 0.0090	0.0264 ± 0.0195
Cu65	0.4197 ± 0.1683	0.3636 ± 0.0361	0.3807 ± 0.0914	0.2195 ± 0.1053
As75	0.0129 ± 0.0106	0.0082 ± 0.0033	0.0104 ± 0.0062	0.0167 ± 0.0048
Mo98	0.0083 ± 0.0013	0.0113 ± 0.0019	0.0095 ± 0.0025	0.0101 ± 0.0056
Cd112	0.0132 ± 0.0039	0.0146 ± 0.0027	0.0242 ± 0.0041	0.0140 ± 0.0049

Tab. 31 Integralwerte von Vanadium, Nickel, Kupfer, Arsen, Molybdän und Cadmium für Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zytosol des Magens selenmangelernährter Ratten

Eine geringfügig höhere Menge an Vanadium ist in den Mitochondrien von Se(+)- und Se(-)-Mägen erkennbar. Während Kupfer in den Se(-)-Tieren homogen verteilt ist, ist in den Mitochondrien von Se(+) die größte Menge bestimmbar. Als inhomogen kann die Verteilung von Arsen in diesen Se(+)- und Se(-)-Organen angesehen werden. Die höchsten Werte ließen sich für Cadmium in den Mikrosomen beider Populationen detektieren. Homogen verteilt sind die Spurenelemente Nickel und Molybdän in den subzellulären Fraktionen.

Element	Integralwerte von Duodenum in Se(+)-Tier			
	Kerne	Mitochondrien	Mikrosomen	Zytosol
V51	0.0137 ± 0.0013	0.0143 ± 0.0050	0.0280 ± 0.0324	0.0052 ± 0.0050
Ni60	0.0580 ± 0.0058	0.0583 ± 0.0027	0.0409 ± 0.0144	0.0290 ± 0.0027
Cu65	0.3996 ± 0.0456	0.4141 ± 0.0872	0.4738 ± 0.2563	0.1481 ± 0.0872
As75	0.0131 ± 0.0031	0.0154 ± 0.0032	0.0125 ± 0.0070	0.0070 ± 0.0032
Mo98	0.0066 ± 0.0013	0.0099 ± 0.0032	0.0103 ± 0.0053	0.0086 ± 0.0032
Cd112	0.0464 ± 0.0115	0.0439 ± 0.0116	0.0460 ± 0.0110	0.0162 ± 0.0116

Tab. 32 Integralwerte von Vanadium, Nickel, Kupfer, Arsen, Molybdän und Cadmium für Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zytosol des Duodenums selenadäquat ernährter Ratten

Element	Integralwerte von Duodenum in Se(-)-Tier			
	Kerne	Mitochondrien	Mikrosomen	Zytosol
V51	0.0117 ± 0.0019	0.0102 ± 0.0029	0.0103 ± 0.0038	0.0134 ± 0.0097
Ni60	0.0490 ± 0.0010	0.0426 ± 0.0037	0.0319 ± 0.0098	0.0373 ± 0.0078
Cu65	0.2457 ± 0.0187	0.2886 ± 0.0443	0.1183 ± 0.0061	0.1242 ± 0.0785
As75	0.0115 ± 0.0004	0.0122 ± 0.0057	0.0091 ± 0.0043	0.0120 ± 0.0034
Mo98	0.0060 ± 0.0009	0.0097 ± 0.0008	0.0048 ± 0.0007	0.0085 ± 0.0043
Cd112	0.0279 ± 0.0068	0.0498 ± 0.0070	0.0211 ± 0.0021	0.0098 ± 0.0025

Tab. 33 Integralwerte von Vanadium, Nickel, Kupfer, Arsen, Molybdän und Cadmium für Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zytosol des Duodenums selenmangelernährter Ratten

Bei den Se(+)-Tieren ist Vanadium in den Mikrosomen am meisten vertreten, während es sich in den Se(-)-Tieren homogen auf subzellulärer Ebene verteilt. In den Se(-)-Tieren ist Nickel gleichmäßig in den subzellulären Fraktionen verteilt. Im Zytosol von Se(+)-Tieren ist die geringste Konzentration detektierbar. Für Kupfer ist ebenso im Zytosol von Se(+)-Tieren die geringste Menge nachweisbar, während in den Nuklei und in den Mitochondrien die höchsten Mengen bei Se(-)-Tieren auftreten. Für Arsen und Molybdän lassen sich für beide Populationen nahezu homogene Verteilungen bestimmen. Cadmium ist in den Zellfraktionen von Se(+)- und Se(-)-Tieren unterschiedlich verteilt. So gibt es in den Se(+)-Tieren die geringste Menge im Zytosol, während in den Se(-)-Tieren die höchste Konzentration in den Mitochondrien vorkommt.

Element	Integralwerte von Dünndarm in Se(+)-Tier			
	Kerne	Mitochondrien	Mikrosomen	Zytosol
V51	0.0179 ± 0.0024	0.0096 ± 0.0014	0.0122 ± 0.0045	0.0161 ± 0.0084
Ni60	0.0289 ± 0.0049	0.0351 ± 0.0084	0.0360 ± 0.0036	0.0296 ± 0.0144
Cu65	0.3589 ± 0.0773	0.2238 ± 0.0092	0.1114 ± 0.0208	0.0583 ± 0.1834
As75	0.0177 ± 0.0075	0.0126 ± 0.0029	0.0097 ± 0.0018	0.0157 ± 0.0016
Mo98	0.0120 ± 0.0028	0.0065 ± 0.0011	0.0048 ± 0.0008	0.0140 ± 0.0023
Cd112	0.0355 ± 0.0037	0.0191 ± 0.0039	0.0247 ± 0.0233	0.0225 ± 0.0059

Tab. 34 Integralwerte von Vanadium, Nickel, Kupfer, Arsen, Molybdän und Cadmium für Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zytosol des Dünndarms selenadäquat ernährter Ratten

Element	Integralwerte von Dünndarm in Se(-)-Tier			
	Kerne	Mitochondrien	Mikrosomen	Zytosol
V51	0.0151 ± 0.0013	0.0110 ± 0.0030	0.0084 ± 0.0008	0.0124 ± 0.0079
Ni60	0.0418 ± 0.0035	0.0275 ± 0.0083	0.0276 ± 0.0043	0.0297 ± 0.0028
Cu65	0.2638 ± 0.0061	0.4222 ± 0.0577	0.1124 ± 0.0083	0.1118 ± 0.0157
As75	0.0178 ± 0.0034	0.0156 ± 0.0028	0.0085 ± 0.0035	0.0096 ± 0.0026
Mo98	0.0092 ± 0.0021	0.0142 ± 0.0042	0.0077 ± 0.0013	0.0137 ± 0.0015
Cd112	0.0294 ± 0.0093	0.0568 ± 0.0017	0.0267 ± 0.0011	0.0148 ± 0.0021

Tab. 35 Integralwerte von Vanadium, Nickel, Kupfer, Arsen, Molybdän und Cadmium für Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zytosol des Dünndarms selenmangelernährter Ratten

Neben Vanadium ist auch Arsen nahezu gleichmäßig auf die subzellulären Kompartimente der Se(+)- und Se(-)-Tiere verteilt. Bei Nickel gilt diese Gleichverteilung nur für die Se(+)-Tiere. In den Se(-)-Tieren erkennt man den höchsten Gehalt in den Kernen. In Bezug auf Kupfer befinden sich für beide Populationen die höchsten Gehalte in der Kern- bzw. mitochondrialen Fraktion. Die Werte für Molybdän zeigen eine inhomogene Verteilung in den Zellorganellen beider Gruppen. Eine erhöhte Menge an Cadmium ist in der Kernfraktion der Se(+)-Tiere und in der mitochondrialen Fraktion der Se(-)-Tiere zu verzeichnen.

Element	Integralwerte von Dickdarm in Se(+)-Tier			
	Kerne	Mitochondrien	Mikrosomen	Zytosol
V51	0.0159 ± 0.0030	0.0107 ± 0.0051	0.0109 ± 0.0082	0.0063 ± 0.0035
Ni60	0.0523 ± 0.0071	0.0373 ± 0.0113	0.0421 ± 0.0196	0.0116 ± 0.0108
Cu65	0.2334 ± 0.0376	0.1934 ± 0.0880	0.2317 ± 0.1228	0.7915 ± 1.1376
As75	0.0169 ± 0.0029	0.0160 ± 0.0006	0.0081 ± 0.0032	0.0122 ± 0.0037
Mo98	0.0081 ± 0.0053	0.0028 ± 0.0011	0.0024 ± 0.0014	0.0037 ± 0.0021
Cd112	0.0385 ± 0.0226	0.0187 ± 0.0144	0.0140 ± 0.0120	0.0085 ± 0.0051

Tab. 36 Integralwerte von Vanadium, Nickel, Kupfer, Arsen, Molybdän und Cadmium für Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zytosol des Dickdarms selenadäquat ernährter Ratten

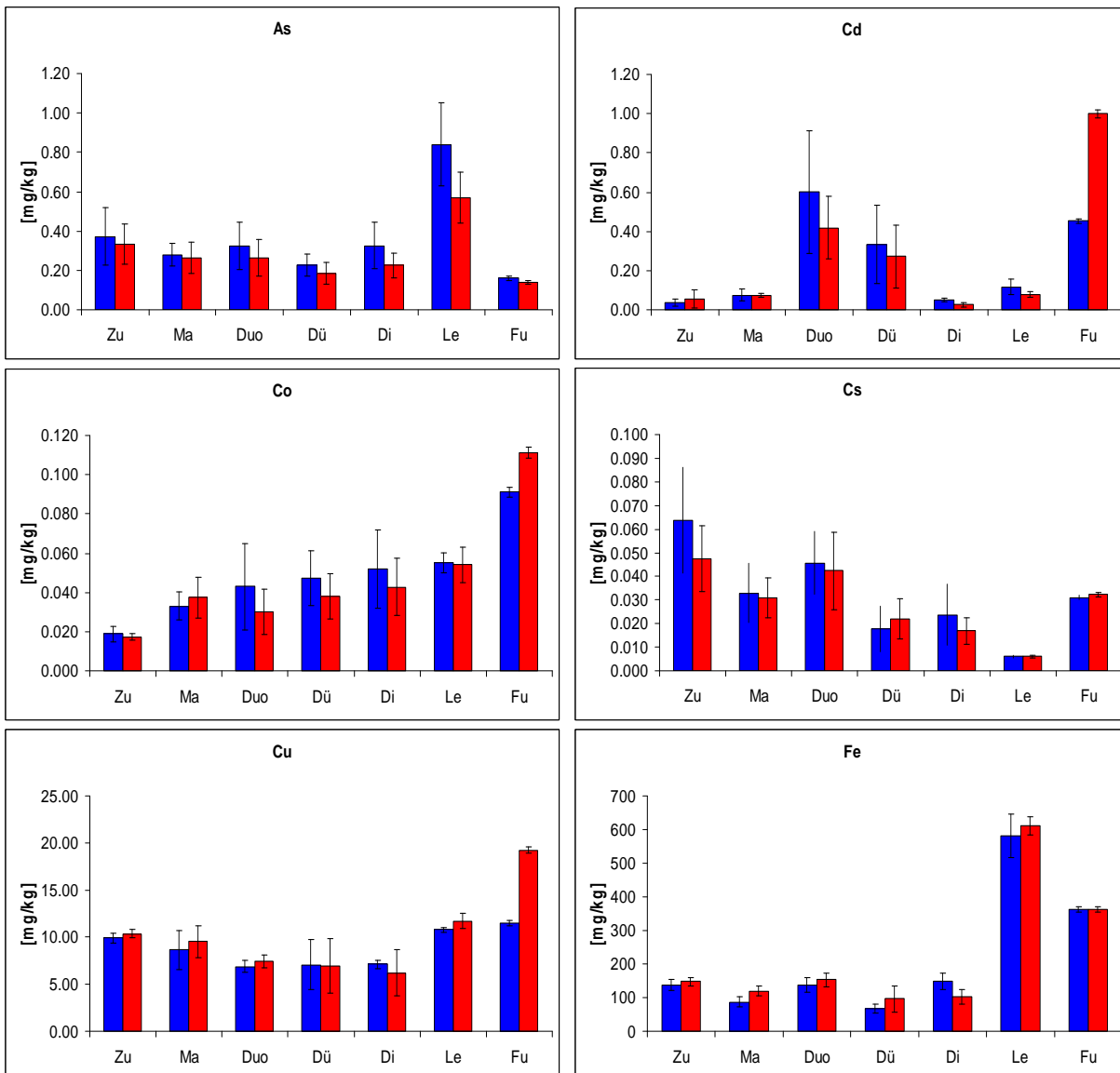
Element	Integralwerte von Dickdarm in Se(-)-Tier			
	Kerne	Mitochondrien	Mikrosomen	Zytosol
V51	0.0188 ± 0.0062	0.0115 ± 0.0019	0.0103 ± 0.0074	0.0043 ± 0.0023
Ni60	0.0416 ± 0.0061	0.0383 ± 0.0054	0.0432 ± 0.0240	0.0204 ± 0.0055
Cu65	0.2566 ± 0.0384	0.1496 ± 0.0380	0.1593 ± 0.1130	0.1001 ± 0.0255
As75	0.0241 ± 0.0010	0.0107 ± 0.0015	0.0140 ± 0.0056	0.0145 ± 0.0074
Mo98	0.0068 ± 0.0036	0.0170 ± 0.0228	0.0060 ± 0.0059	0.0035 ± 0.0007
Cd112	0.0204 ± 0.0124	0.0120 ± 0.0059	0.0127 ± 0.0053	0.0035 ± 0.0030

Tab. 37 Integralwerte von Vanadium, Nickel, Kupfer, Arsen, Molybdän und Cadmium für Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zytosol des Dickdarms selenmangelernährter Ratten

In beiden Populationen befindet sich die größte Menge an Vanadium in den Kernen. Im Gegensatz dazu wurde die geringste Nickelkonzentration in den Zytosolen gefunden. Eine homogene Verteilung von Kupfer wäre in den Se(+)-Tieren erkennbar, wenn nicht im Zytosol der höchste Wert besteht, der allerdings mit einer sehr hohen Standardabweichung versehen ist. Bei den Se(-)-Tieren findet sich die größte Kupfermenge in der Kernfraktion. Die größten Konzentrationen von Arsen sind in den Kernen beider Gruppen detektiert worden. Der höchste Gehalt von Molybdän ist bei den Se(+)-Tiere in den Kernen, bei den Se(-)-Tieren in den Mikrosomen nachzuweisen. Für die Se(+)- sowie Se(-)-Ratten ist die größte Menge an Cadmium in den Kernen bestimmbar.

4.1.2 Konzentrationsbestimmung mittels ICP-MS

Die Konzentrationsbestimmung mittels induktiv gekoppelter Plasma – Massenspektrometrie erlaubt eine quasi-simultane Bestimmung mehrerer Elemente. So kann die Bestimmung der Gehalte der Elemente Kobalt, Cäsium, Eisen, Mangan, Rubidium, Selen und Zink, die bereits mit der INAA bestimmt wurden, zur Validierung der erhaltenen Ergebnisse herangezogen werden. Des Weiteren ließen sich hier die Elemente Arsen, Cadmium, Kupfer, Molybdän, Nickel, Titan und Vanadium bestimmen, die mittels INAA nicht erfasst werden konnten. Für die Untersuchung mittels ICP-MS wurden die Gewebe Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von jeweils sieben Tieren unterschiedlichen Selenstatus verwendet. Die Leber von jeweils drei Tieren der beiden Gruppen wurde als Stoffwechselvergleichsorgan mit einbezogen. Zusätzlich wurden die Elementgehalte einer repräsentativen Probe der beiden Futtersorten bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung der Spurenelemente in der humanen Karzenomzelllinie HT29 erfolgte durch Poolen von drei 250 cm² großen Zellkulturflaschen. Die Abbildungen 19-32 zeigen graphisch die in Tabelle 38-51 ermittelten Durchschnittswerte. In Tabelle 52 sind die Gesamtgehalte der humanen Karzenomzelllinie HT29 wiedergegeben.



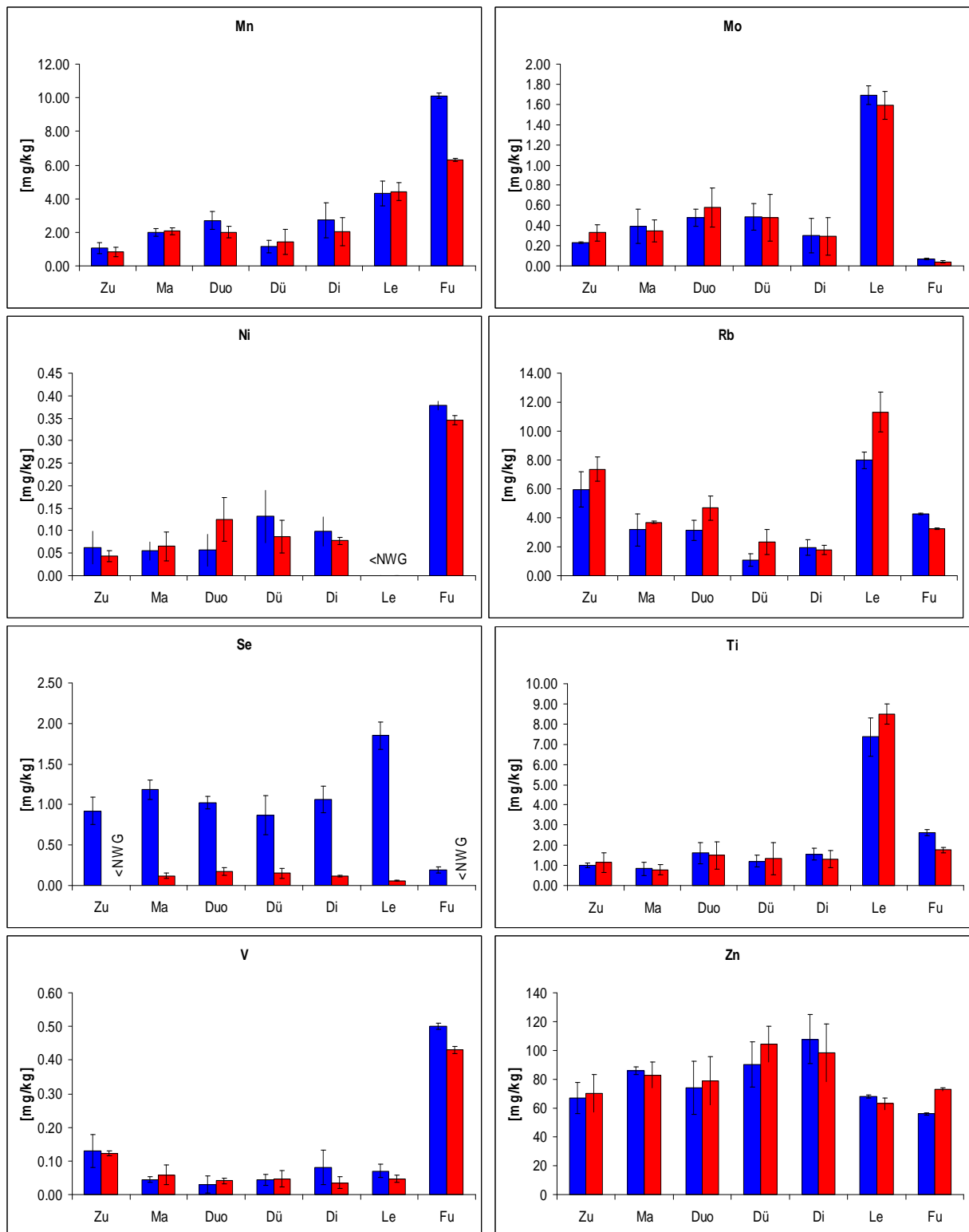


Abb. 19-32 Diagramme der Durchschnittswerte (Anzahl n = 7, bzw. n = 3) der Konzentrationen von Arsen, Cadmium, Kobalt, Cäsium, Kupfer, Eisen, Mangan, Molybdän, Nickel, Rubidium, Selen, Titan, Vanadium und Zink in Zu-Zunge, Ma-Magen, Duo-Duodenum, Dü-Dünndarm, Di-Dickdarm, Le-Leber, Fu-Futter selenadäquat (blau) und selenmangelernährter (rot) Tiere.

As75			Cd112		
Probe	Elementkonzentration [mg/kg]		Probe	Elementkonzentration [mg/kg]	
	Se+	Se-		Se+	Se-
Zu	0.37 ± 0.15	0.33 ± 0.10	Zu	0.04 ± 0.02	0.06 ± 0.05
Ma	0.28 ± 0.06	0.26 ± 0.08	Ma	0.08 ± 0.03	0.07 ± 0.01
Duo	0.32 ± 0.12	0.27 ± 0.09	Duo	0.60 ± 0.31	0.42 ± 0.16
Dü	0.23 ± 0.06	0.18 ± 0.06	Dü	0.33 ± 0.20	0.27 ± 0.16
Di	0.33 ± 0.12	0.23 ± 0.06	Di	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Le	0.84 ± 0.21	0.57 ± 0.13	Le	0.12 ± 0.04	0.08 ± 0.02
Fu	0.16 ± 0.01	0.14 ± 0.01	Fu	0.45 ± 0.01	1.00 ± 0.02
Co59			Cs133		
Probe	Elementkonzentration [mg/kg]		Probe	Elementkonzentration [mg/kg]	
	Se+	Se-		Se+	Se-
Zu	0.019 ± 0.004	0.017 ± 0.002	Zu	0.064 ± 0.023	0.048 ± 0.014
Ma	0.033 ± 0.007	0.037 ± 0.011	Ma	0.033 ± 0.013	0.031 ± 0.009
Duo	0.043 ± 0.022	0.030 ± 0.012	Duo	0.046 ± 0.013	0.042 ± 0.016
Dü	0.047 ± 0.014	0.038 ± 0.012	Dü	0.018 ± 0.010	0.022 ± 0.009
Di	0.052 ± 0.020	0.043 ± 0.015	Di	0.024 ± 0.013	0.017 ± 0.006
Le	0.055 ± 0.005	0.054 ± 0.009	Le	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001
Fu	0.091 ± 0.003	0.111 ± 0.003	Fu	0.031 ± 0.001	0.032 ± 0.001
Cu65			Fe57		
Probe	Elementkonzentration [mg/kg]		Probe	Elementkonzentration [mg/kg]	
	Se+	Se-		Se+	Se-
Zu	9.91 ± 0.54	10.36 ± 0.41	Zu	139 ± 16	148 ± 12
Ma	8.65 ± 2.10	9.54 ± 1.69	Ma	87 ± 15	120 ± 14
Duo	6.89 ± 0.65	7.45 ± 0.70	Duo	138 ± 22	153 ± 21
Dü	7.08 ± 2.66	6.96 ± 2.86	Dü	68 ± 14	96 ± 39
Di	7.10 ± 0.39	6.21 ± 2.46	Di	148 ± 25	103 ± 21
Le	10.79 ± 0.26	11.72 ± 0.83	Le	581 ± 66	611 ± 26
Fu	11.48 ± 0.31	19.22 ± 0.33	Fu	363 ± 8	362 ± 8
Mn55			Mo98		
Probe	Elementkonzentration [mg/kg]		Probe	Elementkonzentration [mg/kg]	
	Se+	Se-		Se+	Se-
Zu	1.06 ± 0.33	0.85 ± 0.28	Zu	0.23 ± 0.01	0.33 ± 0.08
Ma	1.99 ± 0.24	2.07 ± 0.21	Ma	0.39 ± 0.17	0.35 ± 0.11
Duo	2.71 ± 0.53	2.01 ± 0.35	Duo	0.48 ± 0.09	0.58 ± 0.19
Dü	1.15 ± 0.35	1.44 ± 0.72	Dü	0.49 ± 0.13	0.48 ± 0.23
Di	2.72 ± 1.05	2.02 ± 0.83	Di	0.30 ± 0.17	0.29 ± 0.19
Le	4.30 ± 0.74	4.41 ± 0.53	Le	1.69 ± 0.09	1.59 ± 0.14
Fu	10.12 ± 0.15	6.31 ± 0.08	Fu	0.07 ± 0.01	0.04 ± 0.01
Ni60			Rb85		
Probe	Elementkonzentration [mg/kg]		Probe	Elementkonzentration [mg/kg]	
	Se+	Se-		Se+	Se-
Zu	0.06 ± 0.04	0.04 ± 0.01	Zu	5.97 ± 1.20	7.37 ± 0.82
Ma	0.05 ± 0.02	0.07 ± 0.03	Ma	3.18 ± 1.10	3.70 ± 0.08
Duo	0.06 ± 0.04	0.12 ± 0.05	Duo	3.14 ± 0.69	4.69 ± 0.85
Dü	0.13 ± 0.06	0.09 ± 0.04	Dü	1.08 ± 0.41	2.33 ± 0.88
Di	0.10 ± 0.03	0.08 ± 0.01	Di	1.95 ± 0.53	1.79 ± 0.31
Le	<NWG	<NWG	Le	7.98 ± 0.56	11.32 ± 1.39
Fu	0.38 ± 0.01	0.35 ± 0.01	Fu	4.25 ± 0.06	3.25 ± 0.05

Ti49			Se82		
Probe	Elementkonzentration [mg/kg]		Probe	Elementkonzentration [mg/kg]	
	Se+	Se-		Se+	Se-
Zu	1.01 ± 0.10	1.15 ± 0.49	Zu	0.92 ± 0.17	<NWG
Ma	0.84 ± 0.34	0.79 ± 0.25	Ma	1.18 ± 0.12	0.12 ± 0.04
Duo	1.61 ± 0.52	1.49 ± 0.68	Duo	1.02 ± 0.08	0.18 ± 0.05
Dü	1.20 ± 0.29	1.34 ± 0.80	Dü	0.87 ± 0.24	0.15 ± 0.06
Di	1.56 ± 0.28	1.32 ± 0.42	Di	1.07 ± 0.17	0.11 ± 0.01
Le	7.37 ± 0.95	8.50 ± 0.50	Le	1.85 ± 0.17	0.06 ± 0.01
Fu	2.62 ± 0.15	1.77 ± 0.13	Fu	0.20 ± 0.04	<NWG

V51			Zn66		
Probe	Elementkonzentration [mg/kg]		Probe	Elementkonzentration [mg/kg]	
	Se+	Se-		Se+	Se-
Zu	0.13 ± 0.05	0.12 ± 0.01	Zu	67 ± 11	70 ± 13
Ma	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.03	Ma	86 ± 3	83 ± 9
Duo	0.03 ± 0.03	0.04 ± 0.01	Duo	74 ± 18	79 ± 17
Dü	0.04 ± 0.02	0.05 ± 0.02	Dü	90 ± 16	104 ± 13
Di	0.08 ± 0.05	0.04 ± 0.02	Di	108 ± 17	99 ± 20
Le	0.07 ± 0.02	0.05 ± 0.01	Le	68 ± 1	63 ± 4
Fu	0.50 ± 0.01	0.43 ± 0.01	Fu	56 ± 1	73 ± 1

Tab. 38-51 Die Tabellen geben die Durchschnittswerte (Anzahl n = 7, bzw. n = 3) der Konzentrationen [mg/kg Trockenmasse] von Arsen, Cadmium, Kobalt, Cäsium, Kupfer, Eisen, Mangan, Molybdän, Nickel, Rubidium, Selen, Titan, Vanadium und Zink in Zu-Zunge, Ma-Magen, Duo-Duodenum, Dü-Dünndarm, Di-Dickdarm, Le-Leber, Fu-Futter selenadäquat (Se+) und selenmangelernährter Tiere (Se-) wieder.

Die durch die ICP-MS erhaltenen Konzentrationen für Kobalt, Cäsium, Eisen, Mangan, Rubidium, Selen und Zink korrelieren mit den Werten der INAA innerhalb der Fehlergrenzen. Mit Ausnahme der Zunge kann hier von einer homogenen Verteilung gesprochen werden. Die Konzentration von Kobalt in der Zunge beträgt ca. 0,2 mg/kg für Se(+)- und Se(-)-Ratten. Für die Gehalte an Eisen im Magen gibt es einen schwach signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zwischen Se-adäquat und Se-mangelernährten Tieren, wobei die höhere Konzentration mit 120 mg/kg (Se+) 87 mg/kg) in den Se(-)-Tieren vorliegt.

Der höchste Gehalt an Cäsium konnte in der Zunge (ca. 0,05 mg/kg) detektiert werden. In der Leber als Stoffwechselvergleichsorgan wurde die geringste Konzentration (0,006 mg/kg) an Cäsium nachgewiesen. Wohingegen Rubidium dort in größeren Mengen gefunden wurde, und zwischen Se(+)- und Se(-)-Tieren ein schwach signifikanter Unterschied ($P < 0,05$) existiert (Se(+)) 8 mg/kg, Se(-)) 11 mg/kg). In der Zunge wurde ebenfalls die höchste Konzentration gemessen. Der Gehalt in den Se(+)-Tieren beträgt 6 mg/kg und in den Se(-)-Tieren 7 mg/kg. Die vergleichsweise höchste Konzentration an Eisen ist in der Leber beider Gruppen zu finden. Die Konzentrationen dort sind mit ca. 600 mg/kg höher als in den untersuchten Futterproben. Mangan ist ebenfalls in der Leber am höchsten konzentriert. Die niedrigsten Mangangehalte konnten in der Zunge mit ca. 1 mg/kg bestimmt werden. Die Konzentrationen von Selen lagen beim Selenmangelfutter sowie in der Zunge der Tiere, die mit diesem Futter ernährt wurden, für die ICP-MS unterhalb der Nachweisgrenze. Für alle Gewebe wurden hoch signifikante ($P < 0,001$) Unterschiede zwischen Se(+)- und Se(-)-Tieren bestimmt. Der Selenanteil war in der Leber der selenadäquat ernährten Tiere am höchsten (1,85 mg/kg). In den Geweben der selenadäquat ernährten Tiere wurde ein Selengehalt von ca. 1 mg/kg bestimmt. Der Gehalt an Selen konnte mittels ICP-MS für das Se(+)-Futter mit 0,20 mg/kg, entgegen der Herstellerangabe von 0,30 mg/kg Selen, bestimmt werden.

Die Verteilung von Arsen in den Geweben des gastrointestinalen Trakts ist homogen. Die Arsenkonzentrationen in den Geweben Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm

betragen ca. 0,3 mg/kg. In der Leber konnten Konzentrationen von über 0,60 mg/kg bestimmt werden. Der Gehalt an Arsen im Futter beträgt ca. 0,15 mg/kg. Besonders auffällig bei den Gehalten an Cadmium ist, dass es im Duodenum und Dünndarm in sehr hohen Konzentrationen auftritt. So liegt der Gehalt im Duodenum im Durchschnitt der beiden Gruppen bei ca. 0,50 mg/kg und im Dünndarm bei 0,30 mg/kg. Im Se(-)-Futter ist der Gehalt an Cadmium 1 mg/kg und somit doppelt so hoch wie im Se(+)-Futter (0,45 mg/kg). Kupfer ist mit ca. 10 mg/kg fast gleichmäßig auf alle untersuchten Gewebe verteilt. Molybdän weist im Futter Konzentrationen von unter 0,10 mg/kg auf. Im Duodenum und Dünndarm konnten mit 0,50 mg/kg die höchsten Konzentrationen im Verdauungstrakt bestimmt werden. Mit einer Konzentration von 1,60 mg/kg liegt in der Leber die höchste Konzentration der untersuchten Gewebe vor. Nickel konnte mittels ICP-MS in der Leber nicht bestimmt werden. Dort lagen die Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenzen. In den übrigen Geweben ließ sich Nickel mit Konzentrationen von 0,05 mg/kg bis 0,10 mg/kg bestimmen. Für Titan zeichnet sich ein ähnliches Bild wie für Molybdän. Während für die Gewebe des Verdauungstraktes Konzentrationen von ca. 1 mg/kg bestimmt wurden, lagen die Konzentrationen in der Leber bei ca. 8 mg/kg. Im Unterschied zu Molybdän beträgt die Konzentration von Titan im Futter etwa 2 mg/kg. Vanadium konnte in der Zunge mit ca. 0,10 mg/kg quantifiziert werden. Im Futter tritt Vanadium mit Gehalten von 0,50 mg/kg auf. Das Spurenelement Zink konnte in den höchsten Konzentrationen im Dünndarm und Dickdarm mit ca. 100 mg/kg bestimmt werden. Die geringste Konzentration findet man in der Zunge mit ca. 70 mg/kg. Die erhaltenen Werte für die Gehalte der Spurenelemente in der Leber korrelieren mit denen die Takahashi *et al* bestimmen konnten [82].

HT29	
Element	Elementkonzentration [mg/kg]
As75	0.61 ± 0.08
Cd112	1.71 ± 0.05
Co59	0.035 ± 0.006
Cs133	0.76 ± 0.01
Cu65	<NWG
Fe57	46 ± 9
Mn55	3.95 ± 0.03
Mo98	0.65 ± 0.04
Ni60	0.70 ± 0.15
Rb85	1.20 ± 0.03
Ti49	19.50 ± 11.50
Se82	0.52 ± 0.26
V51	1.14 ± 0.09
Zn66	72 ± 2

Tab. 52 Diese Tabelle gibt die Durchschnittswerte der Konzentrationen [mg/kg Trockenmasse] von Arsen, Cadmium, Kobalt, Cäsium, Kupfer, Eisen, Mangan, Molybdän, Nickel, Rubidium, Selen, Titan, Vanadium und Zink der humanen Karzenomzelllinie HT29 wieder.

Bei der Bestimmung von Titan konnte zwar eine sehr hohe Konzentration (19,5 mg/kg) in der humanen Karzenomdickdarmzelllinie HT29 festgestellt werden, jedoch ist diese mit einer großen Standardabweichung verbunden. Der Gesamtgehalt an Kupfer lag unterhalb der Nachweisgrenze und ließ sich mittels ICP-MS nicht bestimmen. Die höchste Konzentration der Spurenelemente, die in der Zelllinie untersucht wurden, liegt bei Zink mit 72 mg/kg noch vor dem Eisen mit 46 mg/kg vor. Ein weiteres mit hohen Konzentrationen auftretendes Element ist Mangan.

Mangan wurde mit einem Gehalt von 3,95 mg/kg nachgewiesen. Die geringste Konzentration, die mittels ICP-MS gemessen werden konnte, ist mit 0,035 mg/kg das Kobalt.

4.1.3 GF-AAS

4.1.3.1 Methodenentwicklung

Die Graphitrohr-Atom-Absorptionsspektrometrie ist eine Einzelementmethode. Da aber jedes Element in einer Vielzahl chemischer Verbindungen vorkommen kann, die sich in ihren physikalischen Eigenschaften und damit auch in ihrer Flüchtigkeit oft stark unterscheiden, hängt die Pyrolyse von der jeweiligen Elementspezies ab. Welche Spezies in einer Analysenprobe vorliegt oder während der Pyrolyse gebildet wird, hängt von den Begleitsubstanzen ab und ist häufig unbekannt. Die Auswahl des Modifiers und die Kenntnis über die ideale Pyrolyse- und Atomisierungstemperatur sind vor allem im Bereich der Nachweis- oder Bestimmungsgrenzen unbedingt erforderlich. Der Modifier hilft, den Analyten bei der Pyrolyse thermisch zu stabilisieren, und führt dazu, dass die Pyrolysetemperatur erhöht werden kann, ohne dass es zu einem Verlust des Analyten kommt. Demzufolge ist eine bessere Matrixabtrennung vom Analyten möglich. Die Methodenentwicklung erfolgte durch den Einsatz der Standardreferenzmaterialien Bovine Liver 1577b (National Institute of Standards & Technology NIST) und Horse Kidney H-8 (International Atomic Energy Agency IAEA). Mit matrixfreien, wässrigen Bezugslösungen ist nämlich keinesfalls sichergestellt, dass sich die Analytspezies, die sich in der Analysenprobe befindet, ähnlich verhält. Die Pyrolyse- bzw. Atomisierungskurven werden für die Elemente Arsen, Cadmium, Chrom, Kupfer, Mangan, Molybdän, Nickel und Selen in Abbildung 33-40 wiedergegeben.

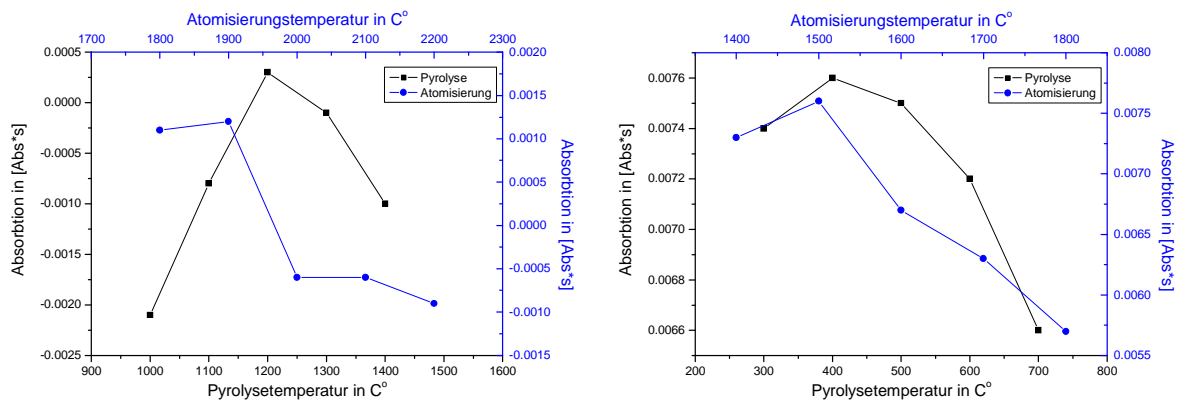


Abb. 33-34 Pyrolyse- und Atomisierungskurve von Arsen und Cadmium in Bovine Liver 1577b

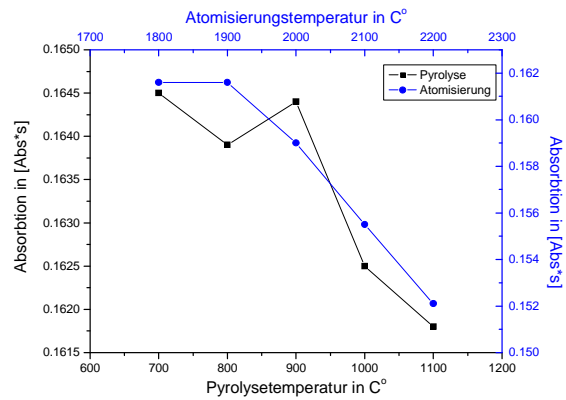
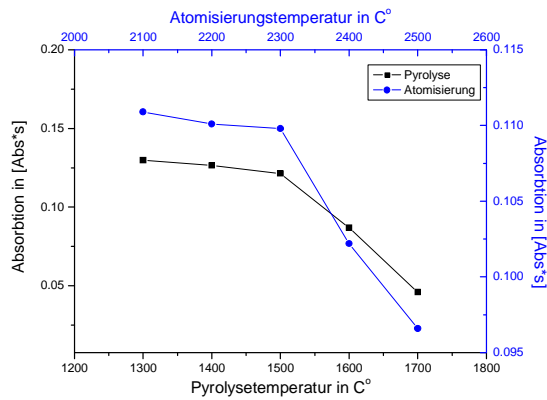


Abb. 35-36 Pyrolyse- und Atomisierungskurve von Chrom und Kupfer in Horse Kidney H-8

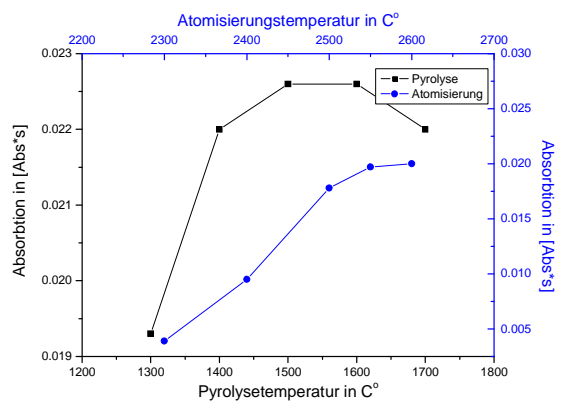
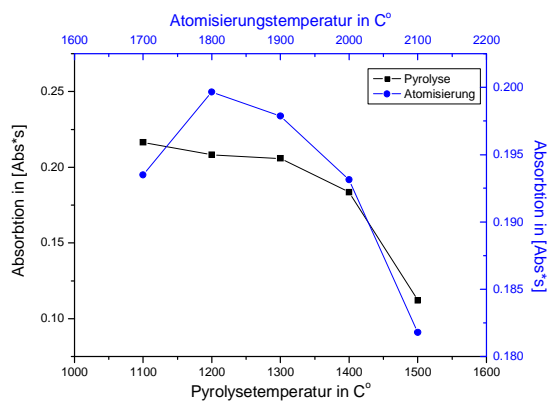


Abb. 37-38 Pyrolyse- und Atomisierungskurven von Mangan und Molybdän in Horse Kidney H-8

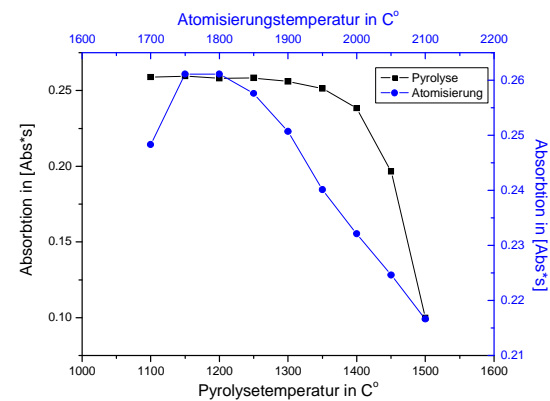
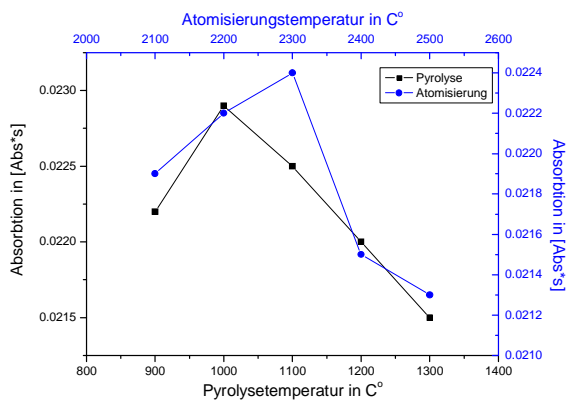


Abb. 39-40 Pyrolyse- und Atomisierungskurven von Nickel und Selen in Horse Kidney H-8

Die aus den Kurven hervorgegangenen optimalen Pyrolyse- bzw. Atomisierungstemperaturen sind für Arsen 1200°C/1900°C. Für Cadmium wurden als Standardtemperatur bei der Veraschung der Probe 400°C und als Atomisierungstemperatur 1500°C gewählt. Die optimalen Temperaturen lagen für: Chrom bei 1500°C/2300°C, Kupfer bei 900°C/1900°C, Mangan bei 1300°C/1800°C, Nickel bei 1000°C/2300°C und Selen bei 1300°C/1800°C. Mit steigender Atomisierungstemperatur wurden auch höhere Absorptionswerte für Molybdän bis zur gerätespezifischen Maximaltemperatur von 2600°C erhalten. Die Lebensdauer der Graphitrohre ist unter anderem von der verwendeten Atomisierungstemperatur abhängig. Aus diesem Grund wurde für Molybdän eine Atomisierungstemperatur von 2450°C verwendet. In Tabelle 53 sind die Parameter für die untersuchten Elemente wiedergegeben.

	Strahlungsquelle	Wellenlänge [nm]	Modifizier	Pyrolysetemperatur [°C]	Atomisierungstemp. [°C]
Arsen	EDL (400mA)	193.7	Pd(NO ₃) ₂ -Mg(NO ₃) ₂	1200	1900
Cadmium	EDL (230mA)	228.8	Pd(NO ₃) ₂ -Mg(NO ₃) ₂	400	1500
Chrom	HKL (25mA)	357.9	Mg(NO ₃) ₂	1500	2300
Kupfer	HKL (15mA)	324.8	Pd(NO ₃) ₂ -Mg(NO ₃) ₂	900	1900
Mangan	HKL (20mA)	279.5	Pd(NO ₃) ₂ -Mg(NO ₃) ₂	1300	1800
Molybdän	HKL (30mA)	313.3	-	1600	2450
Nickel	HKL (25mA)	232.0	-	1000	2300
Selen	EDL (280mA)	196.0	Pd(NO ₃) ₂ -Mg(NO ₃) ₂	1300	1800

Tab. 53 Messparameter der GF-AAS (EDL = elektrodenlose Entladungslampe, HKL = Hohlkathodenlampe)

Aufgrund der sich wiederholenden Aufheizschritte während einer Messreihe und dem damit verbundenen Verschleiß des Graphitrohrs ist die Präzision äußerst wichtig. Sie wurde durch 125 hintereinander folgende Messungen eines wässrigen Multielementstandards in 10 % HNO₃, da in Aufschlusslösungen Säurekonzentrationen von bis zu 20 % möglich sind, sowie mit einer 1 % HNO₃ als Blindlösung überprüft, wobei im Wechsel Elementstandard- und Blindlösung gemessen wurde. Mögliche Verschleppungseffekte sollten dadurch erkennbar werden.

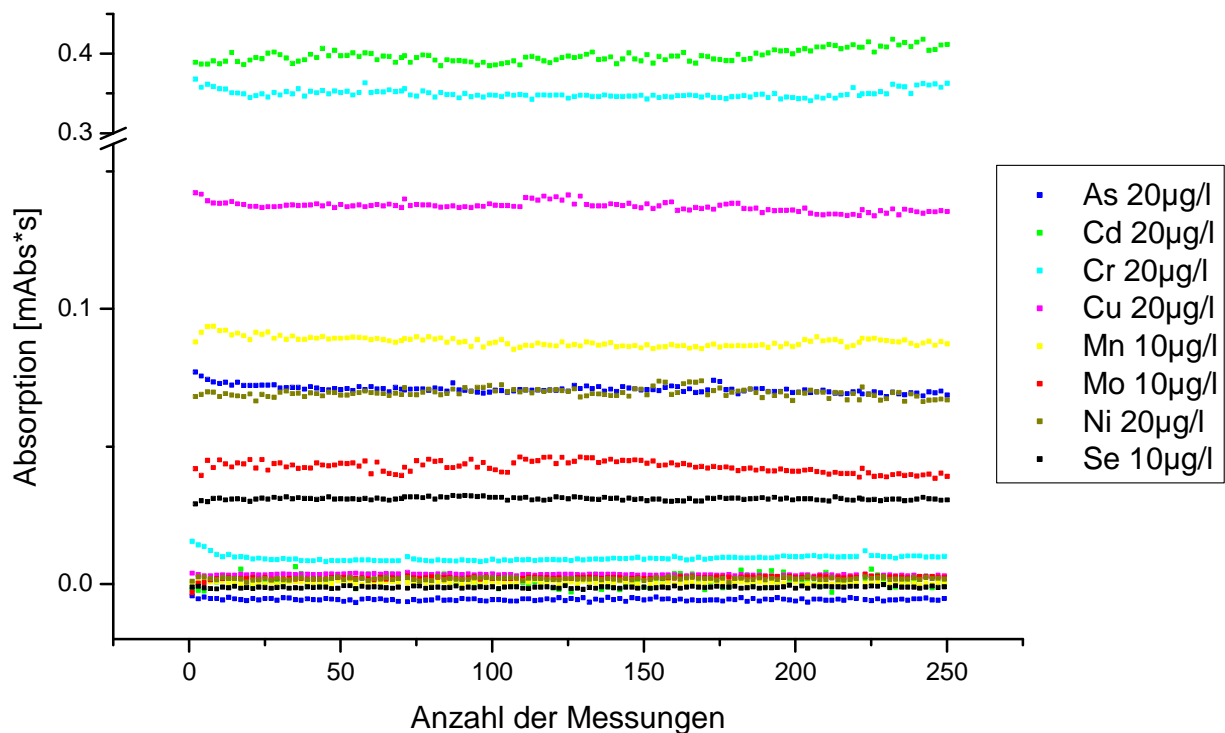


Abb. 41 Präzision von Arsen, Cadmium, Chrom, Kupfer, Mangan, Molybdän, Nickel, Selen in Multielementstandards mit 10 % HNO₃ und einer 1 % HNO₃-Blindlösung

Element	Strd [Abs*s]	[RSD%]	Blank [Abs*s]	[RSD%]
As	0.0709	± 1.9	0.0056	± 7.4
Cd	0.3976	± 2.0	0.0012	± 165
Cr	0.3499	± 1.5	0.0011	± 11.4
Cu	0.1376	± 1.2	0.0034	± 10.4
Mn	0.0882	± 1.9	0.0005	± 73.9
Mo	0.0427	± 4.7	0.0022	± 27.8
Ni	0.0695	± 2.2	0.0019	± 20.0
Se	0.0310	± 1.6	0.0011	± 27.1

Tab. 54 Absorption der Präzisionsmessung der Multielementstandards in 10 % HNO₃ sowie der 1 % HNO₃ Blindlösung und deren relative Standardabweichung

Die in Abbildung 41 gezeigten Präzisionen der Langzeitmessungen zeigen selbst für hoch siedende Elemente wie Molybdän, Chrom und Nickel keine Verschleppungseffekte. Auch die relativen Standardabweichungen für die Absorptionswerte dieser Messungen liegen, mit Ausnahme für Molybdän, bei bis zu 2 %.

4.1.3.2 Konzentrationsbestimmung mittels GF-AAS

Die Konzentrationsbestimmung mittels GF-AAS erfolgte zur Validierung der erhaltenen Werte der INAA und ICP-MS für die Gewebe des Gastrointestinaltraktes. Hierfür wurden jeweils drei Tiere mit Selenadäquat- oder Selenmangelernährung untersucht. Des Weiteren wurde der Gehalt an Nickel in der Leber von jeweils drei Tieren beider Gruppen bestimmt. Die humane Karzenomdickdarmzelllinie wurde auf Kupfer mittels GF-AAS untersucht. Die Abbildungen 42-49 zeigen die Elementgehalte von Arsen, Cadmium, Chrom, Kupfer, Mangan, Molybdän, Nickel und Arsen. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 55-62 wiedergegeben.

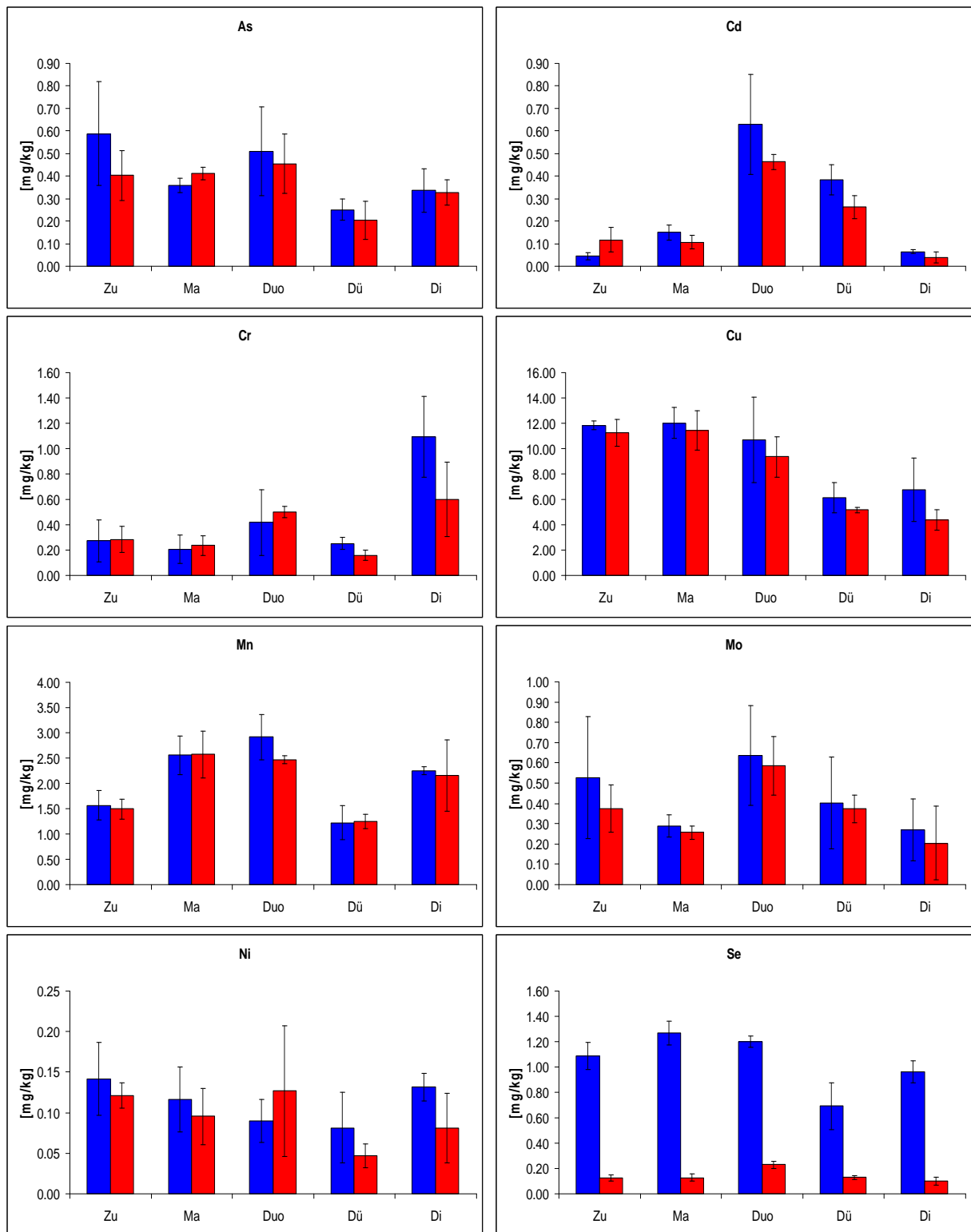


Abb. 42-49 Diagramme der Durchschnittswerte (Anzahl n = 3) der Konzentrationen von Arsen, Cadmium, Kobalt, Chrom, Kupfer, Mangan, Molybdän, Nickel und Selen in Zu-Zunge, Ma-Magen, Duo-Duodenum, Dü-Dünndarm, Di-Dickdarm selenadäquat (blau) und selenmangelnährter (rot) Tiere.

As			Cd		
Probe	Elementkonzentration [mg/kg]		Probe	Elementkonzentration [mg/kg]	
	Se+	Se-		Se+	Se-
Zu	0.59 ± 0.23	0.40 ± 0.11	Zu	0.04 ± 0.02	0.12 ± 0.05
Ma	0.36 ± 0.03	0.41 ± 0.03	Ma	0.15 ± 0.03	0.11 ± 0.03
Duo	0.51 ± 0.20	0.45 ± 0.13	Duo	0.63 ± 0.22	0.46 ± 0.03
Dü	0.25 ± 0.05	0.20 ± 0.08	Dü	0.38 ± 0.07	0.26 ± 0.05
Di	0.34 ± 0.10	0.33 ± 0.06	Di	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.03

Cr			Cu		
Probe	Elementkonzentration [mg/kg]		Probe	Elementkonzentration [mg/kg]	
	Se+	Se-		Se+	Se-
Zu	0.27 ± 0.17	0.28 ± 0.10	Zu	11.83 ± 0.35	11.24 ± 1.07
Ma	0.21 ± 0.11	0.24 ± 0.08	Ma	12.02 ± 1.20	11.43 ± 1.58
Duo	0.42 ± 0.26	0.50 ± 0.05	Duo	10.70 ± 3.36	9.35 ± 1.58
Dü	0.25 ± 0.05	0.16 ± 0.04	Dü	6.12 ± 1.17	5.16 ± 0.24
Di	1.09 ± 0.32	0.60 ± 0.29	Di	6.74 ± 2.51	4.35 ± 0.82

Mn			Mo		
Probe	Elementkonzentration [mg/kg]		Probe	Elementkonzentration [mg/kg]	
	Se+	Se-		Se+	Se-
Zu	1.57 ± 0.29	1.49 ± 0.19	Zu	0.53 ± 0.30	0.37 ± 0.12
Ma	2.56 ± 0.38	2.58 ± 0.46	Ma	0.29 ± 0.06	0.26 ± 0.03
Duo	2.92 ± 0.45	2.47 ± 0.08	Duo	0.64 ± 0.25	0.59 ± 0.15
Dü	1.23 ± 0.33	1.25 ± 0.14	Dü	0.40 ± 0.23	0.37 ± 0.07
Di	2.26 ± 0.08	2.16 ± 0.70	Di	0.27 ± 0.15	0.20 ± 0.18

Ni			Se		
Probe	Elementkonzentration [mg/kg]		Probe	Elementkonzentration [mg/kg]	
	Se+	Se-		Se+	Se-
Zu	0.14 ± 0.05	0.12 ± 0.02	Zu	1.09 ± 0.11	0.12 ± 0.02
Ma	0.12 ± 0.04	0.10 ± 0.03	Ma	1.27 ± 0.09	0.13 ± 0.03
Duo	0.09 ± 0.03	0.13 ± 0.08	Duo	1.20 ± 0.04	0.23 ± 0.03
Dü	0.08 ± 0.04	0.05 ± 0.01	Dü	0.69 ± 0.18	0.13 ± 0.02
Di	0.13 ± 0.02	0.08 ± 0.04	Di	0.96 ± 0.09	0.10 ± 0.03

Tab. 55-62 Die Tabellen geben die Durchschnittswerte (n = 3) der Konzentrationen [mg/kg Trockenmasse] von Arsen, Cadmium, Kobalt, Chrom, Kupfer, Mangan, Molybdän, Nickel und Selen in Zu-Zunge, Ma-Magen, Duo-Duodenum, Dü-Dünndarm, Di-Dickdarm selenadäquat (Se+) und selenmangelernährter (Se-) Tiere wieder.

Der Gehalt an Arsen in den untersuchten Geweben beträgt zwischen 0,2 mg/kg für den Dünndarm Se(-) bis ca. 0,6 mg/kg in der Zunge Se(+). Innerhalb der Standardabweichung ist Arsen homogen in Geweben verteilt und korreliert mit den durch die ICP-MS erhaltenen Werten. Cadmium konnte in seinen höchsten Konzentrationen im Duodenum und im Dünndarm beider Gruppen bestimmt werden. Im Vergleich zu den übrigen Organen ist der Gehalt im Duodenum ca. 3- und im Dünndarm ca. 2-mal so hoch. Dieses Verhältnis entspricht dem, welches mittels ICP-MS ermittelt wurde. Chrom konnte mit seinen höchsten Gehalten im Dickdarm detektiert werden. Vor allem im Dickdarm der Se(+)-Tiere erschien die höchste Konzentration von 1.09 mg/kg. Dieses ist ein 2- bis 3-mal höherer Wert als in den restlichen Geweben. Ähnliche Werte wurden durch die Untersuchung mittels INAA erhalten und stimmen bei Einbeziehung der Standardabweichung gut überein. Die höchsten Gehalte von Kupfer wurden in der Zunge (ca. 11 mg/kg), dem Magen (ca. 12 mg/kg) und dem Duodenum (ca. 10 mg/kg) bestimmt. Die mittels der GF-AAS gemessenen Kupferkonzentrationen korrelieren mit den Ergebnissen der ICP-MS innerhalb der Standardabweichung. Die Mangankonzentrationen können in den Geweben des Verdauungstraktes als nicht homogen verteilt angesehen werden. So sind die niedrigsten

Konzentrationen von Mangan in der Zunge bzw. im Dünndarm zu finden. Dieses Verteilungsprofil zeigt sich auch bei der INAA und ICP-MS. Die ermittelten Messdaten entsprechen den mittels INAA und ICP-MS erhaltenen Werten. Die höchste Molybdänkonzentration weist das Duodenum mit ca. 0,60 mg/kg auf. Der niedrigste Gehalt wurde im Dickdarm (ca. 0,25 mg/kg) gemessen. Bei der Bestimmung der Gehalte für Nickel zeigte sich, dass dieses Spurenelement gleichmäßig in den Organen des Verdauungstraktes verteilt ist und Konzentrationen von ca. 0,10 mg/kg aufweist. Für Selen zeigten sich bei der Bestimmung mittels GF-AAS hoch signifikante Unterschiede ($P < 0,001$) zwischen den Tieren, die mit unterschiedlicher Selenkonzentration gefüttert wurden. Lediglich ein signifikanter Unterschied ($P < 0,01$) zwischen Se(+)- und Se(-)-Ratten konnte für den Dünndarm ermittelt werden. Die größte Menge an Selen wurde im Magen der Se(+)-Tiere (1,27 mg/kg) und die geringste im Dickdarm der Se(-)-Tiere (0,1 mg/kg) ermittelt. Der Gehalt an Nickel in der Leber von Se(+)- und Se(-)-Tieren, der bei der Messung mittels ICP-MS unterhalb der Nachweisgrenze lag, wurde durch Bestimmung mit der GF-AAS auf $0,05 \pm 0,04$ mg/kg für die Se(+)- und $0,03 \pm 0,02$ mg/kg für die Se(-)-Tiere ermittelt. Für die humane Karzenomdickdarmzelllinie HT29 wurde eine Konzentration für Kupfer von $6,01 \pm 0,13$ mg/kg detektiert.

4.2 Zusammenfassung

Mit Hilfe der INAA, ICP-MS und GF-AAS wurden Untersuchungen durchgeführt, die die Gehalte in den Geweben des gastrointestinalen Traktes sowie der Leber als Stoffwechselvergleichsorgan bestimmen. Des Weiteren wurde in den subzellulären Kompartimenten die Spurenelementverteilung quantitativ und qualitativ untersucht. Die Gesamtgehaltsbestimmung wurde für die Organe Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss des Selenstatus der Versuchstiere auf andere Spurenelemente untersucht. Die Resultate der Untersuchungen mit den drei Methoden variieren von Methode zu Methode ein wenig, stimmen aber innerhalb der Standardabweichungen überein. Diese Unterschiede können zum Teil durch die unterschiedliche Probenvorbereitung bzw. den Zustand, wie die Probe der Analyse zugeführt wird, zustande kommen. Für die INAA wird die zu untersuchende Probe lediglich lyophilisiert, während für die Messungen mit der ICP-MS und GF-AAS die Probe mittels Mikrowellendruckaufschluss weiter vorzubereiten ist. Mit der INAA konnten die Konzentrationen der Spurenelemente Kobalt, Chrom, Cäsium, Eisen, Mangan, Rubidium, Selen und Zink bestimmt werden. Mittels ICP-MS ließen sich zusätzlich die Elemente Arsen, Cadmium, Kupfer, Molybdän, Nickel, Titan und Vanadium ermitteln. Der Einsatz der GF-AAS diente zur Validierung der Gehalte, die entweder mittels INAA oder ICP-MS bestimmt wurden. Der Selenstatus konnte durch alle drei Methoden gut nachgewiesen werden. So lag die Selenkonzentration in den Geweben des Verdauungstraktes bei ca. 1 mg/kg für die selenadäquat ernährten Tiere, während in den selenmangelernährten Tieren die Konzentration durchschnittlich 0,15 mg/kg betrug. In der Leber der Se(+)-Tiere konnte die höchste Konzentration (1,85 mg/kg) bestimmt werden. Damit liegt der Selengehalt um etwa eine Größenordnung in den Se(+)-Tieren höher als in den Se(-)-Tieren. Zwischen diesen beiden Gruppen konnten hoch signifikante Unterschiede gezeigt werden. In der Zunge der Se(-)-Tiere sowie im Selenmangelfutter lag die Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze für die ICP-MS. Der Selengehalt des Se(+)-Futters betrug 0,20 mg/kg.

Beim Gesamtgehalt von Arsen konnte eine homogene Verteilung über die Gewebe des Verdauungstraktes beobachtet werden. Im Vergleichsorgan, der Leber, lag der Gehalt an Arsen am höchsten. Die Konzentration von Arsen im Futter betrug 0,15 mg/kg.

Die höchsten Gehalte an Cadmium wurden im Duodenum und Dünndarm bestimmt. Dort lagen die Konzentrationen bei 0,50 mg/kg bzw. 0,30 mg/kg. Die Cadmiumkonzentration im Futter unterschied sich erheblich. So konnte im Se(-)-Futter mehr Cadmium detektiert werden als im Se(+)-Futter.

Die mittels ICP-MS erhaltenen Werte für Kobalt zeigen, dass Kobalt in den untersuchten Geweben mit Ausnahme der Zunge gleichmäßig verteilt ist. In der Zunge liegen die geringsten Konzentrationen mit ca. 0,20 mg/kg vor.

Cäsium ist inhomogen in den Geweben des Gastrointestinaltraktes verteilt. Die höchste Konzentration konnte in der Zunge (0,06 mg/kg für Se(+)- und 0,05 mg/kg für Se(-)-Ratten) bestimmt werden. In der Leber ließ sich Cäsium nur in sehr geringen Mengen (0,006 mg/kg) nachweisen.

Rubidium hingegen ist gerade in der Leber am meisten vertreten. Dort konnte ein schwach signifikanter Unterschied von Rubidium zwischen den Se(+)- (7,98 mg/kg) und Se(-)-Ratten (11,32 mg/kg) bestimmt werden. Im Verdauungstrakt ist Rubidium, ähnlich wie Cäsium, in der Zunge am höchsten konzentriert.

Ein schwach signifikanter Unterschied konnte im Magen für Eisen gezeigt werden. In den Se(+)-Tieren lag dort die Konzentration bei 87 mg/kg, während sich in den Se(-)-Tieren eine Konzentration von 120 mg/kg bestimmen ließ. Im Fall von Eisen scheint der Selenstatus Einfluss auf die Konzentration zu haben: Die vergleichsweise höchsten Gehalte an Eisen konnten in der Leber (ca. 600 mg/kg) bestimmt werden und sind vergleichbar mit den Literaturwerten [83].

Die Verteilung von Mangan in den Geweben ist inhomogen. Die höchste Konzentration war in der Leber (4,3 mg/kg) zu finden. Die geringsten Werte sind in der Zunge (ca. 0,5 mg/kg) und dem Duodenum (0,6 mg/kg) zu beobachten.

Eine nahezu homogene Verteilung zeigte sich für Zink. Die Gehalte für Zink lagen zwischen 70 mg/kg und 100 mg/kg.

Vor allem im Dickdarm der Se(+)-Tiere konnte die höchste Konzentration an Chrom bestimmt werden. Sie beträgt 1,09 mg/kg. Aufgrund der hohen Standardabweichung ließ sich jedoch keine Signifikanz zwischen Se(+)-Tieren und Se(-)-Tieren feststellen.

Die Kupferkonzentrationen lagen im Dünndarm und im Dickdarm in den geringsten Mengen vor.

Die höchsten Molybdänkonzentrationen weisen Duodenum und Dünndarm mit ca. 0,5 mg/kg auf, während im Futter Molybdänkonzentrationen von 0,1 mg/kg gefunden wurden. Im Vergleichsorgan, der Leber, erbrachte der Nachweis 1,6 mg/kg.

Ein ähnliches Profil wie bei Molybdän zeigte sich auch für Titan. Während in den Geweben des Verdauungstraktes die Konzentrationen bei ca. 1 mg/kg lagen, konnte der Gehalt in der Leber auf 8 mg/kg bestimmt werden.

Bei der Bestimmung von Nickel konnte gezeigt werden, dass dieses Spurenelement gleichmäßig in den Organen des gastrointestinalen Traktes verteilt ist.

Die höchste Konzentration (0,1 mg/kg) wurde für Vanadium in der Zunge detektiert.

Die humane Karzenomdickdarmzelllinie HT29 wies eine sehr hohe Konzentration von Titan (19,5 mg/kg) auf, jedoch ist diese mit einer großen Standardabweichung verbunden. Das Spurenelement mit der höchsten Konzentration war Zink (72 mg/kg) noch vor Eisen (46 mg/kg) in der Zelllinie. Das Element mit der geringsten Konzentration war das Kobalt (0,035 mg/kg).

Wie aus den Gesamtgehalten für Selen in den Geweben des Gastrointestinaltraktes zu erwarten war, konnte Selen auch in den subzellulären Fraktionen dieser Gewebe mit signifikantem Unterschied gezeigt werden.

Der schwach signifikante Unterschied, der in den Gesamtkonzentrationen für Eisen bestimmt wurde, konnte auf subzellulärer Ebene nur für den Magen in den Fraktionen Nuklei, Mitochondrien und Mikrosomen gezeigt werden. Der höchste Gehalt an Eisen fand sich in allen Geweben in der mikrosomalen Fraktion.

Die Alkalienelemente Rubidium und Cäsium konnten fast ausschließlich im Zytosol der Gewebe gezeigt werden.

Eine homogene Verteilung in den subzellulären Fraktionen wies Zink in der Zunge und im Dickdarm auf. Im Magen, Duodenum und Dünndarm hingegen finden sich die geringsten Konzentrationen im Zytosol beider Populationen.

Für die Verteilung der Elemente Kobalt, Chrom, Mangan, Vanadium, Nickel, Kupfer, Arsen, Molybdän und Cadmium konnten keine subzellulären Kompartimente zugeordnet werden, in denen sie, innerhalb der Populationen oder Fraktionen, besonders hohe oder niedrigere Konzentrationen aufweisen.

4.3 Speziationsanalyse

Die Analyse von Elementen getrennt nach ihren chemischen oder physikalischen Bindungsformen wird als Speziationsanalyse bezeichnet [84]. Dabei wird ein Trennverfahren mit einem Verfahren zur Elementanalytik kombiniert. Als Trennverfahren wurde in dieser Arbeit die Größenausschlusschromatographie verwendet. Die Elementanalytik muss entsprechend nachweisstark sein, da sich der Gesamtgehalt der Probe auf verschiedene Spezies verteilt und die Konzentrationen in der Probenlösung durch Verdünnung mit dem Eluens der Säule zusätzlich herabgesetzt wird. Hierfür eignet sich die ICP-MS hervorragend, da sie neben ihrer Multielementtauglichkeit einen großen linearen Messbereich aufweist [85].

Mit den bisher beschriebenen Methoden konnten die Spurenelementgehalte im gesamten Gewebe bzw. in den subzellulären Fraktionen bestimmt werden. Ob diese Elemente proteingebunden oder ionisch in Lösung vorlagen, konnte damit aber nicht gezeigt werden. Einige Elemente, wie beispielsweise das Selen, liegen unter anderem in großen Anteilen proteingebunden vor [86]. Durch die Größenausschlusschromatographie mit Kopplung an die ICP-MS ist es möglich, Informationen darüber zu erhalten, ob die untersuchten Elemente in den zytosolischen Fraktionen an Proteine gebunden sind [87].

4.3.1 Detektion spurenelementhaltiger Proteine mittels SEC-ICP-MS

Der Aufbau der HPLC(SEC)-ICP-MS ist schematisch in Abbildung 50 wiedergegeben.

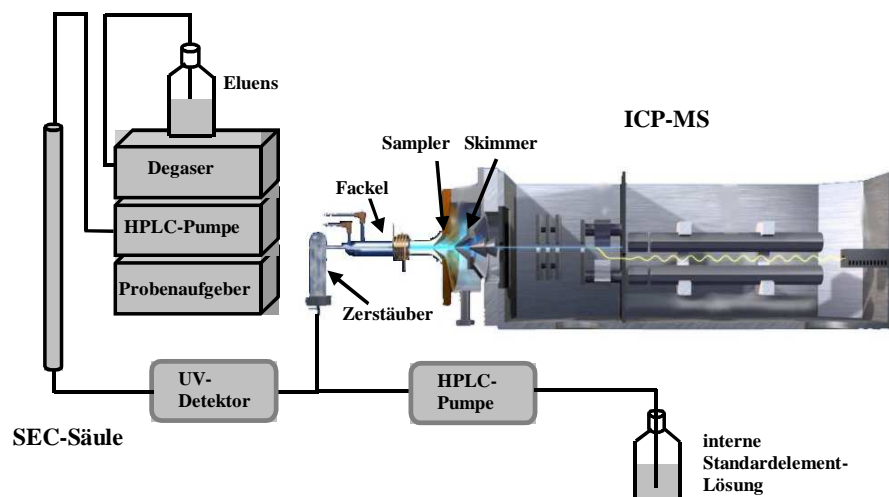


Abb. 50: Schematischer Aufbau der HPLC-ICP-MS-Kopplung

Die Probenaufgabe erfolgte mittels Autosampler der HPLC-Anlage. Der Autosampler wurde auf 4°C gekühlt. Nach der chromatographischen Säule wird eine interne Standardelementlösung über ein T-Stück, zur späteren Korrektur von Matrix- oder Drifteffekten, zugefördert. Die zu untersuchenden Zytosole von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren sowie der humanen Karzenomdickdarmzelllinie wurden durch Homogenisierung und nachfolgende Ultrazentrifugation bei 100000 x g (4°C, 80 min) gewonnen. Anschließend wurden sie auf die Elemente Arsen, Cadmium, Kobalt, Cäsium, Kupfer, Eisen, Mangan, Molybdän, Nickel, Rubidium, Titan, Selen, Vanadium und Zink analysiert.

Zur Abschätzung der molekularen Massen wurde die Säule mit einem Satz geeigneter Proteine kalibriert, die in Tabelle 63 zusammengestellt sind. Bei der Säulenkalibrierung wird die Retentionszeit gegen den Logarithmus der molekularen Masse der Proteine aufgetragen. Die Säulenkalibrierung zeigt Abbildung 51.

Protein	Molmasse [kDa]	Retentionszeit [s]	Log Molmasse
Dinitrophenyl-L-Alanin	0.255	3124.16	2.40654018
Vitamin B-12	1.335	1247.84	3.12548127
Aprotinin	6.5	1281.8	3.81291336
Ribonuclease A	13.7	1059.02	4.13672057
Trypsininhibitor	20.1	880.16	4.30319606
Chymotrypsinogen A	25	1057.64	4.39794001
Ovalbumin	43	789.92	4.63346846
Catalase	57.586	733.7	4.76031691
BSA	67	651.26	4.8260748
Dextranblau	2000	650.66	6.30103

Tab. 63: Zur Säulenkalibrierung verwendete Proteine mit nahezu kugelförmiger Geometrie sowie deren Molmassen und Retentionszeiten

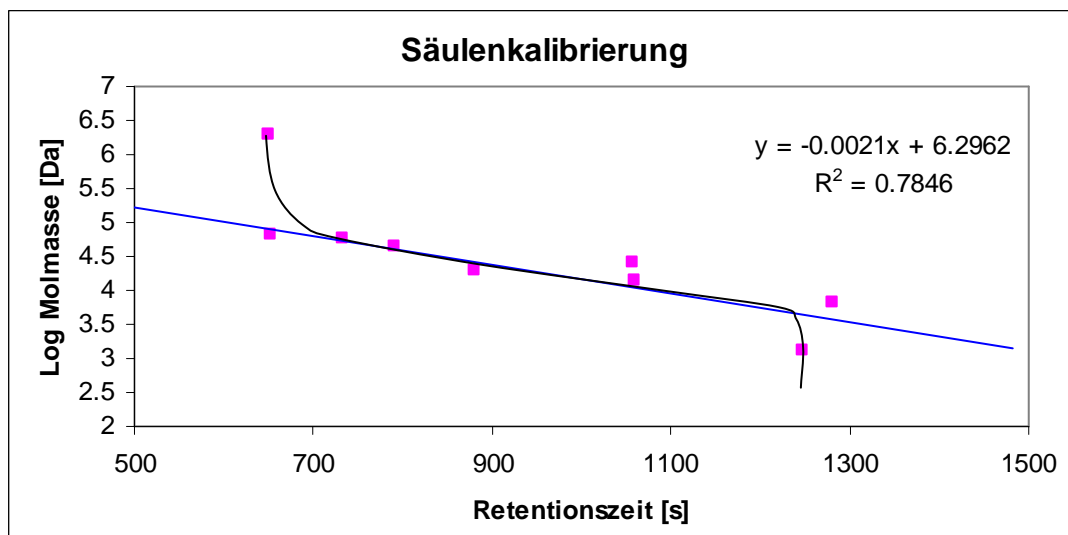


Abb. 51: Säulenkalibrierung mit den in Tabelle 3 aufgelisteten Proteinen

Der Säulenkalibrierung folgend liegt der lineare Trennbereich zwischen 6 und 67 kDa. Aus den erhaltenen Profilen können den Retentionszeiten der Peakmaxima Molekulargewichte zugeordnet werden.

4.3.1.1 Arsen im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren

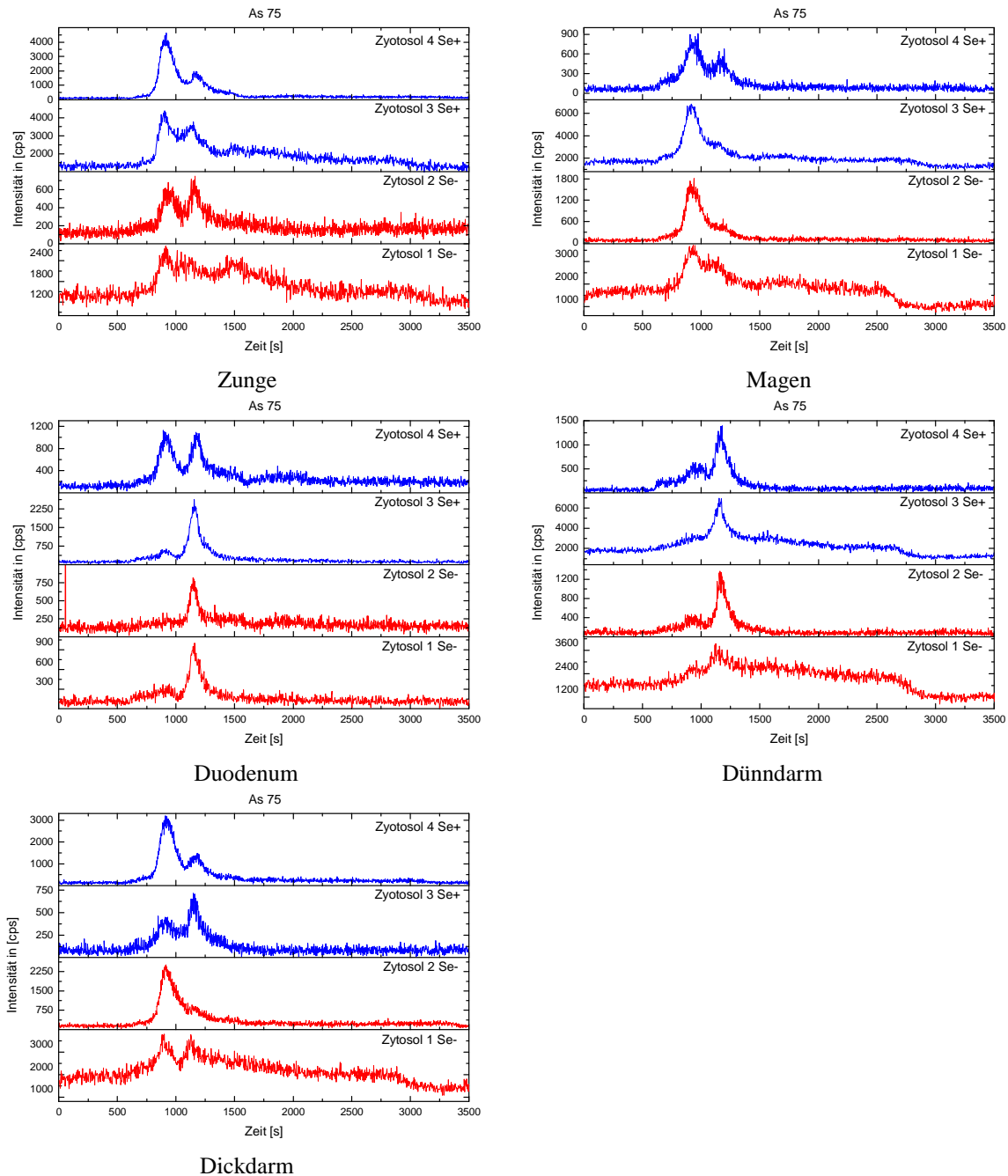


Abb. 52-56: Dargestellt sind die Arsenprofile nach chromatographischer Trennung der Zytosole von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm der selenadäquat (blau) und der selenmangelernährten Tiere (rot).

Aus den Profilen der Arsenmessungen sind in allen Gewebezcytosolen zwei Peaks erkennbar. Nach Zuordnung der molekularen Massen liegt der erste im Bereich von 21 kDa und der zweite im Bereich von 7 kDa.

4.3.1.2 Cadmium im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren

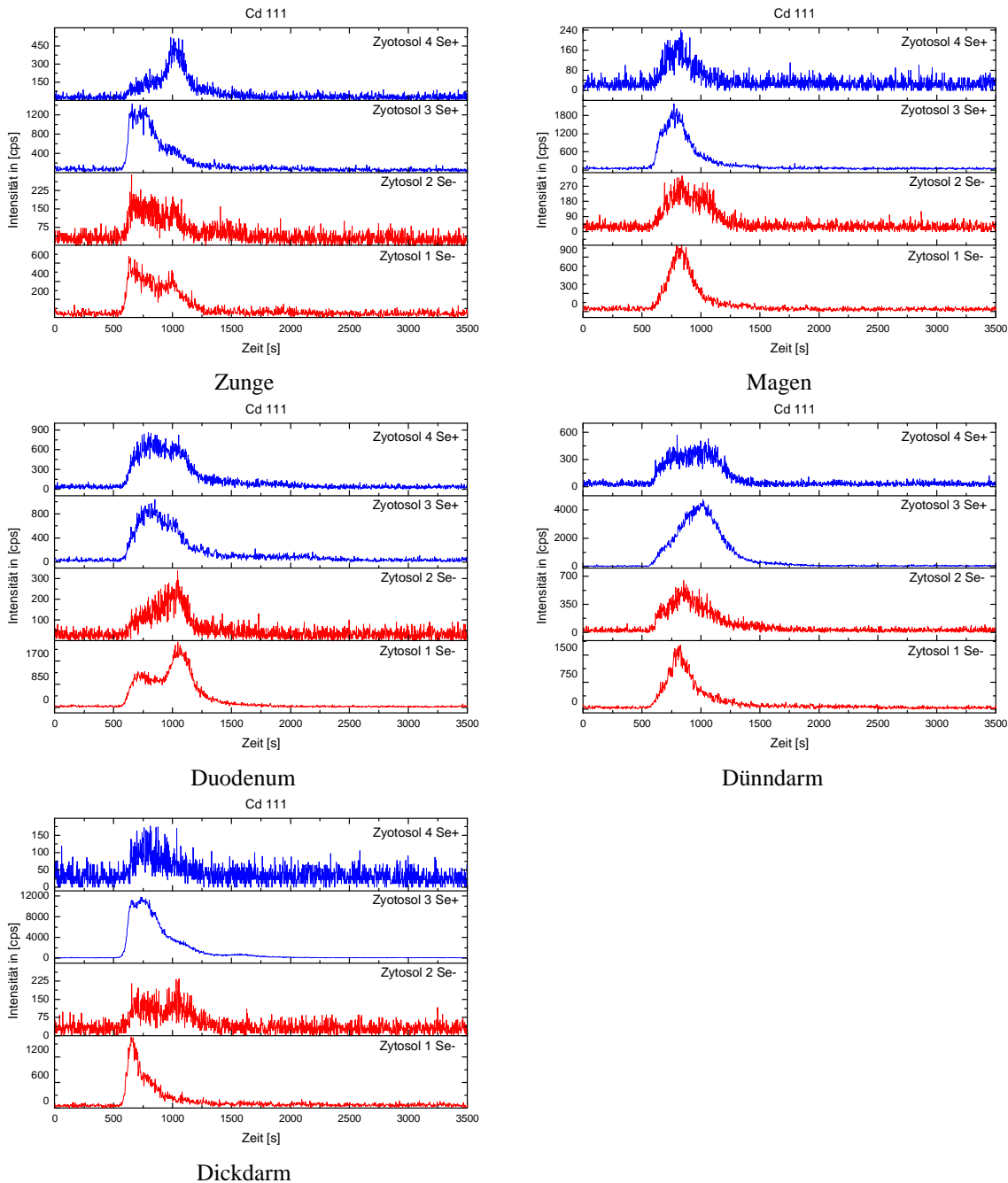


Abb. 57-61: Dargestellt sind die Cadmiumprofile nach chromatographischer Trennung der Zytosole von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm der selenadäquat (blau) und der selenmangelernährten Tiere (rot).

Aus den Profilen der Cadmiummessungen resultierten für die Zunge von Se(+)- und Se(-)-Tieren zwei Peaks. Der erste liegt nach Zuordnung der Molekularmasse bei ca. 65 kDa und der zweite bei ca. 12 kDa.

In den Cadmiumprofilen der Magenzytosele ist im Bereich von 32 kDa ein Peak zu erkennen. Darüber hinaus zeigt das Zytosol 2 ein weiteres Signal bei ca. 12 kDa.

In den Zytosolen des Duodenums sind zwei Peaks bestimmbar. Die entsprechenden Massen liegen für den ersten bei 37 kDa und für den zweiten im Bereich von 12 kDa.

Die Cadmiumprofile der Dünndarmzytosole zeigen für die Se(-)-Tiere sowie das Zytosol 4 Peaks bei 35 kDa. Zytosol 3 und 4 der Se(+)-Tiere zeigen darüber hinaus noch ein Signal bei 12 kDa. In Zytosol 1 und 3 ist bei 65 kDa ein Peak bestimmbar. Bei ca. 45 kDa weisen alle Zytosole ein Peakmaximum auf. Den Zytosolen 2 und 3 kann außerdem noch ein Peak bei 12 kDa zugeordnet werden.

4.3.1.3 Kobalt im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren

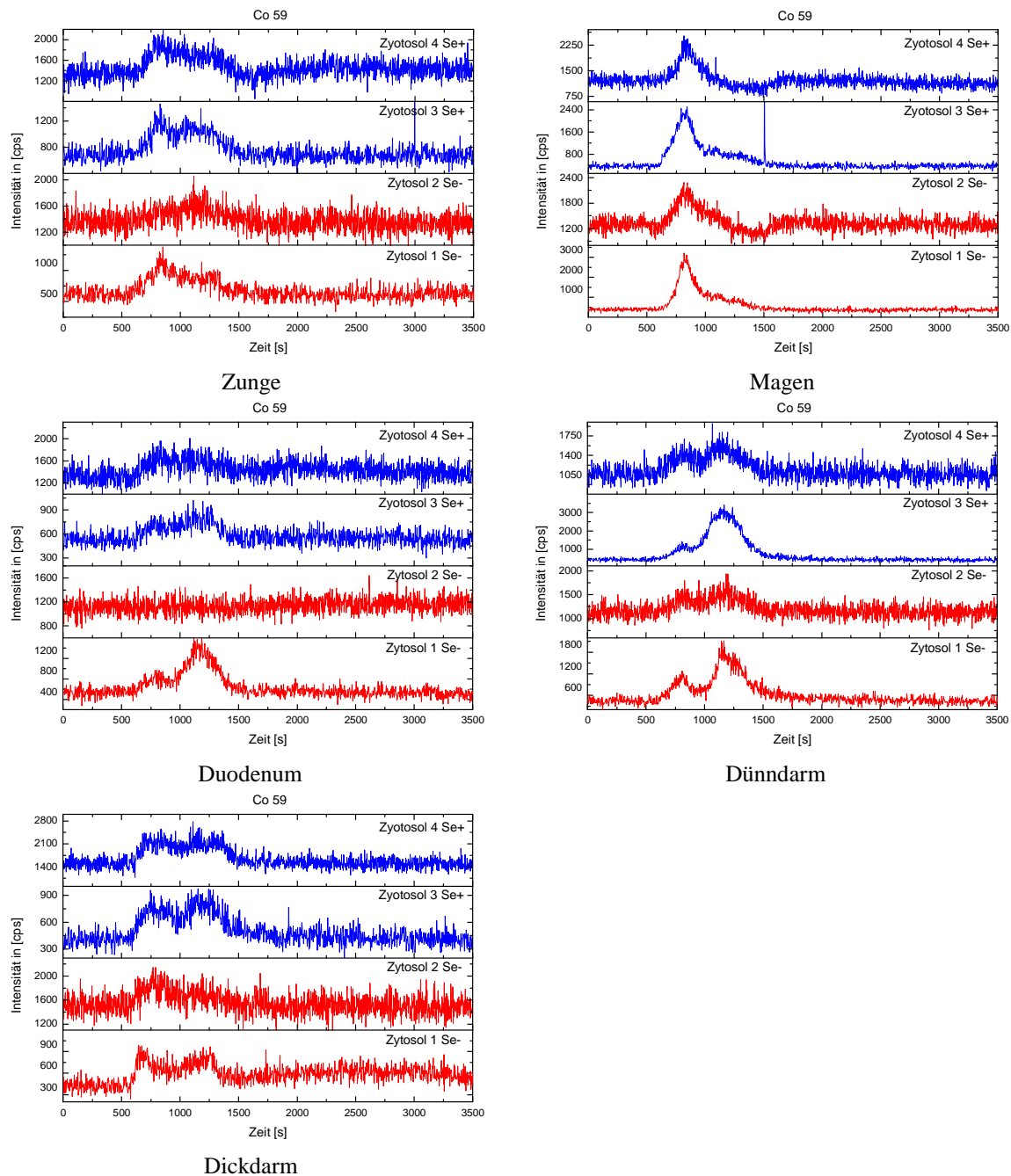


Abb. 62-66: Dargestellt sind die Cadmiumprofile nach chromatographischer Trennung der Zytosole von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm der selenadäquat (blau) und der selenmangelernährten Tiere (rot).

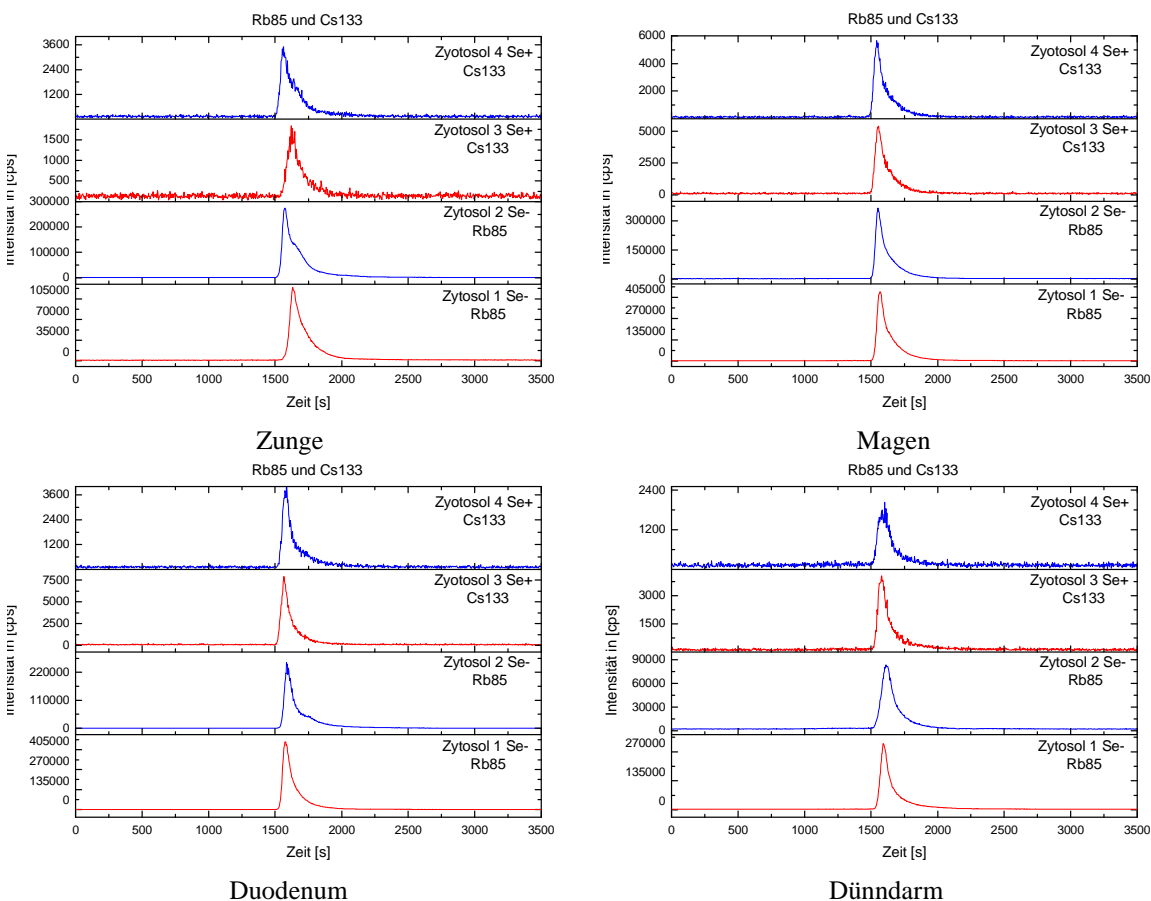
In allen Kobaltprofilen der Zungenzytosole ist im Bereich von ca. 30 kDa ein Peak zu erkennen. Ein weiteres Signal ist, wenn auch nur sehr undeutlich, innerhalb der Kalibration bei ca. 8 kDa erkennbar. Die Peakmaxima, die bei einer Retentionszeit von 1250 s liegen, sind nicht mehr innerhalb der Kalibration, so dass ihnen keine molekulare Masse mehr zugeordnet werden kann. Bei ca. 30 kDa sind auch in den Zytosolen des Magens Peaks zu erkennen. Ein Peak bei 8 kDa ist noch am besten im Zytosol 1 und 3 erkennbar.

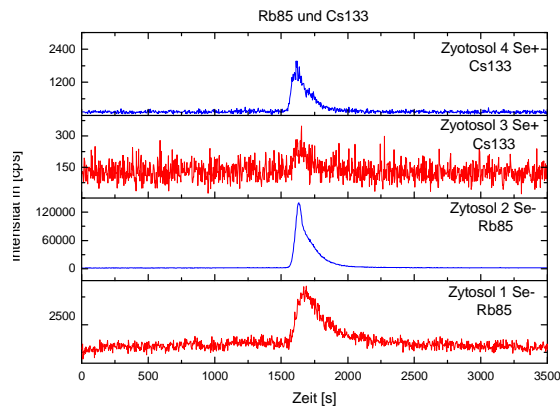
Mit Ausnahme des Zytosols 2, bei dem kein Signal erkennbar ist, sind in allen Duodenumzytosolen Peaks im Bereich von ca. 30 kDa zu sehen. Nur sehr undeutlich ist in den Se(+)-Tieren ein Signal bei ca. 7 kDa zu beobachten. Im Zytosol 1 hingegen ist dieser Peak sehr intensiv.

Die zuvor erkennbaren Peaks im Bereich von 30 kDa und 8 kDa wiederholen sich in allen Zytosolen des Dünndarms.

In den Dickdarmzytosolen sind drei Peakmaxima zu erkennen. Die ersten beiden entsprechen den Molmassen von 30 kDa und 8 kDa. Das dritte Peakmaximum liegt bei einer Retentionszeit von ca. 1250 s und damit außerhalb der Kalibration.

4.3.1.4 Cäsium und Rubidium im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren



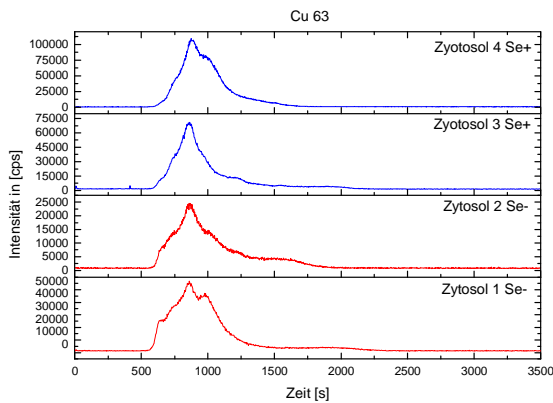


Dickdarm

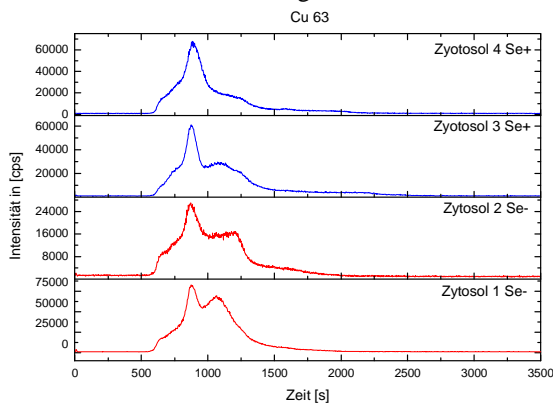
Abb. 67-71: Dargestellt sind die Rubidium- und Cäsiumprofile nach chromatographischer Trennung der Zytosole von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm der selenadäquat (blau) und der selenmangelernährten Tiere (rot).

Aus den Profilen der Rubidium- und Cäsiummessungen ist in allen Gewebezytosolen ein Peak erkennbar. Die Retentionszeit dieser Peaks liegt bei ca. 1750 s und somit außerhalb der Kalibrierung.

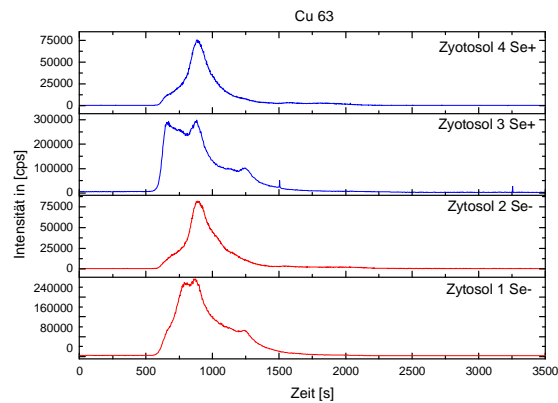
4.3.1.5 Kupfer im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren



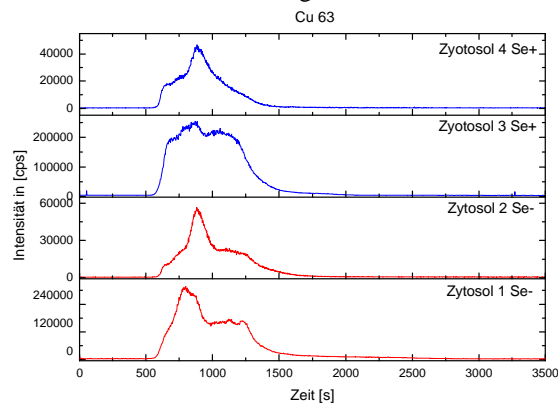
Zunge



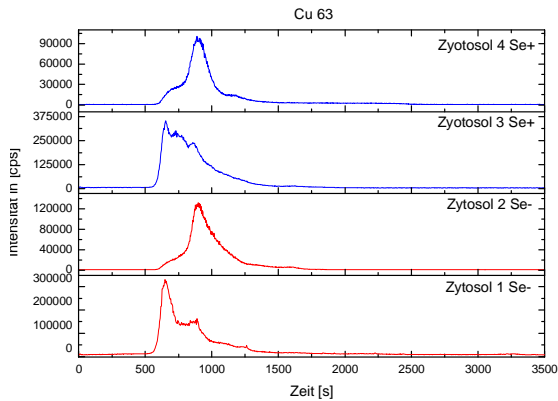
Duodenum



Magen



Dünndarm



Dickdarm

Abb. 72-76: Dargestellt sind die Kupferprofile nach chromatographischer Trennung der Zytosole von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm der selenadäquat (blau) und der selenmangelernährten Tiere (rot).

Im Kupferprofil der Zungenzytosoale sind vier Peaks erkennbar. Drei davon sind als Schultern vom Peak bei ca. 27 kDa zu sehen. Das erste Signal liegt außerhalb der Kalibrierung mit einer Molekularmasse von über 67 kDa. Im Bereich von 47 kDa ist eine weitere Schulter erkennbar. Das vierte Signal, welches im Zytosol 1 noch am besten erkennbar ist, liegt bei ca. 15 kDa.

In den Magenzytosolen ist der Hauptpeak bei ca. 25 kDa erkennbar. Ihm als Schultern vorgelagert sind zwei Signale bei über 67 kDa und bei ca. 43 kDa.

Die Kupferprofile der Duodenumzytosoale zeigen einen Hauptpeak bei ca. 25 kDa. Ihm voran können zwei kleine Schultern beobachtet werden. Die Zuordnung der Molekularmassen ergibt einen Wert von über 67 kDa sowie im Bereich von 43 kDa. Ein weiterer und ziemlich breiter Peak hat sein Maximum im Bereich von ca. 10 kDa.

Ein ähnliches Profil ist für die Dünndarmzytosoale zu sehen. Einem Hauptpeak bei ca. 27 kDa sind Schultern bei über 67 kDa und im Bereich von 44 kDa vorgelagert. Das Maximum eines breiten Signals kann einem Wert von 10 kDa zugeordnet werden.

In den Zytosolen des Dickdarms sind zwei Hauptsignale bestimmbar. Im Zytosol 1 und 3 ist dem deutlichsten Signal ein Wert von über 67 kDa zuzuordnen. Im Zytosol 2 und 4 hat der Peak im Bereich von 27 kDa die höchste Intensität.

4.3.1.6 Eisen im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren

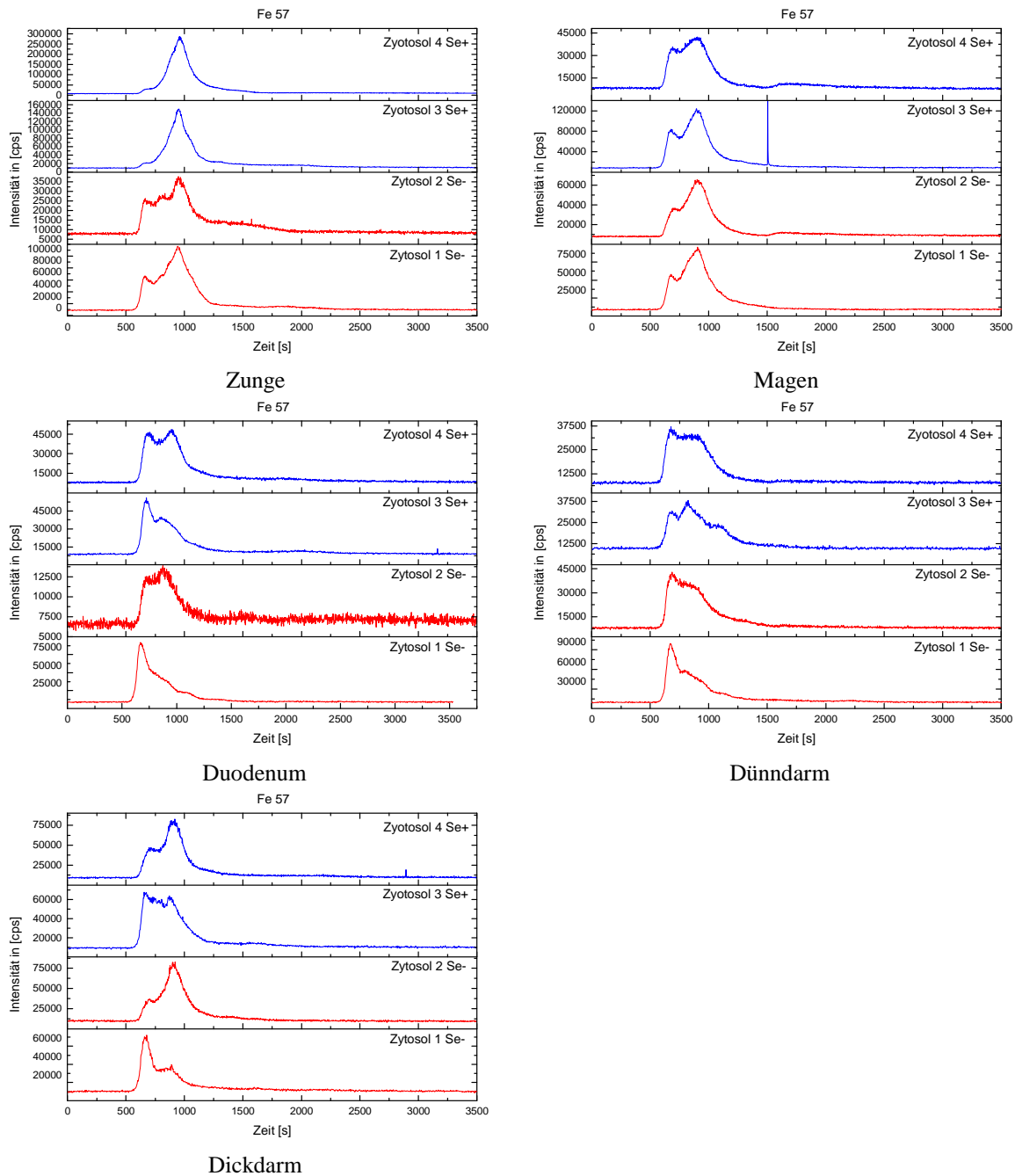


Abb. 77-81: Dargestellt sind die Eisenprofile nach chromatographischer Trennung der Zytosole von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm der selenadäquat (blau) und der selenmangelernährten Tiere (rot).

In allen Eisenprofilen der Gewebezcytosole sind zwei Peaks zu erkennen. Nach Zuordnung der molekularen Massen liegt der erste im Bereich außerhalb der Kalibration bei über 67 kDa und der zweite im Bereich von 22 kDa.

4.3.1.7 Mangan im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren

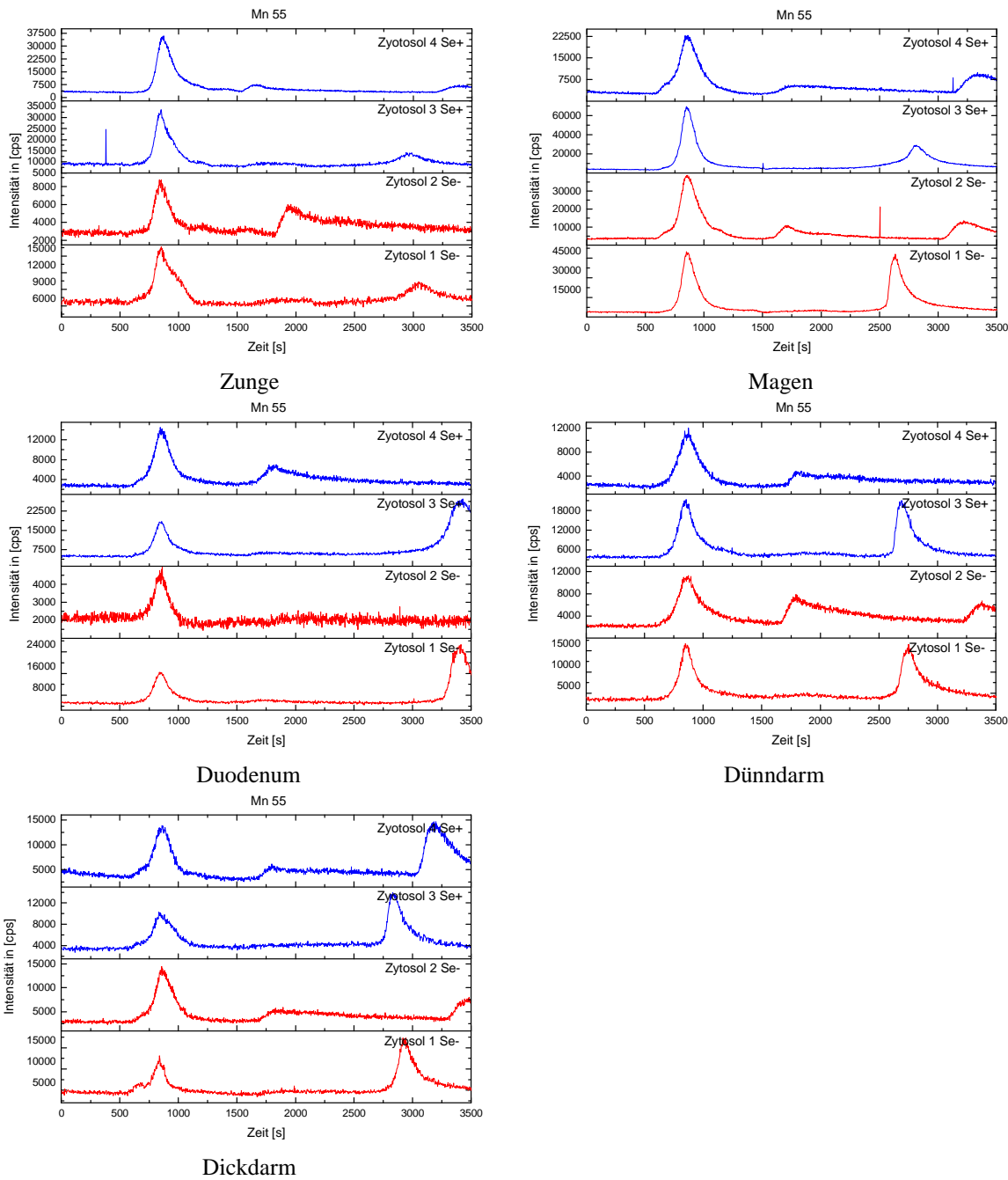


Abb. 82-86: Dargestellt sind die Manganprofile nach chromatographischer Trennung der Zytosole von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm der selenadäquat (blau) und der selenmangelernährten Tiere (rot).

In allen Manganprofilen der Gewebezcytosole ist ein Peak zu erkennen. Nach Zuordnung der molekularen Massen liegt dieser im Bereich von 28 kDa. In den Zytosolen des Dickdarms ist darüber hinaus noch ein Peak, der außerhalb der Kalibration liegt, bei einer molekularen Masse von über 67 kDa erkennbar.

4.3.1.8 Molybdän im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren

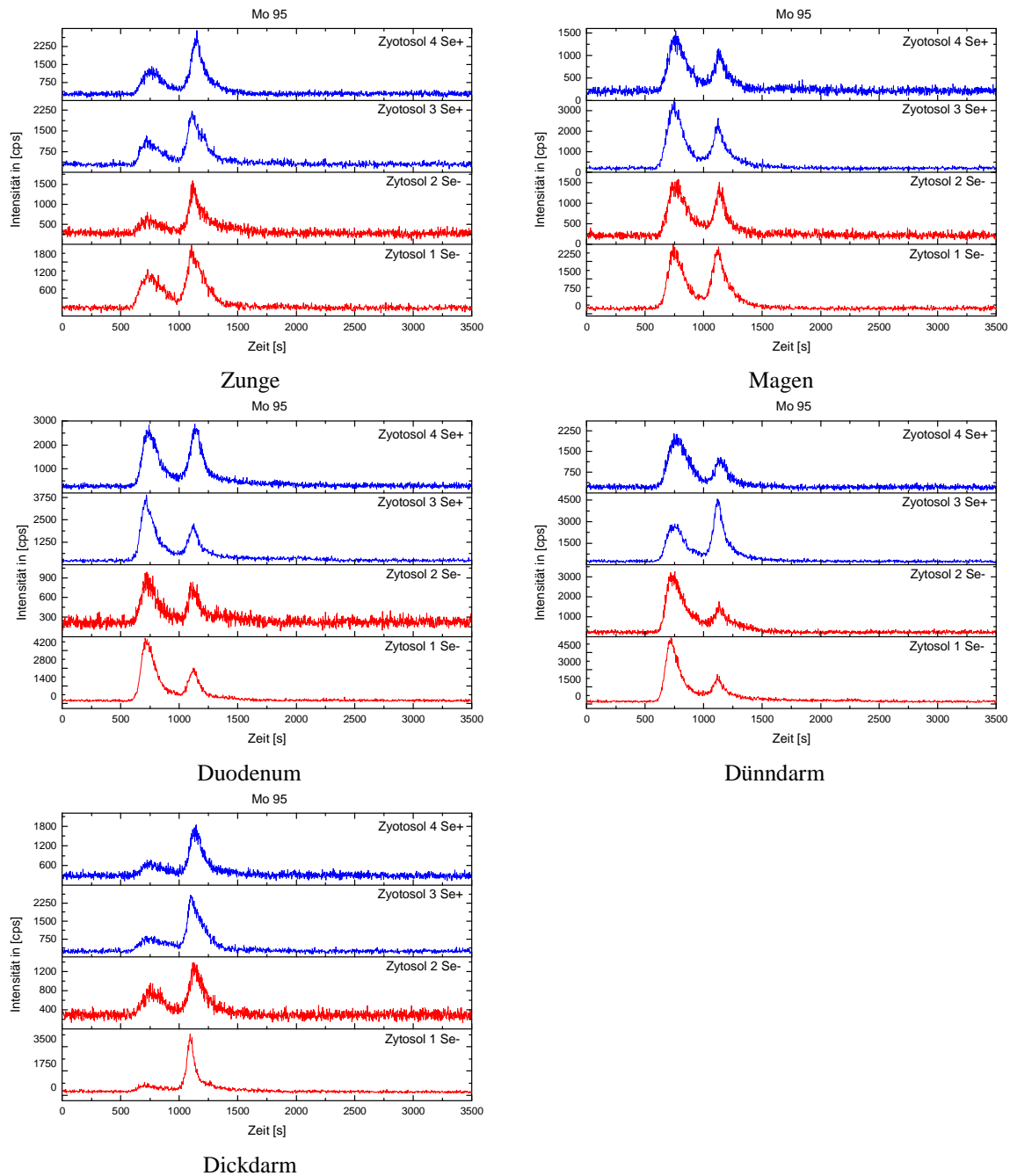


Abb. 87-91: Dargestellt sind die Molybdänprofile nach chromatographischer Trennung der Zytosole von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm der selenadäquat (blau) und der selenmangelernährten Tiere (rot).

In allen Molybdänprofilen der Gewebezcytosole sind zwei Peaks zu erkennen. Nach Zuordnung der molekularen Massen liegt der erste im Bereich von 50 kDa und der zweite im Bereich von 7 kDa.

4.3.1.9 Nickel im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren

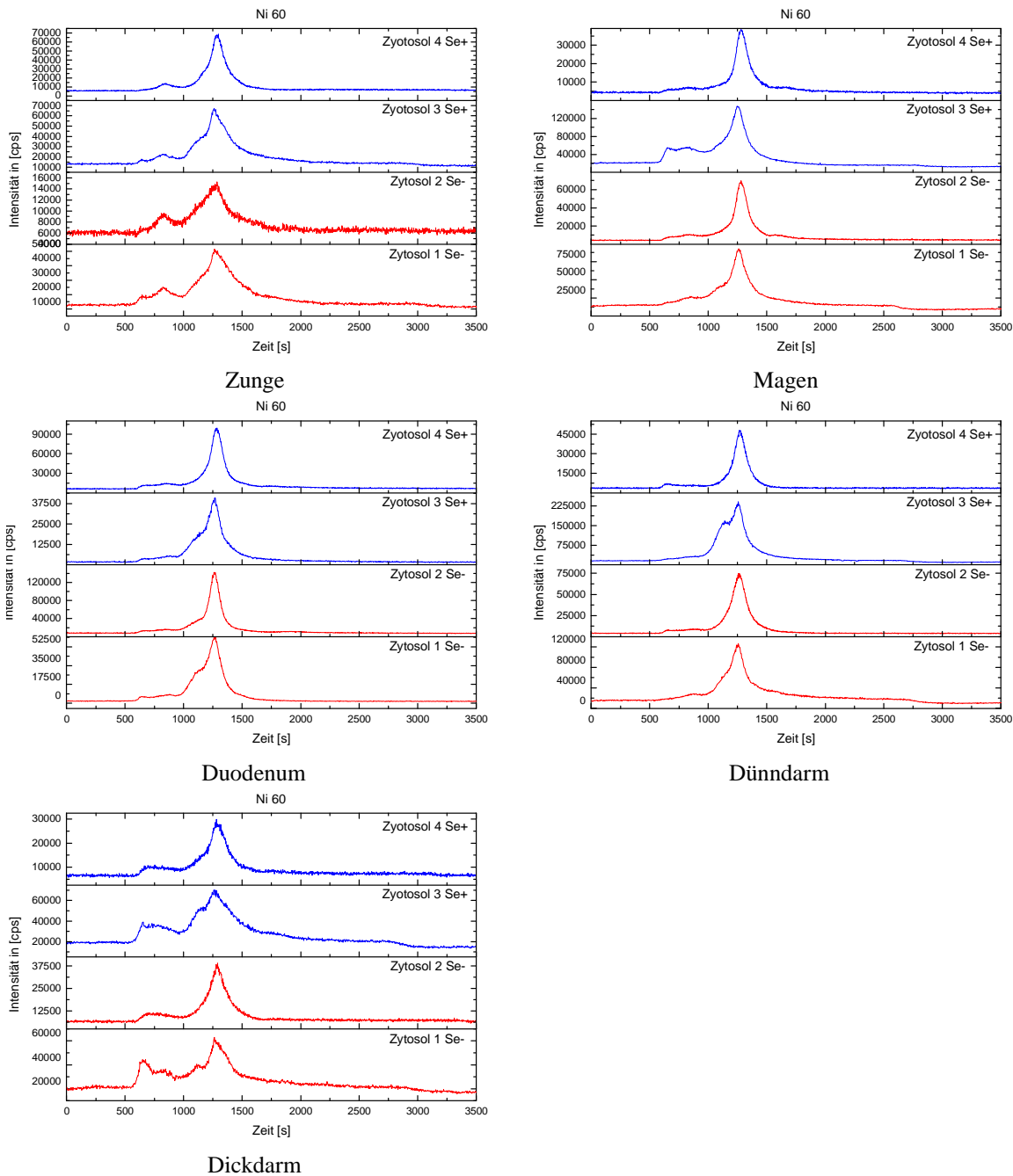


Abb. 92-96: Dargestellt sind die Nickelprofile nach chromatographischer Trennung der Zytosole von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm der selenadäquat (blau) und der selenmangelernährten Tiere (rot).

Der in allen Gewebezcytosolen erkennbare Hauptpeak liegt außerhalb der Kalibration, so dass ihm nur eine Masse von weniger als 6 kDa zugeordnet werden kann. Als kleine Schulter ist ihm ein Signal bei ca. 8 kDa vorgelagert. In den Zytosolen der Zunge, des Magen und Dickdarms sind Peaks bei über 67 kDa sowie im Bereich von 33 kDa zu erkennen. Die Zytosole von Duodenum und Dünndarm weisen Peaks im Bereich von über 67 kDa sowie im Bereich von 25 kDa auf.

4.3.1.10 Selen im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren

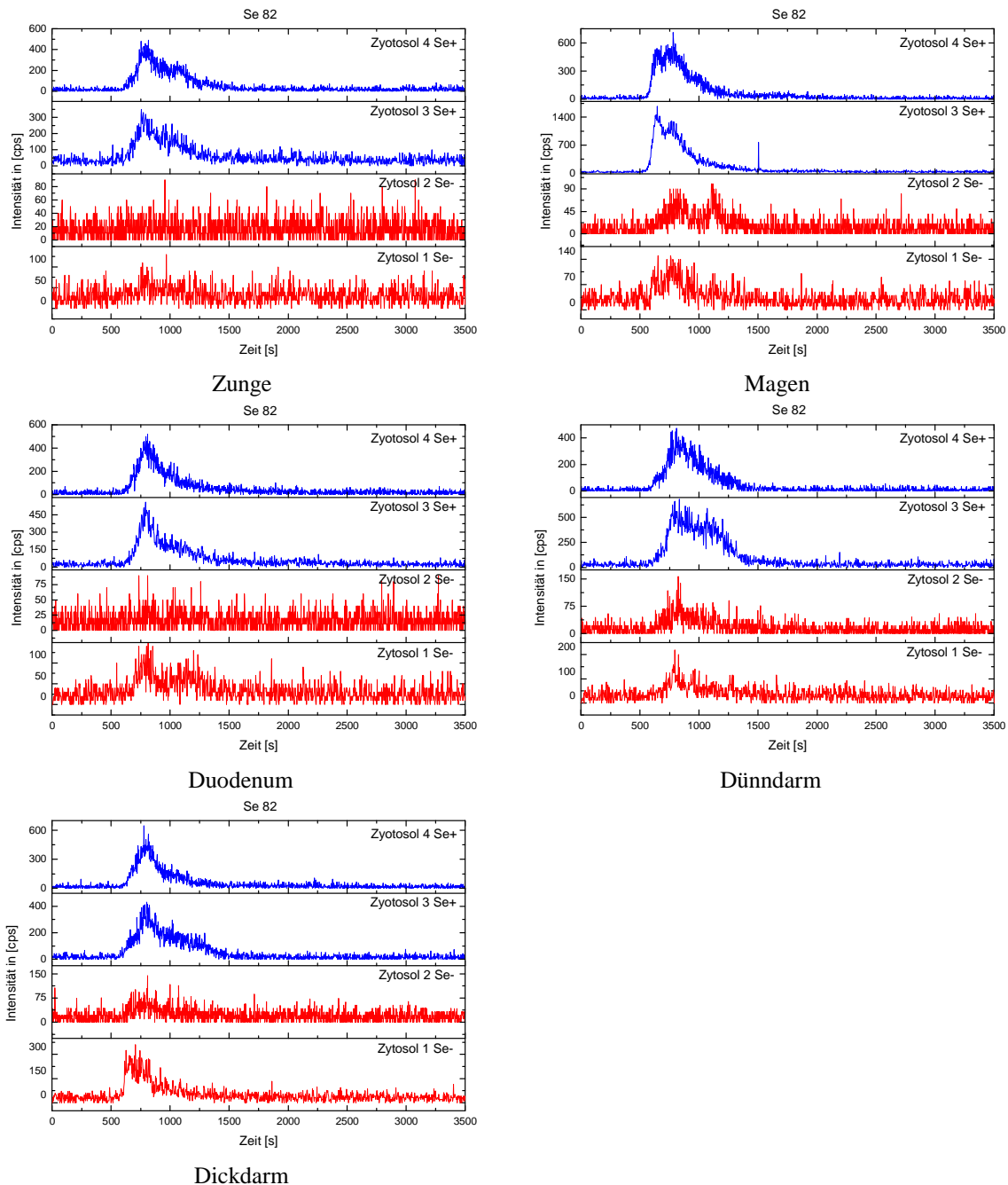


Abb. 97-101: Dargestellt sind die Selenprofile nach chromatographischer Trennung der Zytosole von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm der selenadäquat (blau) und der selenmangelernährten Tiere (rot).

In den Selenprofilen der Zungenzytosole sind Peakmaxima für die Se(+)-Tiere im Bereich von 37 kDa und im Bereich von 10 kDa zu erkennen. Die Selenkonzentration in den Zytosolen der Se(-)-Tiere ist zu gering, um einen Peak einer Molekularmasse zuordnen zu können. Lediglich im Zytosol 1 ist im Bereich von 37 kDa ein Signal zu erahnen.

In den Magenzytosolen der Se(+)-Tiere sind Peaks im Bereich von über 67 kDa und im Bereich von ca. 42 kDa zu beobachten. Die Zytosole der Se(-)-Tieren weisen einen Peak im Bereich von

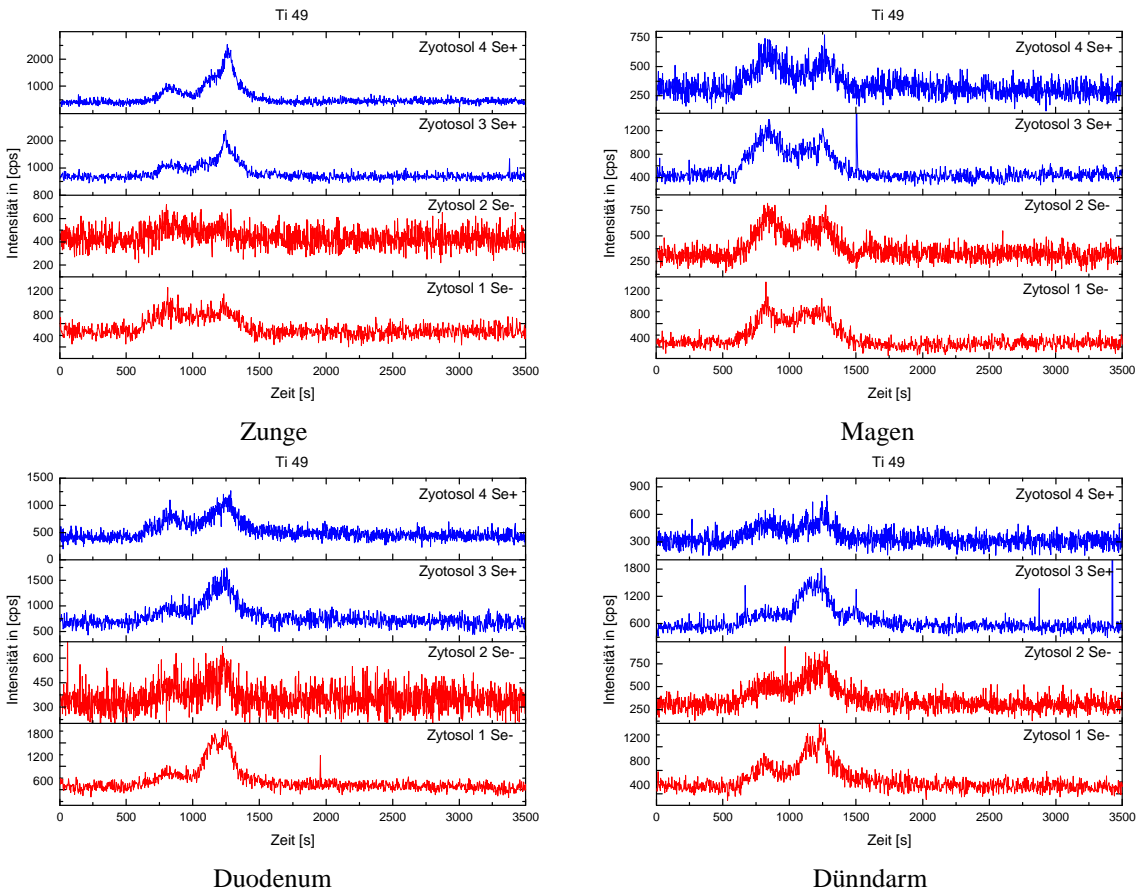
42 kDa auf. Im Zytosol 2 ist darüber hinaus ein weiteres Signal im Bereich von 12 kDa erkennbar.

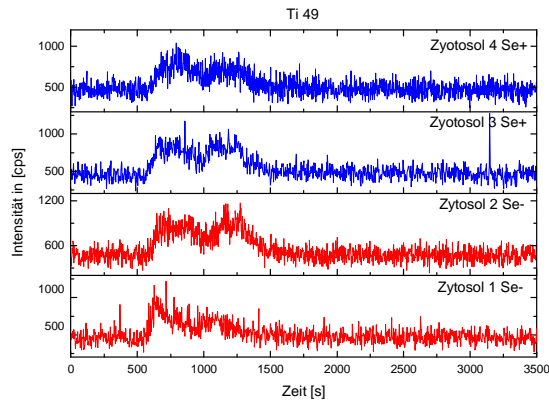
Die Profile des Duodenums zeigen für die Zytosole der selenadäquat ernährten Tiere ein Signal bei 37 kDa. Diesem relativ breiten Peak ist eine Schulter im Bereich von 12 kDa angelagert. In den Zytosolen der selenmangelernährten Tieren sind lediglich im Zytosol 1 Peaks erkennbar. Diese weisen Molekularmassen im Bereich von 37 kDa bzw. 7 kDa auf.

Die Selenprofile der Dünndarmzytosoile weisen Peaks im Bereich von 35 kDa auf. In den Se(+)-Zytosolen ist ein weiteres Peakmaximum bei ca. 10 kDa erkennbar.

Allen Zytosolen des Dickdarms kann ein Peak im Bereich von 37 kDa zugeordnet werden.

4.3.1.11 Titan im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren



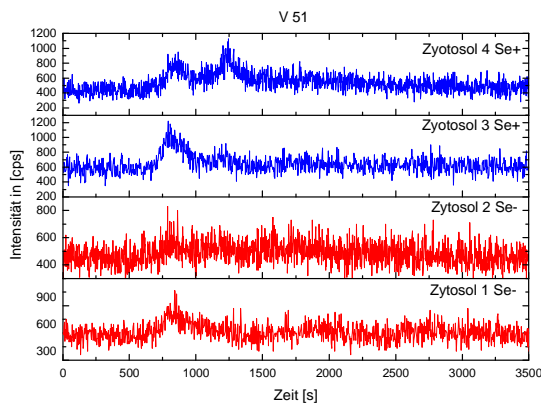


Dickdarm

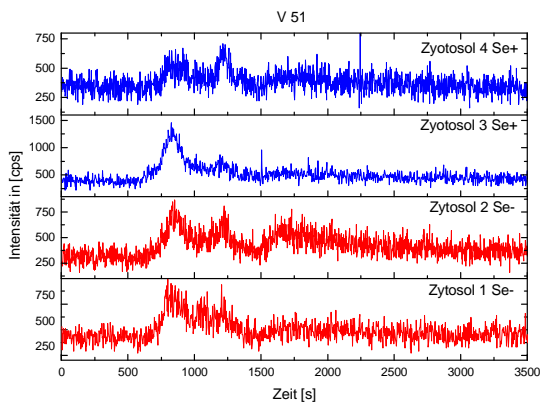
Abb. 102-106: Dargestellt sind die Titanprofile nach chromatographischer Trennung der Zytosole von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm der selenadäquat (blau) und der selenmangelernährten Tiere (rot).

Bei allen Titanprofilen der Gewebezcytosole konnte der Peak bei 34 kDa als $^{36}\text{Ar}^{13}\text{C}$ -Störung identifiziert werden. Des weiteren weisen die Gewebezcytosole zudem aber noch einen Peak und eine ihm vorgelagerte Schulter im Bereich von weniger als 6 kDa, da dieser Peak außerhalb der Kalibration liegt, und im Bereich von 10 kDa auf.

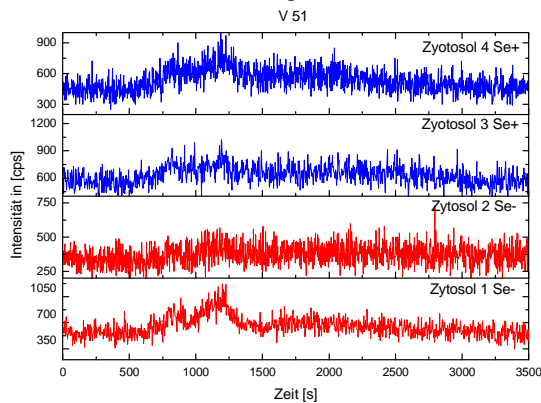
4.3.1.12 Vanadium im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren



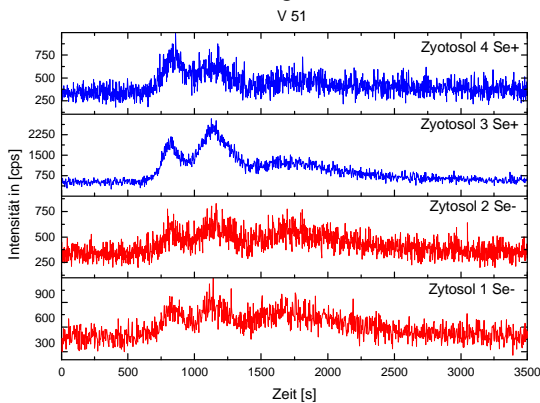
Zunge



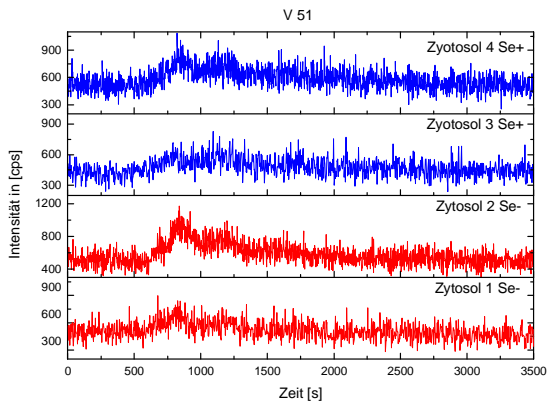
Magen



Duodenum



Dünndarm

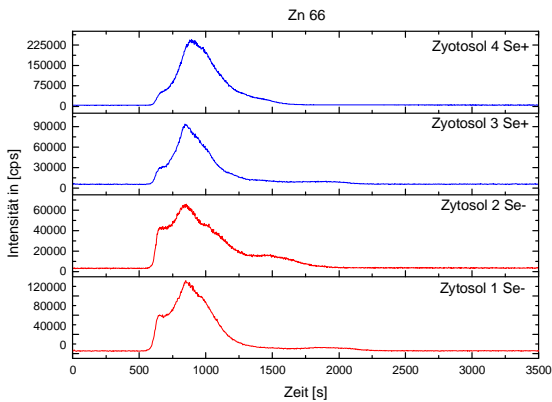


Dickdarm

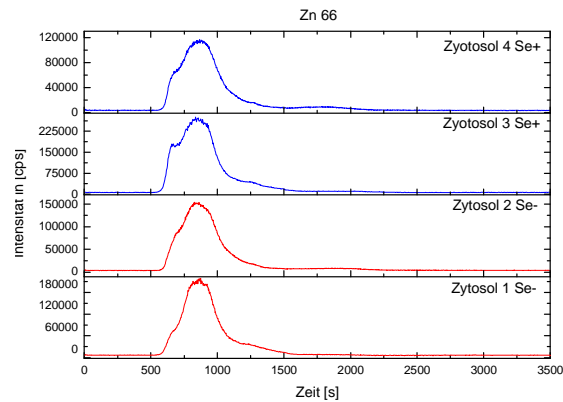
Abb. 107-111: Dargestellt sind die Vanadiumprofile nach chromatographischer Trennung der Zytosole von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm der selenadäquat (blau) und der selenmangelernährten Tiere (rot).

In allen Vanadiumprofilen der Gewebezytosoale sind zwei Peaks zu erkennen. Nach Zuordnung der molekularen Massen liegt der erste im Bereich von 32 kDa und der zweite außerhalb der Kalibrierung in einem Bereich unter 6 kDa.

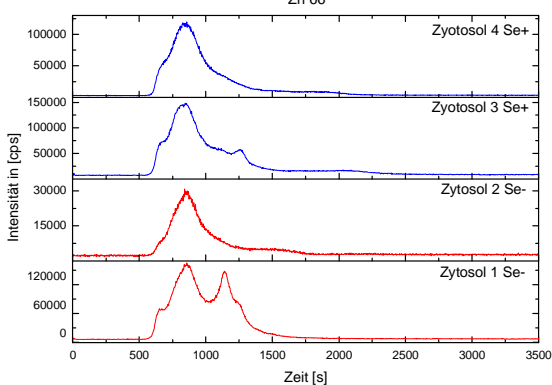
4.3.1.13 Zink im Zytosol von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm von Se(+)- und Se(-)-Tieren



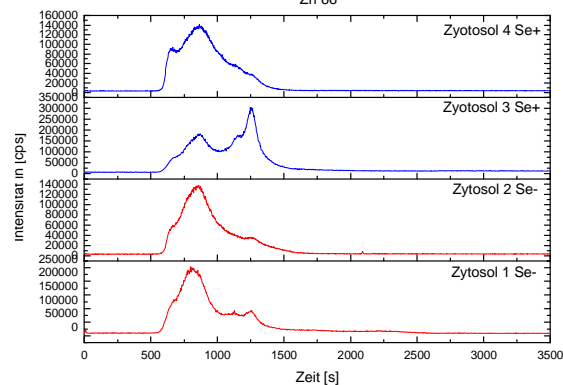
Zunge



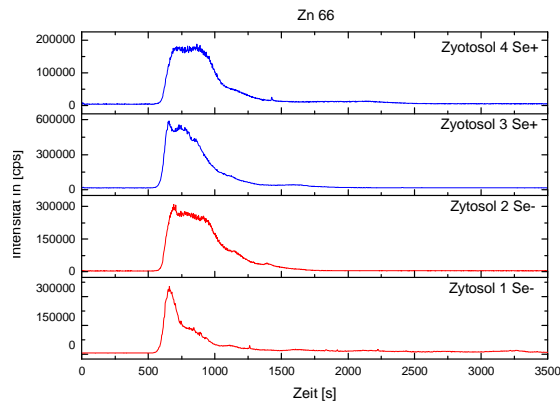
Magen



Duodenum



Dünndarm



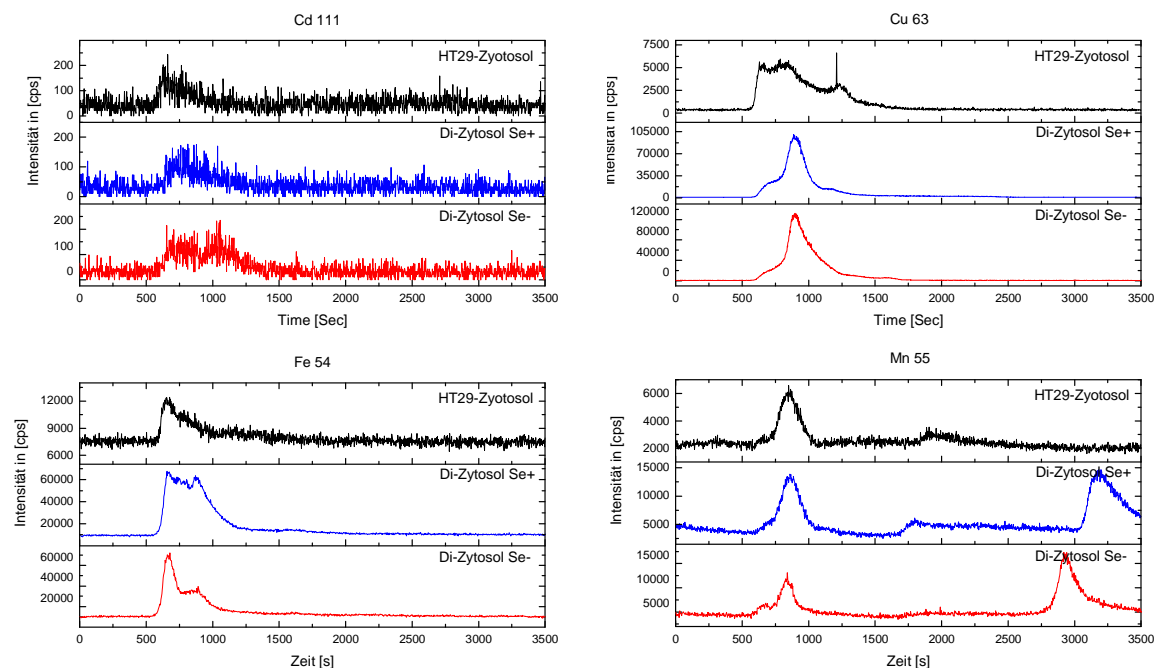
Dickdarm

Abb. 112-116: Dargestellt sind die Zinkprofile nach chromatographischer Trennung der Zytosole von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm der selenadäquat (blau) und der selenmangelernährten Tiere (rot).

Die Zinkprofile aller Gewebezytosole weisen einen stark verbreiterten Peak auf, dessen Maximum im Bereich von 28 kDa liegt. Diesem Peak ist jeweils eine Schulter vor- bzw. nachgelagert. Diese Schultern weisen molekulare Massen von über 67 kDa bzw. weniger als 6 kDa auf.

4.3.1.14 Speziationsanalyse des Zellzytosols der Zelllinie HT29

Die durch SEC-ICP-MS erhaltenen Elementprofile des Zellzytosols der humanen Karzenomdickdarmzelllinie HT29 wurden zum Vergleich mit den entsprechenden Elementprofilen des Dickdarmzytosols von Se(+)- und Se(-)-Ratten für die Elemente Cadmium, Kupfer, Eisen, Mangan, Molybdän, Nickel, Selen und Zink in Abbildungen 117-124 dargestellt. Diese Elemente konnten im Zytosol nachgewiesen werden. Rubidium und Cäsium wurden nicht untersucht, da in den Gewebezytosolen diese Elemente nur im Permeationspeak auftraten.



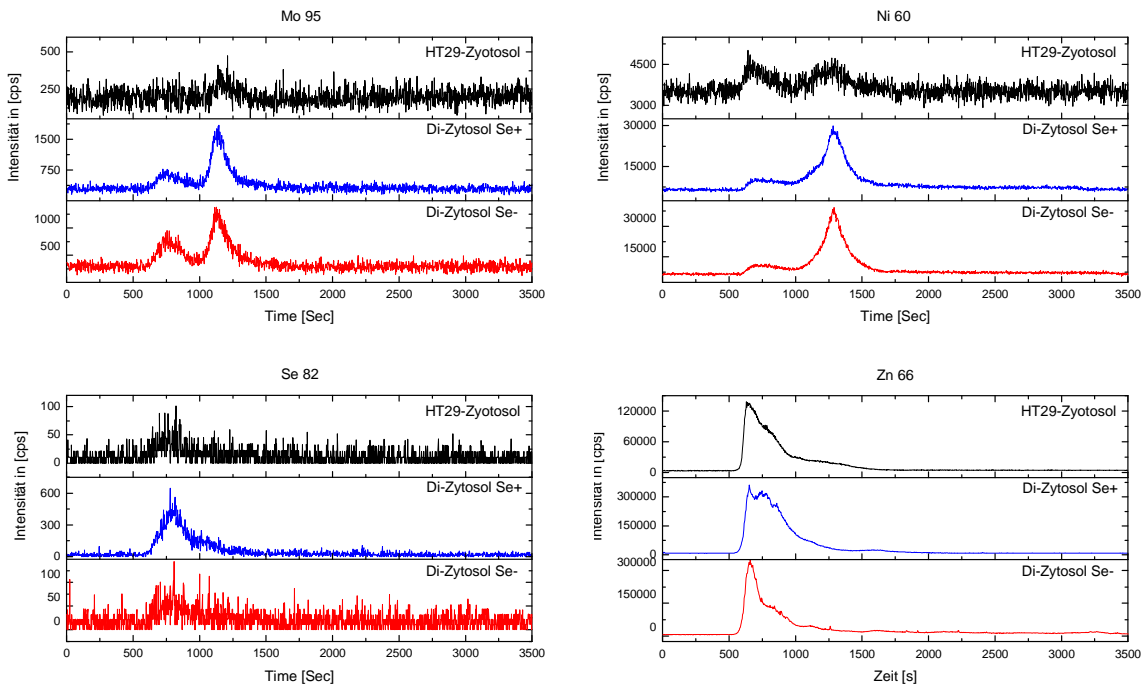


Abb. 117-124: Dargestellt sind die Elementprofile von Cadmium, Kupfer, Eisen, Mangan, Molybdän, Nickel, Selen und Zink nach chromatographischer Trennung der Zytole der Zelllinie HT29 und Dickdarm der selenadäquat (blau) und der selenmangelernährten Tiere (rot).

Das Cadmiumprofil zeigt einen Peak mit starkem Tailing, so dass eine Zuordnung der Molekularmasse nur bedingt möglich ist. Das Peakmaximum liegt außerhalb der Kalibrierung mit einer molekularen Masse von über 67 kDa.

Das Kupferprofil zeigt drei Peaks. Die zugeordnete Masse des ersten Peaks liegt, genau wie der dritte Peak, außerhalb der Kalibration, so dass die molekulare Masse über 67 kDa bzw. weniger als 6 kDa beträgt. Der zweite Peak liegt im Bereich von 34 kDa.

Das Eisenprofil zeigt einen Peak bei über 67 kDa, dem eine Schulter nachgelagert ist, die im Bereich von 30 kDa liegt.

Für Mangan ist in dem Profil ein Peak zu erkennen, dem eine Masse von 28 kDa zugeordnet werden kann.

Im Molybdänprofil ist ein schwacher Peak bei ca. 7 kDa zu sehen.

Im Nickelprofil sind Peaks bei über 67 kDa sowie bei weniger als 6 kDa zu erkennen. Dem Peak bei weniger als 6 kDa ist eine Schulter vorgelagert, welcher eine Molmasse von ca. 8 kDa zugeordnet werden kann.

Für Selen ist ein Peak im Bereich von 42 kDa zu sehen.

Dem Signal für das Zinkprofil bei über 67 kDa sind zwei Schultern nachgelagert. Diese weisen Massen von ca. 38 kDa und ca. 12 kDa auf.

4.4 Zusammenfassung

Durch Untersuchungen mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) und der online gekoppelten Elementanalytik mittels ICP-MS konnte gezeigt werden, dass die Spurenelemente Arsen, Cadmium, Kobalt, Kupfer, Eisen, Mangan, Molybdän, Nickel, Selen, Titan, Vanadium und Zink in den Geweben des gastrointestinalen Trakts der Ratten mit unterschiedlichem Selenstatus und der humanen Karzenomdickdarmzelllinie HT29 in proteingebundener Form vorliegen. Die Elemente Cäsium und Rubidium, die im Permeationspeak detektiert wurden, sind hingegen nicht an Proteine gebunden. In den Gewebezytosolen konnte für Arsen gezeigt werden, dass es bei 21 kDa und bei 7 kDa arsenbindende Proteine gibt. Cadmiumbindende Proteine wurden in den Zytosolen bei molekularen Massen im Bereich von 65 kDa, 45 kDa, 35 kDa und 12 kDa detektiert. Aus den Kobaltprofilen ist zu erkennen, dass Kobalt an Proteine mit molekularen Massen von ca. 30kDa, 8 kDa sowie kleiner als 6 kDa bindet. Kupferbindende Proteine konnten für Molmassen im Bereich von über 67 kDa, 27 kDa, 43 kDa, 15 kDa und 10 kDa bestimmt werden. Die erhaltenen Eisenprofile ergeben eisenbindende Proteine mit Massen von über 67 kDa und ca. 22 kDa. Bei molekularen Massen von über 67 kDa und 28 kDa wurden manganbindende Proteine detektiert. Aus dem Molybdänprofil konnten molybdänbindende Proteine im Bereich von 50 kDa sowie im Bereich von 7 kDa bestimmt werden. Nach Zuordnung der molekularen Massen konnten fünf Proteine mit einer nickelbindenden Domäne mit Größen von über 67 kDa, ca. 33 kDa, ca. 25 kDa, ca. 8 kDa und weniger als 6 kDa bestimmt werden. In den Gewebezytosolen konnte für Selen gezeigt werden, dass es bei über 67 kDa, im Bereich von 37 kDa, 12 kDa, 10 kDa und bei 7 kDa selenbindende Proteine gibt. Titanbindende Proteine wurden in den Zytosolen bei molekularen Massen im Bereich von 10 kDa und bei weniger als 6 kDa gefunden. Ähnlich ist es auch für Vanadium. So wurden vanadiumbindende Proteine im Bereich von 32 kDa und weniger als 6 kDa detektiert. Zinkbindende Proteine konnten in Größenordnungen von über 67 kDa, im Bereich von 28 kDa sowie bei weniger als 6 kDa beobachtet werden. Spurenelementbindende Proteine konnten auch für das Zytosol der humanen Karzenomdickdarmzelllinie HT29 gezeigt werden. Metallbindende Proteine wurden für Cadmium bei über 67 kDa, für Kupfer bei über 67 kDa, 34 kDa und weniger als 6 kDa, für Eisen bei über 67 kDa und 30 kDa, für Mangan im Bereich von 28 kDa, für Molybdän bei 7 kDa, für Nickel bei über 67 kDa, 8 kDa und weniger als 6 kDa, für Selen bei 42 kDa und für Zink im Bereich von über 67 kDa, 38 kDa und 12 kDa detektiert.

4.5 Zellkulturversuche

Vergleicht man die durch die SEC-ICP-MS erhaltenen Molybdänprofile vom Zytosol der Zelllinie mit den Zytosolen der Gewebe des Dickdarms der Ratten mit unterschiedlichem Selenstatus, zeigten sich für das Dickdarmgewebe zwei Peaks, während für das Zellzytosol nur ein Peak zu beobachten war. Der erste Peak wurde bei ca. 50 kDa und der zweite bei ca. 7 kDa für die Zytosole des Dickdarms detektiert. Das Elementprofil vom Zytosol der Zelllinie hingegen wies nur einen schwachen Peak bei einer molekularen Masse von ca. 7 kDa auf. Daraufhin wurde der Einfluss von Molybdän durch Inkubation des Elements auf die Zelllinie untersucht. Die Toxizität des zur Inkubation der Zelllinie verwendeten Molybdäns wurde mittels Zellvitalitätstests ermittelt.

4.5.1 Zellvitalitätstest (MTT) mit Molybdän

Für den Zellvitalitätstest wurden die Zellen nach dem Umsetzen über Nacht im Brutschrank stehen gelassen. Dem Nährmedium der Zellen wurden dann unterschiedliche Konzentrationen von Ammonium-Molybdat zugesetzt und die Zellen über drei Tage lang inkubiert. Der Zellvitalitätstest wurde dann wie in 2.2.2.12 beschrieben durchgeführt. Als Endkonzentrationen für die Inkubation mit Molybdän wurden 4 mg/l, 2 mg/l, 1 mg/l, 500 µg/l, 250 µg/l, 125 µg/l, 62,5 µg/l, 31,3 µg/l, 15,6 µg/l, 7,8 µg/l und 3,9 µg/l gewählt. Abbildung 1 zeigt die Zellvitalität in % bezogen auf die Kontrollgruppe.

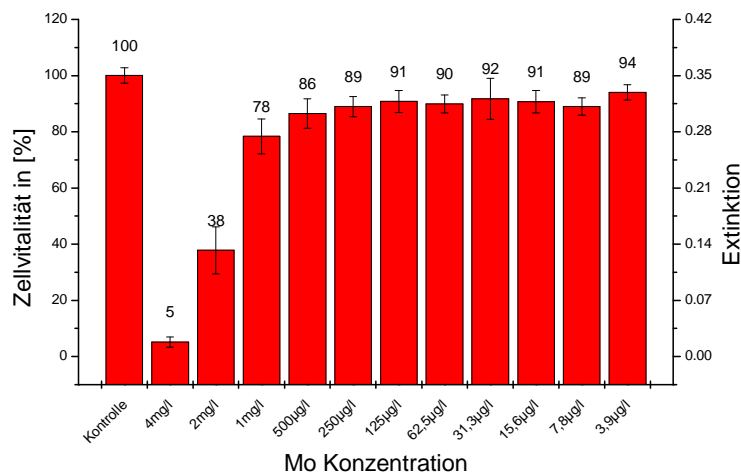


Abb 1: Das Diagramm zeigt die Veränderung der Zellvitalität der humanen Karzenomdickdarmzelllinie HT29 bei der Inkubation mit Ammonium-Molybdat in verschiedenen Konzentrationen.

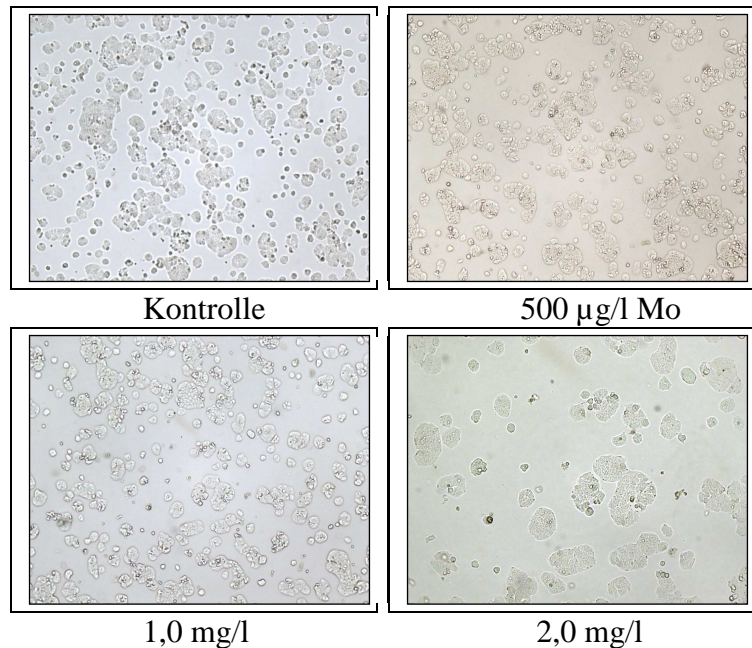


Abb 2: Die Fotos zeigen die humane Karzenomdickdarmzelllinie HT29 in deren Nährmedium unterschiedliche Konzentrationen von Molybdän zugesetzt worden ist.

Der Zellvitalitätstest zeigte, dass es ab einer Konzentration von 500µg/l Molybdän zu einem verringerten Umsatz von ca. 20 % des MTT kam. Bei mikroskopischer Beobachtung der Zellen konnte bei einer Konzentration von 2 mg/l Molybdän eine morphologische Veränderung der Zellen sowie eine deutlich verringerte Aufnahme von MTT um ca. 60 % gezeigt werden. Für weitere Experimente wurden die Zellen mit einer Molybdän-Konzentration von 500 µg/l inkubiert.

4.5.2 SEC-ICP-MS der Zelllinie HT29 nach Inkubation mit Molybdän

Der Einfluss der Inkubation der Zellen mit einer Molybdänkonzentration von 500 µg/l wurde mittels SEC-ICP-MS untersucht. Dafür wurde dem Nährmedium der Zelllinie Ammonium-Molybdat zugesetzt und die Zelllinie über drei Tage inkubiert. Das Nährmedium wurde entfernt und die Zellschicht dreimal mit einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS-Puffer) gewaschen und abgeschabt. Durch Zentrifugation bei 200 x g wurde der PBS-Puffer (Überstand) entfernt und das Zellpellet in 20 mmol Tris-HNO₃-Puffer aufgenommen und mittels Ultraschall homogenisiert. Das Zellzytosol wurde durch Zentrifugation bei 100000 x g für 80 min gewonnen. Die zytosolischen Proteine wurden ihrer nativen Molekularmasse nach durch Größenausschlusschromatographie getrennt und unter anderem auf Molybdän untersucht. Abbildung 3 zeigt die Elementprofile für Molybdän im Zytosol der Kontrollgruppe und der mit Molybdän inkubierten Gruppe.

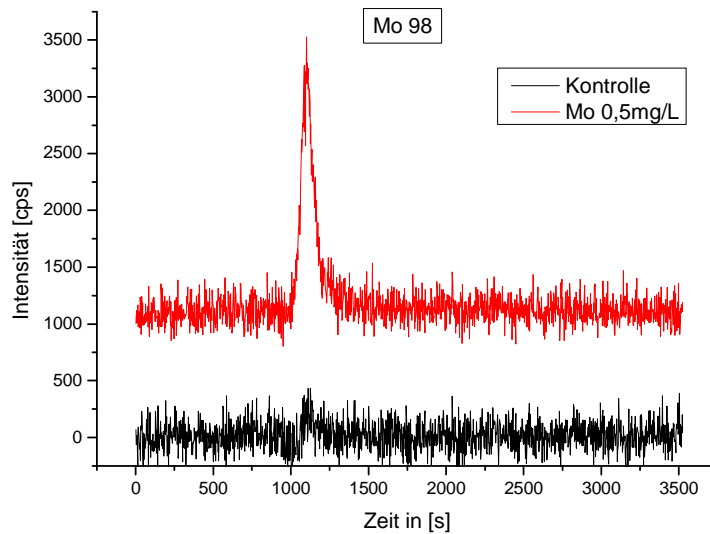


Abb. 3: Dargestellt sind die Molybdänprofile nach chromatographischer Trennung der Zytosole der Kontrollgruppe (schwarz) und der mit Molybdän inkubierten Gruppe (rot).

Das Molybdänprofil der Kontrollgruppe zeigte einen nur sehr schwachen Peak bei ca. 7 kDa. Für die mit Molybdän inkubierte Gruppe ist dieser um ein Vielfaches deutlicher.

4.6 Zusammenfassung

Durch Untersuchungen mittels Zellvitalitätstest konnte gezeigt werden, dass Konzentrationen von Ammonium-Molybdat ab 1 mg/l für die humane Karzenomzelllinie HT29 toxisch wird. Dieses äußerte sich durch morphologische Veränderungen sowie einem stark verringerten Zellwachstum. Bei einer Konzentration von 500 µg/l konnte mittels SEC-ICP-MS gezeigt werden, dass es zu einer stärkeren Expression eines 7 kDa-Molybdän-bindenden Proteins geführt hat.

4.7 Biochemische Trennverfahren und Autoradiographie

4.7.1 Auftrennung ⁷⁵Se markierter Proteine mittels SDS-PAGE und Detektion des Tracers durch Autoradiographie

Die Detektion von Selen erfolgte bisher mittels elementanalytischer Methoden. In Ergänzung dazu wurden proteinchemische Untersuchungen mit Hilfe des Radiotracer ⁷⁵Se durchgeführt. Dieser wurde den Tieren mit unterschiedlichem Selenstatus intraperitoneal appliziert. Die Markierung der Tiere erfolgt durch ⁷⁵Se mit hoher spezifischer Aktivität von ca. 75 MBq. Die Verteilung dieses Radionuklids wurde für die Gewebe des gastrointestinalen Traktes untersucht. Aufgrund der kovalenten Bindungsform des Selens in den Proteinen als Selenocystein ist SDS-PAGE und die anschließende autoradiographische Detektion des Isotops ⁷⁵Se zur Auftrennung der Selenoproteine hervorragend geeignet.

4.7.1.1 Auftrennung der ⁷⁵Se-Proteine in den Homogenaten verschiedener Gewebe mittels SDS-PAGE und Detektion des Tracers durch Autoradiographie

Die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE erfolgte für die Homogenate von Zunge, Magen, Dünndarm und Dickdarm von selenmangelernährten Tieren. Die Lokalisierung der ⁷⁵Se-haltigen Proteinbanden erfolgte mit Hilfe der Autoradiographie. Die Abbildung 129 zeigt ein Autoradiogramm der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine von Homogenaten des gastrointestinalen Traktes sowie der Leber als Stoffwechselvergleichsorgan eines Se(-)-Tieres, welches mit ca. 75 MBq ⁷⁵Se markiert wurde. Fünf Tage nach der Markierung wurde das Tier getötet und die Organe präpariert. Die Gewebe wurden mit einem Homogenatpuffer bestehend aus 5 mmol MgCl₂·6 H₂O, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) und einem Proteaseinhibitorcocktail homogenisiert. Für die SDS-PAGE wurden aber anstelle der gleichen Proteinmengen die gleichen Tracermengen für jedes Gewebe aufgetragen, da sich die aufgenommenen Mengen an ⁷⁵Se zum Teil erheblich von einander unterscheiden und dies zu Störungen bei der Belichtung der Imager-Platte führen kann.

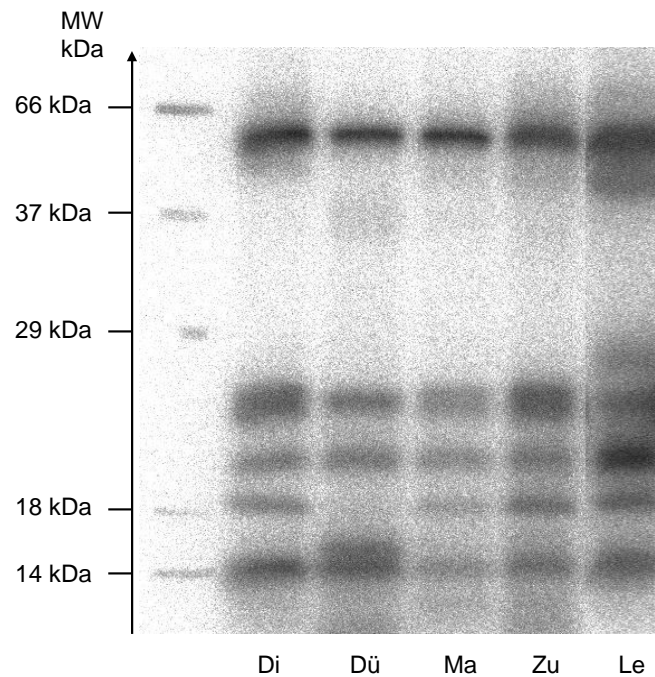


Abb. 129: Autoradiogramm ^{75}Se markierter Proteine in den Homogenaten von Di = Dickdarm, Dü = Dünndarm, Ma = Magen, Zu = Zunge und Le = Leber nach SDS-PAGE

Das Autoradiogramm zeigt bei allen Homogenaten im Bereich von 55 kDa eine starke Bande. Diese Banden können der Thioredoxin-Reduktase (TrxR) [88,89] zugeordnet werden. Des Weiteren sind in allen Homogenaten Banden im Bereich von 23 kDa (Glutathion-Peroxidase GPx) [90,91], im Bereich von 20 kDa (Phospholipid-Hydroperoxid-GPx PHGPx) [92], bei ca. 18 kDa (18 kDa-Selenoprotein) [93] - mit Ausnahme des Dünndarms, wo diese Bande lediglich schattenhaft erkennbar ist - und im Bereich von 15 kDa (15 kDa-Selenoprotein) zu beobachten [94]. Im Homogenat des Dünndarms ist im Bereich von 36-40 kDa eine schwach markierte Bande zu erkennen. Weiterhin sind bei ca. 16 kDa und 10 kDa zwei zusätzliche Banden detektiert worden [95,96]. Die bei ca. 10 kDa detektierte Bande im Homogenat des Dünndarms ist auch im Homogenat der Zunge zu erkennen. Das Autoradiogramm des Magenhomogenats zeigt eine zusätzliche Bande im Bereich von ca. 13 kDa. Für das Stoffwechselvergleichsorgan Leber zeigt das Autoradiogramm zusätzlich Banden im Bereich von 45 kDa (Selenoprotein P SelP) sowie bei ca. 28 kDa (Deiodase DI) [97,98]. In Abbildung 130 wurden zum Vergleich das Homogenat und das Zytosol eines Se(-)-Tieres aufgetragen.

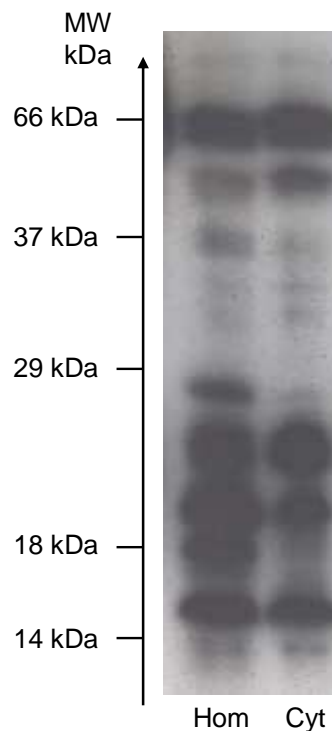


Abb. 130: Autoradiogramm ⁷⁵Se markierter Proteine im Hom = Homogenat und im Cyt = Zyotsol der Leber eines Se(-)-Tieres nach SDS-PAGE

Die im Homogenat gezeigten Banden der Selenoproteine sind größten Teils auch im Zytosol wieder zu finden. Das Zytosol zeigt allerdings im Bereich von 28 kDa sowie bei ca. 18 kDa keine Bande.

4.7.1.2 Auftrennung der ⁷⁵Se-Proteine im Homogenat der humanen Karzenomzelllinie HT29 mittels SDS-PAGE und Detektion des Tracers durch Autoradiographie

Mittels SDS-PAGE wurden die Proteine der humanen Karzenomdickdarmzelllinie HT29 aufgetrennt und die enthaltenen Selenoproteine mit Hilfe der Autoradiographie lokalisiert. Dafür wurde dem Nährmedium der Zellen ⁷⁵Se in Form von Natriumselenit mit einer spezifischen Aktivität von 9 kBq zugeführt. Die Homogenisierung erfolgte wie in 2.2.1.1 beschrieben wurde. Die Abbildung 131 zeigt das Autoradiogramm vom Homogenat der Zelllinie.

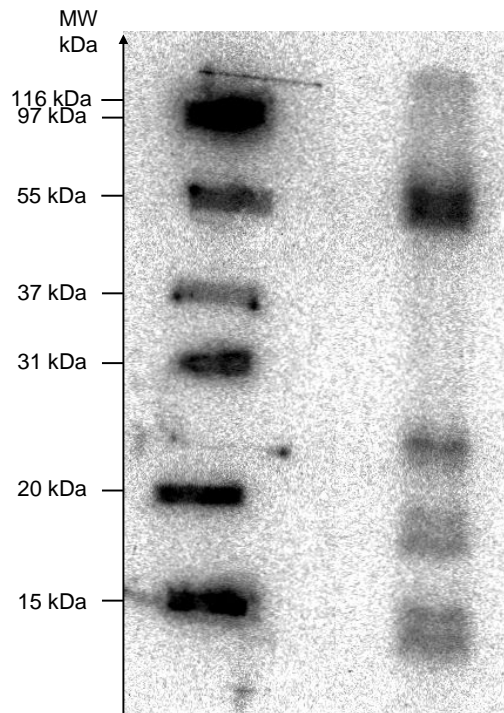


Abb. 131: Autoradiogramm ^{75}Se markierter Proteine im Homogenat der Zelllinie HT29 nach SDS-PAGE (links: Markerprotein, rechts: Homogenat)

Für die humane Karzenomdickdarmzelllinie HT29 wurden Selenoproteine im Bereich von 55 kDa, 23 kDa, 18 kDa, 15 kDa und 13 kDa nachgewiesen.

4.7.2 Untersuchungen zur Selenoproteinverteilung mittels 2D-Gelelektrophorese und autoradiographischer Detektion

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese kombiniert man zwei unabhängige Trennverfahren. Als erstes separiert die isoelektrische Fokussierung die Proteine ihrer Ladungsunterschiede (pI) nach. Im zweiten Schritt werden sie durch SDS-Gelelektrophorese nach ihren molekularen Massen getrennt. Durch dieses Verfahren können die Selenoproteine mit ihren Isoformen in einer hohen Auflösung dargestellt werden, was durch eine einfache SDS-PAGE nicht möglich ist. Da man im Vergleich zur SDS-PAGE wesentlich geringere Mengen Protein auftragen kann, ist es möglich, dass die ^{75}Se markierten Proteine in zu geringer Konzentration vorhanden sind, um autoradiographisch eindeutig nachweisbar zu sein.

4.7.2.1 Untersuchungen zur Selenoproteinverteilung mittels 2D-Gelelektrophorese und autoradiographischer Detektion in der Zunge

Für die Untersuchungen zur Selenoproteinverteilung wurden die Proteine in den Gewebehomogenaten der Zunge eines selenadäquat und eines selenmangelernährten Tieres mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. In Abbildung 132 sind die Autoradiogramme nach 2D-Gelelektrophorese dargestellt.

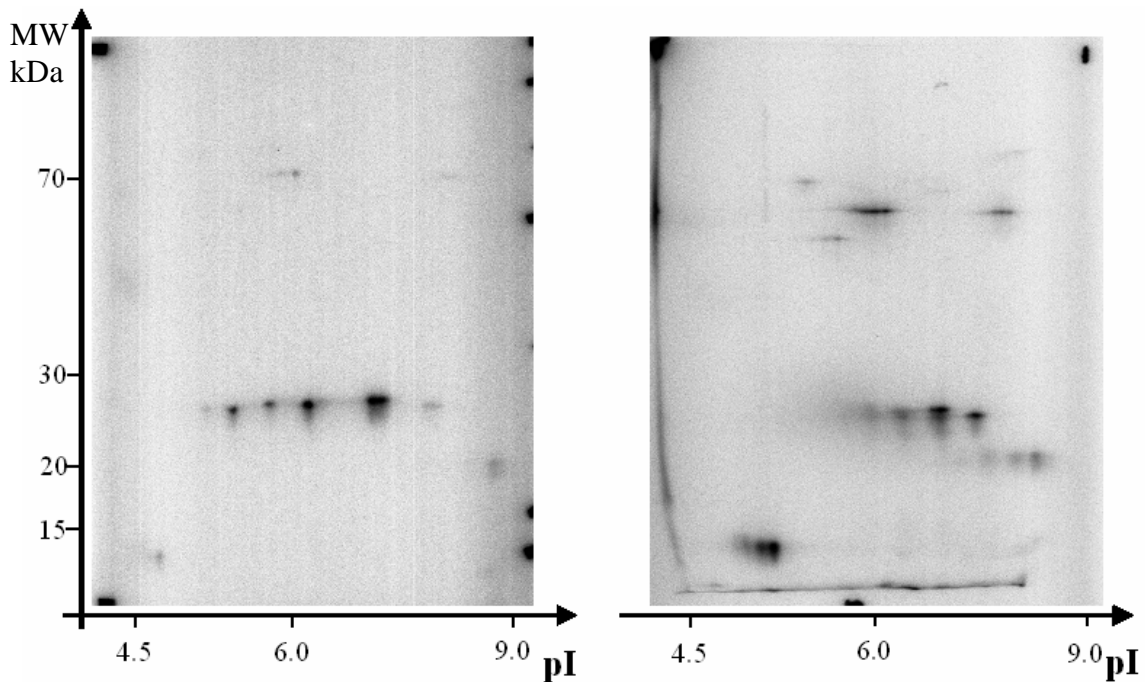


Abb. 132: Autoradiogramm der mit ^{75}Se markierten Proteine in den Homogenaten der Zunge für Se(+)- auf der linken Seite und Se(-)-Tiere auf der rechten nach IEF/SDS-PAGE

Im Homogenat der Zunge des Se(+)-Tieres sind die intensivsten Spots bei ca. 25 kDa erkennbar. In diesem Molmassenbereich befinden sich die GPx, die PIGPx und GIGPx. Hier sind ebenfalls sehr intensive Spots beim Se(-)-Tier zu sehen. Außerdem sind im Bereich von 15 kDa, 20 kDa, 45 kDa und 55 kDa deutliche Signale erkennbar, die dem sauren 15 kDa Selenoprotein, der PHGPx, dem SeIP bzw. der TrxR zugeordnet werden können.

4.7.2.2 Untersuchungen zur Selenoproteinverteilung mittels 2D-Gelelektrophorese und autoradiographischer Detektion im Magen

Die folgenden Autoradiogramme (Abbildung 133) zeigen die selenhaltigen Proteine nach der 2D-Gelelektrophorese, die im Homogenat vom Magen eines Se(+)- bzw. eines Se(-)-Tieres detektiert werden konnten.

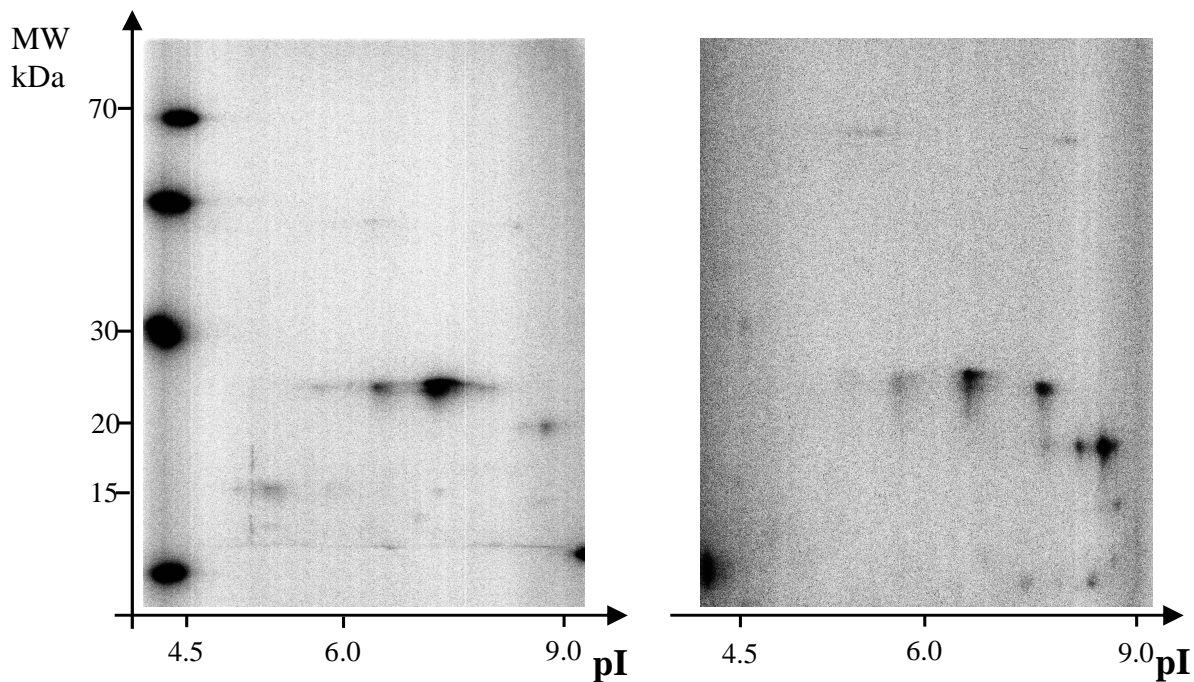


Abb. 133: Autoradiogramm der mit ^{75}Se markierten Proteine in den Homogenaten des Magens für Se(+)- auf der linken Seite und Se(-)-Tiere auf der rechten nach IEF/SDS-PAGE

Die stärksten Spots im Homogenat des Se(+)-Tieres konnten im Bereich von 25 kDa (GPx) detektiert werden. Im Vergleich dazu sind bei ca. 20 kDa (PHGPx) und 15 kDa (saures 15 kDa Selenoprotein) weniger intensive Spots zu erkennen. Das Autoradiogramm vom Homogenat des Se(-)-Tieres weist am deutlichsten erkennbare Signale bei ca. 25 kDa und 20 kDa auf, wobei der Spot bei 20 kDa und mit dem pI-Wert von ca. 8,5 der PHGPx angehört. Als leichte Schwärzungen sind Spots im Bereich von 55-60 kDa (TrxR) zu erkennen.

4.7.2.3 Untersuchungen zur Selenoproteinverteilung mittels 2D-Gelelektrophorese und autoradiographischer Detektion im Dünndarm

Die Selenoproteinverteilung wurde für die Homogenate des Dünndarms von Se(+)- und Se(-)-Tieren untersucht. Dafür wurden die Proteine mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und die mit ^{75}Se markierten Proteine mit Hilfe der Autoradiographie lokalisiert und in Abbildung 134 dargestellt.

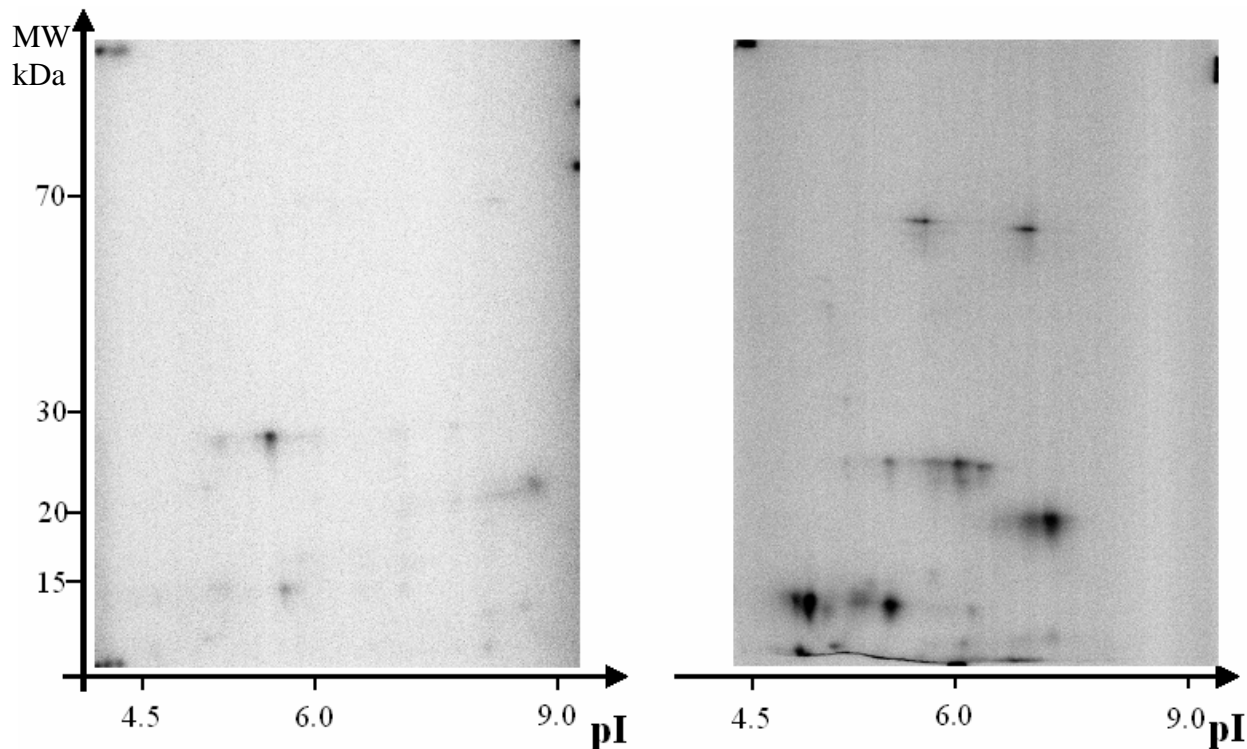


Abb. 134: Autoradiogramm der mit ^{75}Se markierten Proteine in den Homogenaten des Dünndarms für Se(+)- auf der linken Seite und Se(-)-Tiere auf der rechten nach IEF/SDS-PAGE

Im Homogenat des Se(+)-Tieres sind die intensivsten Spots bei ca. 15 kDa (saures 15 kDa Selenoprotein), 20 kDa (PHGPx) und 25 kDa (cGPx und GIGPx) erkennbar. Im Homogenat des Se(-)-Tieres sind in diesem Bereich ebenfalls die intensivsten Signale zu sehen. Zusätzlich sind noch im Bereich von 55-60 kDa (TrxR) Spots zu beobachten.

4.7.2.4 Untersuchungen zur Selenoproteinverteilung mittels 2D-Gelelektrophorese und autoradiographischer Detektion im Dickdarm

Die Selenoproteinverteilung wurde für die Dickdarmhomogenate eines selenadäquat und eines selenmangelernährten Tieres mittels 2D-Gelelektrophorese analysiert. In Abbildung 135 sind die Autoradiogramme nach 2D-Gelelektrophorese dargestellt.

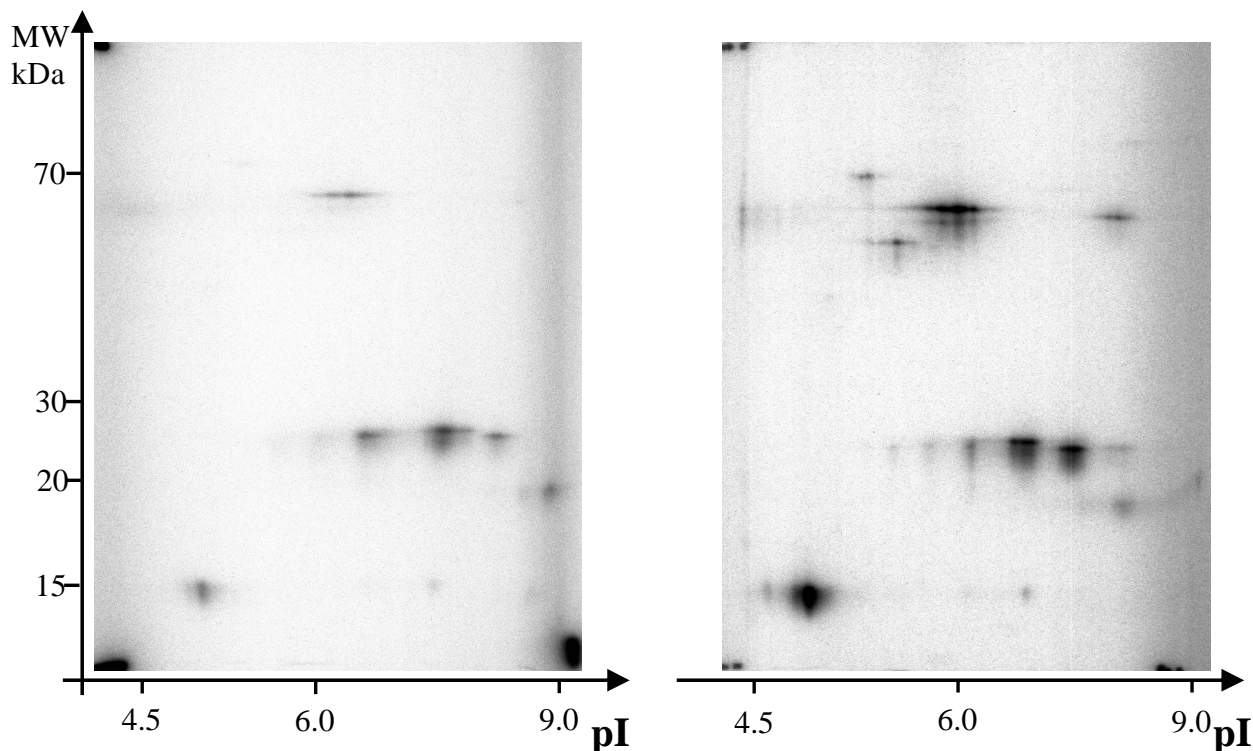


Abb. 135: Autoradiogramm ^{75}Se markierter Proteine in den Homogenaten des Dickdarms für Se(+)- und Se(-)-Tiere nach IEF/SDS-PAGE

Aus den Autoradiogrammen ist zu erkennen, dass die intensivsten Spots im Homogenat des Se(+)-Tieres im Bereich von 15 kDa (saures 15 kDa Selenoprotein), 20 kDa (PHPGx), 25 kDa (GPx) und 55 kDa (TrxR) liegen. Eine ähnliche Verteilung ist auch für das Homogenat des Se(-)-Tieres zu erkennen. Zusätzlich sind noch Spots im Bereich von 50 kDa (SelP) zu sehen.

4.7.3 Unterschiede des Proteoms im Verdauungstrakt der Ratte in Abhängigkeit vom Selenstatus: Lokalisation und Identifizierung

Wie die zuvor in Abschnitt 4.7.2 beschriebene Methode zur Untersuchung der Selenoproteine wurde zur Untersuchung des Proteoms für die Gewebe des Verdauungstrakts der Ratte auch die 2D-Gelelektrophorese (NEPHGE) angewendet. Mit dieser Methode können die Proteine in den Homogenaten des gastrointestinalen Traktes mit einer sehr hohen Auflösung dargestellt werden und zum Vergleich der exprimierten Proteine in den jeweiligen Organen der Se(+)- bzw. Se(-)-Tiere herangezogen werden. Um die Proteine sichtbar zu machen, wurde die Silberfärbung verwendet. In den Gelen (Abbildungen 136, 140, 145, 146) konnten somit zwischen 800 und 2000 Spots pro Gel mit Hilfe der Proteinanalysesoftware MELANIE 6.0 detektiert werden. Mittels dieser Software wurde bei den aufgelösten Proteinen nach Spots gesucht, welche Expressionsunterschiede zwischen selenadäquat- und selenmangelernährten Tieren aufwiesen.

4.7.3.1 Unterschiede des Zunge-Proteoms der Ratte in Abhängigkeit vom Selenstatus: Lokalisation und Identifizierung

Abbildung 136 zeigt die Elektropherogramme der Homogenate der Zunge von einem Se(+)- und Se(-)Tier.

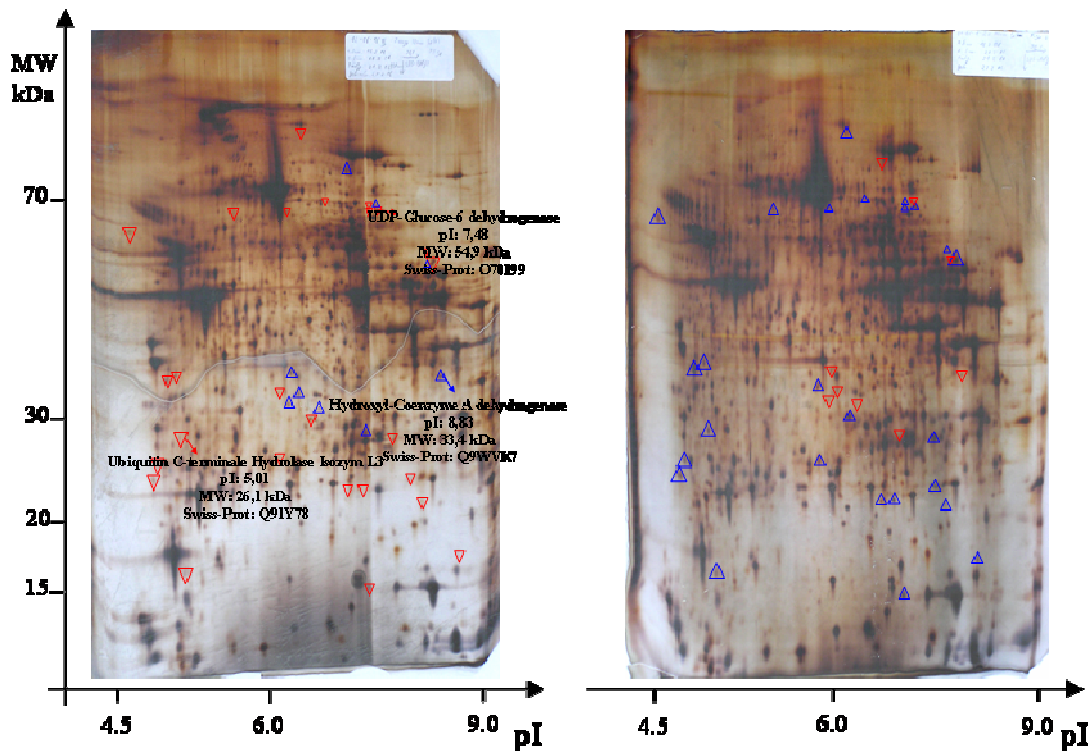


Abb. 136: Elektropherogramm der Zunge-Homogenate von Se(+)- und Se(-)-Tieren; blau: stärker exprimierte Proteine, rot: weniger stark exprimierte Proteine

Mit Hilfe der Auswertungssoftware MELANIE 6.0 konnten 35 Expressionsunterschiede von Proteinen bestimmt werden. Neun von ihnen wurden stärker im Se(+)-Tier und 26 als stärker exprimiert im Se(-)-Tier detektiert. Die im Elektropherogramm beschrifteten Proteine konnten mittels MALDI-MS und mit Hilfe der Protein/Peptid-Datenbank identifiziert werden, indem die Spots ausgestochen und wie in Abschnitt 2.2.2.13 beschrieben analysiert wurden. Die Identifizierung ergab für (1) UDP-Glucose-6 dehydrogenase (MW: 54,9 kDa, pI: 7,48), (2) Hydroxyl-Coenzyme A dehydrogenase (MW: 33,4 kDa, pI: 8,83) und (3) Ubiquitin C-terminale Hydrolase Isozym L3 (MW: 26,1 kDa). Die Search-Parameter sind in den nachfolgenden Tabellen für die jeweiligen Proteine angegeben. Als Datenbank wurde die MSDB 20060831 (3239079 sequences; 1079594700 residues) verwendet. Die in der Zunge identifizierten Proteine sind alle im Stoffwechsel des Verdauungstraktes involviert bzw. beteiligt. Unter der Berücksichtigung des Selenstatus ist die Analyse und Identifikation der genannten Proteine ein neues und erstmalig erzielt Ergebnis.

(1) UDP-Glucose-6 dehydrogenase:

Type of search	Peptide Mass Fingerprint
Enzyme	Trypsin
Variable modifications	N-Acetyl (Protein),N-Formyl (Protein), Propionamide (C)
Mass values	Monoisotopic
Protein Mass	Unrestricted
Peptide Mass Tolerance	± 150 mmu
Peptide Charge State	1+
Max Missed Cleavages	2
Number of queries	49

Tab. 64: Search-Parameter, die für die Proteinidentifikation mittels MALDI-MS für UDP-Glucose-6 dehydrogenase verwendet wurden.

Der Probability Based Mowse Score ist in Abbildung 137 wieder gegeben.

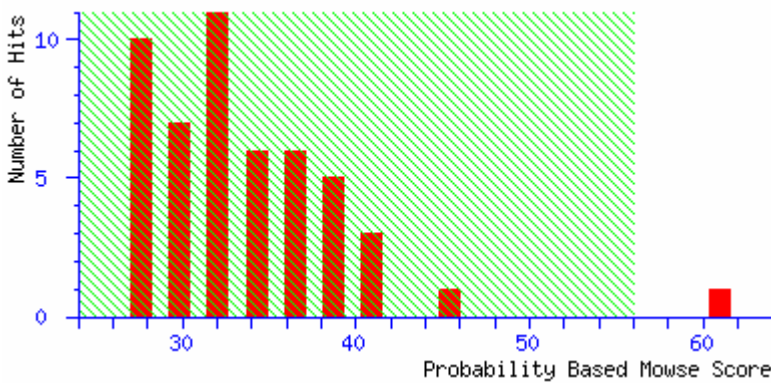


Abb. 137: Probability Based Mowse Score; Ions score ist $-10 \cdot \log(P)$, wobei P die Wahrscheinlichkeit wiedergibt, dass es sich bei dem beobachteten Treffer um einen zufälliges Ereignis handelt. Protein scores größer als 56 sind als signifikant zu erachten ($p < 0.05$).

Die Anzahl der gesuchten Massen war 49, und die Anzahl der übereinstimmenden Peptidmassen betrug 12. Damit wurde eine Sequenzübereinstimmung von 26 % erreicht. Die übereinstimmenden Peptide (in rot) und die zutreffenden Sequenzen sind nachfolgend gezeigt.

```

1  MVEIKKICCI  GAGYVGGPTC  SVIARMCEPI  RVTVVDVNEA  RINAWNSPTL
51  PIYEPGLKEV  VESCRGKNLF  FSTNIDDAIR  EADLVFISVN  TPTKTYGMGK
101 GRAADLKYIE ACARRIVQNS NGYKIVTEKS TVPVRAAESI RRIFDANTKP
151 NLNLQVLSNP  EFLAEGTAIK  DLKNPDRVLI  GGDETPEGQR  AVQALCAVYE
201 HWVPKEKILT TNTWSSELSK LAANAFLAQR  ISSINSISAL  CESTGADVEE
251 VATAIGMDQR  IGNKFLKASV GFGGGCFQKD VLNLVYLCEA LNLPEVARYW
301 QQVIDMNDYQ  RRRFASRIID SLFNTVTDKK IAILGFAFKK DTGDTRESSS
351 IYISKYLMDE  GAHLHIYDPK  VPREQIVVDL  SHPGVSADDQ  VSRLVTISKD
401 PYEACDGAHA  LVICTEWD MF  KELDYERIHK RMLKPAFIFD GRRVLDGLHN
451 ELQTIGFQIE  TIGKKVSSKR  IPYTPGEIPK  FSLQDPPNKK  PKV

```

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
103 - 114	1323.65	1322.65	1322.67	-0.02	1	AADLKYIEACAR
108 - 114	825.27	824.27	824.39	-0.12	0	YIEACAR
116 - 135	2232.31	2231.31	2231.23	0.08	2	IVQNSNGYKIVTEKSTVPVR
208 - 220	1479.71	1478.71	1478.76	-0.05	0	ILTTNTWSSELSK
268 - 279	1157.59	1156.58	1156.53	0.05	0	ASVGFGGGCFQK
280 - 298	2215.15	2214.15	2214.17	-0.02	0	DVLNLVYLCEALNLPEVAR Propionamide (C)
318 - 329	1365.64	1364.63	1364.72	-0.08	0	IIDSLFNTVTDK
318 - 330	1493.68	1492.68	1492.81	-0.13	1	IIDSLFNTVTDKK
331 - 340	1107.55	1106.55	1106.69	-0.13	1	TAILGFAPFK
422 - 430	1202.51	1201.51	1201.61	-0.10	1	ELDYERIHK
431 - 443	1606.86	1605.86	1605.89	-0.04	2	RMLKPAFIFDGRR
471 - 480	1114.61	1113.60	1113.61	-0.00	0	IPYTPGEIPK

No match to: 787.36, 823.25, 832.50, 835.23, 849.67, 854.60, 876.57, 973.58, 994.15, 1033.55, 1036.20, 1060.56, 1064.56, 1073.58, 1082.57, 1092.52, 1136.60, 1140.57, 1225.09, 1235.54, 1302.68, 1308.65, 1320.60, 1380.67, 1392.66, 1507.75, 1551.73, 1624.86, 1657.80,

(2) Hydroxyl-Coenzyme A dehydrogenase:

Type of search	Peptide Mass Fingerprint
Enzyme	Trypsin
Variable modifications	Oxidation (M),Propionamide (C)
Mass values	Monoisotopic
Protein Mass	35 kDa
Peptide Mass Tolerance	± 75 mmu
Peptide Charge State	1+
Max Missed Cleavages	2
Number of queries	59

Tab. 65: Search-Parameter, die für die Proteinidentifikation mittels MALDI-MS für Hydroxyl-Coenzyme A dehydrogenase verwendet wurden.

Der Probability Based Mowse Score ist in Abbildung 138 wieder gegeben.

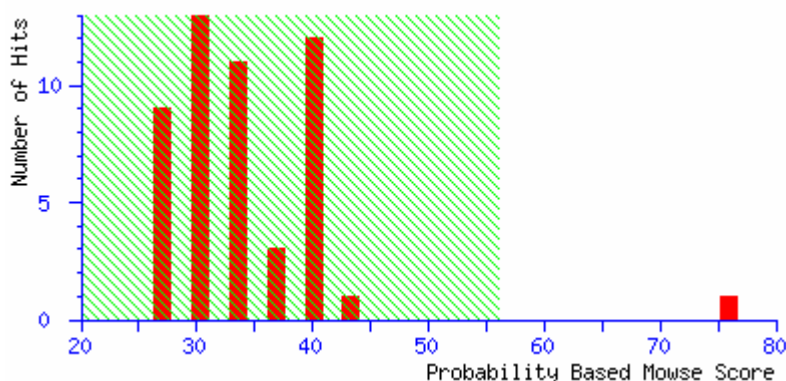


Abb. 138: Probability Based Mowse Score; Ions score ist $-10 \cdot \log(P)$, wobei P die Wahrscheinlichkeit wiedergibt, dass es sich bei dem beobachteten Treffer um einen zufälliges Ereignis handelt. Protein scores größer als 56 sind als signifikant zu erachten ($p < 0.05$).

Die Anzahl der gesuchten Massen war 59, und die Anzahl der übereinstimmenden Peptidmassen betrug 13. Damit wurde eine Sequenzübereinstimmung von 44 % erreicht. Die übereinstimmenden Peptide (in rot) und die zutreffenden Sequenzen sind nachfolgend gezeigt.

1 MAFVTRQFVR SMSSSSSASA AAKKILIKHV TVIGGGLMGA GIAQVAAATG
 51 HTVVLVDQTE DILAKSKGI EESLKRMAKK KFTENPKAAD EFVEKTLSSL
 101 STSTDAASVV HSTDLVVEAI VENLKLKNEF FQRLDKFAAE HTIFASNTSS
 151 LQITNIANAT TRQDRFAGLH FFPNPVPMML VEVIKTPMST QKTFESLVDF
 201 CKTLGKHPVS CKDTPGFIVN RLLVPYLIEA IRLHERGDAS KEDIDTAMKL
 251 GAGYPMGPFELLDYVGLDIT KFIELDGWHEM DPENPLFQPS PSMNNLVAQK
 301 KLGKKTGEGF YKYK

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
68 - 76	1059.64	1058.64	1058.61	0.03	2	KGIEESLKR
126 - 133	1047.63	1046.62	1046.59	0.04	1	LKNELFQR
134 - 162	3135.51	3134.51	3134.60	-0.09	1	LDKFAAEHTIFASNTSSLQITNIANATTR
137 - 162	2779.38	2778.37	2778.39	-0.02	0	FAAEHTIFASNTSSLQITNIANATTR
166 - 179	1651.81	1650.81	1650.81	0.00	0	FAGLHFFNPVPMML Oxidation (M)
166 - 179	1667.80	1666.79	1666.80	-0.01	0	FAGLHFFNPVPMML 2 Oxidation (M)
193 - 202	1259.57	1258.57	1258.59	-0.02	0	TFESLVDFCK Propionamide (C)
203 - 221	2140.13	2139.13	2139.13	0.00	2	TLGKHPVSCKDTPGFIVNR Propionamide (C)
207 - 221	1740.86	1739.86	1739.88	-0.02	1	HPVSCKDTPGFIVNR Propionamide (C)
213 - 221	1018.59	1017.59	1017.52	0.06	0	DTPGFIVNR
222 - 232	1299.80	1298.80	1298.80	-0.00	0	LVPYLIEAIR
233 - 249	1915.93	1914.93	1914.91	0.02	2	LHERGDASKEDIDTAMK
250 - 271	2373.19	2372.18	2372.16	0.02	0	LGAGYPMGPFELLDYVGLDITTK Oxidation (M)

No match to: 832.51, 834.56, 881.48, 913.68, 929.65, 931.63, 973.61, 1030.64, 1037.58, 1064.62, 1082.63, 1091.54, 1094.57, 1201.62, 1233.71, 1261.35, 1263.35, 1320.59, 1352.75, 1357.72, 1362.67, 1434.76, 1465.78, 1553.75, 1560.80, 1683.81, 1707.78, 1716.85, 1816.19, 1838.92, 1851.92, 1855.86, 1867.91, 1869.86, 1871.85, 1885.85, 1946.00, 2091.13, 2103.18, 2142.05, 2176.05, 2286.16, 2393.24, 2399.03, 2476.26, 2582.23

(3) Ubiquitin C-terminale Hydrolase Isozym L3:

Type of search	Peptide Mass Fingerprint
Enzyme	Trypsin
Mass values	Monoisotopic
Protein Mass	25 kDa
Peptide Mass Tolerance	± 75 mmu
Peptide Charge State	1+
Max Missed Cleavages	0
Number of queries	39

Tab. 66: Search-Parameter, die für die Proteinidentifikation mittels MALDI-MS für Ubiquitin C-terminale Hydrolase Isozym L3 verwendet wurden.

Der Probability Based Mowse Score ist in Abbildung 139 wieder gegeben.

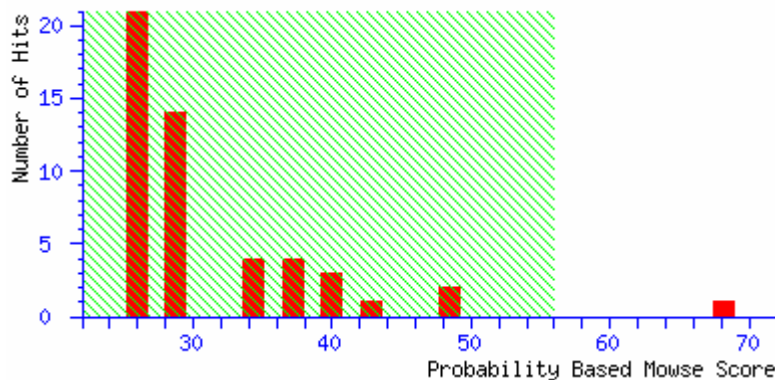


Abb. 139: Probability Based Mowse Score; Ions score ist $-10 \cdot \log(P)$, wobei P die Wahrscheinlichkeit wiedergibt, dass es sich bei dem beobachteten Treffer um einen zufälliges Ereignis handelt. Protein scores größer als 56 sind als signifikant zu erachten ($p < 0.05$).

Die Anzahl der gesuchten Massen war 39, und die Anzahl der übereinstimmenden Peptidmassen betrug 5. Damit wurde eine Sequenzübereinstimmung von 29 % erreicht. Die übereinstimmenden Peptide (in rot) und die zutreffenden Sequenzen sind nachfolgend gezeigt.

```

1 MEGQRWLPLE ANPEVTNQFL KQLGLHPNWQ FVDVYGMEPE LLSMVPRPVC
51 AVLLLLFPITE KYEVRTEEE EKIKSQGDV TSSVYFMKQT ISNACGTIGL
101 IHAIANNKDK MHFESGSALK KFLEESVAMS PEERARHLEN YDAIRVTTHET
151 SAHEGQTEAP SIDEKVDLHF IALVHVDGHL YELDGRKPPF INHGKTSDET
201 LLEDAIEVCK KFMERDPDEL RFNAIALSAA

```

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
6 - 21	1899.01	1898.01	1897.99	0.01	0	WLPLEANPEVTNQFLK
122 - 134	1523.74	1522.74	1522.70	0.04	0	FLEESVAMSPEER
137 - 145	1130.54	1129.54	1129.55	-0.02	0	HLENYDAIR
166 - 186	2418.23	2417.22	2417.25	-0.03	0	VDLHFIALVHVDGHL YELDGR
187 - 195	1037.52	1036.52	1036.58	-0.07	0	KPPFINHGK

No match to: 832.44, 881.45, 974.52, 1060.53, 1091.36, 1143.53, 1157.55, 1201.60, 1234.67, 1261.30, 1263.34, 1308.65, 1320.61, 1434.75, 1465.71, 1486.76, 1491.76, 1551.78, 1707.79, 1838.93, 1872.94, 1890.98, 1903.00, 1913.03, 1931.02, 1954.02, 2134.14, 2367.24, 2398.99, 2566.21, 2582.21, 2872.25, 2902.29, 3052.41

4.7.3.2 Unterschiede des Magen-Proteoms der Ratte in Abhängigkeit vom Selenstatus: Lokalisation und Identifizierung

Die Elektropherogramme der Homogenate des Magens von einem Se(+)- und Se(-)Tier sind in Abbildung 140 wiedergegeben.

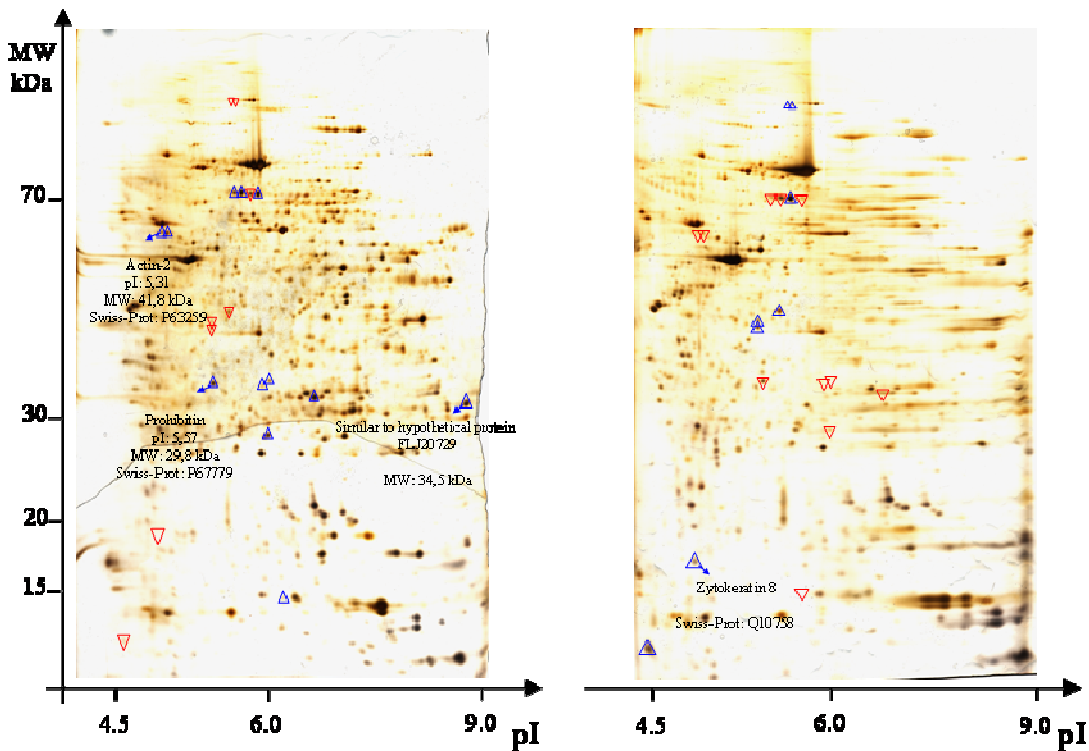


Abb. 140: Elektropherogramm der Magen-Homogenate von Se(+)- und Se(-)-Tieren; blau: stärker exprimierte Proteine, rot: weniger stark exprimierte Proteine

In den beiden Elektropherogrammen konnten 20 Expressionsunterschiede mit Hilfe der Auswertungssoftware MELANIE 6.0 bestimmt werden. Im Se(+)-Tier waren 12 davon höher exprimiert. Acht stärker exprimierte Spots konnten im Se(-)-Tier gezeigt werden. Die Identifizierung der Proteine, die in den Elektropherogrammen beschriftet sind, wurde mittels MALDI-MS und mit Hilfe der Protein/Peptid-Datenbank erreicht. Die Identifizierung ergab für (1) Actin-2 (MW: 41,8 kDa, pI: 5,31), (2) Prohibitin (MW: 29,8 kDa, pI: 5,57) und (3) Zytokeratin und (4) FLJ20729. Die Search-Parameter sind in nachfolgenden Tabellen für die jeweiligen Proteine angegeben. Als Datenbank wurde die NCBI nr (5162317 sequences; 1789512709 residues) verwendet. Actin-Proteine sind in verschiedenen Zellmodalitäten involviert. Prohibitin wird in Verbindung mit diversen Zellfunktionen gebracht, zu denen auch die Zellzykluskontrolle gehört. Zytokeratine gehören zu einer Gruppe von wasserlöslichen Faserproteinen, die Komponenten des Zytoskeletts der Epidermis und anderer Epithelzellen sind. Prohibitin wurde unter anderem von Oh *et al.* mittels 2D-Gelelektrophorese und mit Hilfe der MALDI-MS im Magen-Homogenat der Ratte bestimmt [99]. Unter dem Einfluss des Selenstatus ist die Identifikation der Proteine ein vollkommen neues Ergebnis.

(1) Actin-2:

Type of search	Peptide Mass Fingerprint
Enzyme	Trypsin
Variable modifications	N-Acetyl (Protein), Oxidation (M), Oxidation (HW)
Mass values	Monoisotopic
Protein Mass	Unrestricted
Peptide Mass Tolerance	± 90 mmu
Peptide Charge State	1+
Max Missed Cleavages	0
Number of queries	18

Tab. 67: Search-Parameter, die für die Proteinidentifikation mittels MALDI-MS für Actin-2 verwendet wurden.

Der Probability Based Mowse Score ist in Abbildung 141 wieder gegeben.

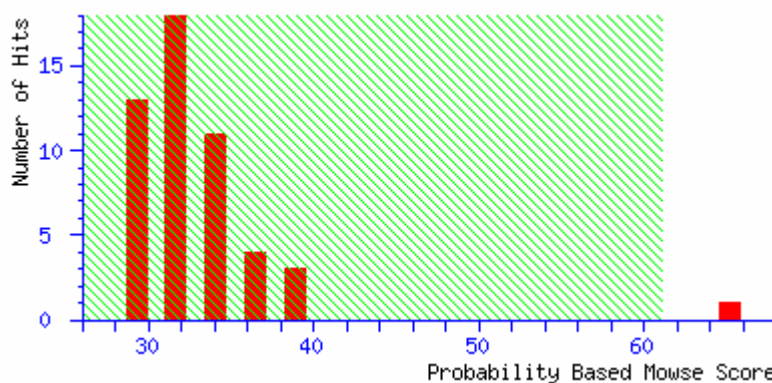


Abb. 141: Probability Based Mowse Score; Ions score ist $-10 \cdot \log(P)$, wobei P die Wahrscheinlichkeit wiedergibt, dass es sich bei dem beobachteten Treffer um einen zufälliges Ereignis handelt. Protein scores größer als 61 sind als signifikant zu erachten ($p < 0.05$).

Die Anzahl der gesuchten Massen war 18, und die Anzahl der übereinstimmenden Peptidmassen betrug 6. Damit wurde eine Sequenzübereinstimmung von 13 % erreicht. Die übereinstimmenden Peptide (in rot) und die zutreffenden Sequenzen sind nachfolgend gezeigt.

```

1  MGFLEVQPRV PLMGAAAHIG QPPLYTIRVL AGPTPFFLGL MLYKVTECWH
51  GFVSAGEQGR LFGPLESRVH VSDGELTFEG AYADVAGVAE LVTPLPRDWD
101 VMAASRTPGD PASPPARHP LRRPSSTPSL GGGGRDRSHT SPPAYTAFLS
151 AAPSSRPLPI AMEEEEIALV IDNGSGMCKA GFAGDDAPRA VFPSIVGRPR
201 HQGVMVGMGQ KDSYVGDEAQ SKRGILTLYK PIEHGIVTNW DDMEKIWHHT
251 FYNELRVAPE EHPVLLTEAP LNPKANREKM TQIMFETFNT PAMYVAIQAV
301 LSLYASGRRT GIVMDSGDGV THTVPIYEGY ALPHAILRLD LAGRDLTDYL
351 MKILTERGYS FTTTAREIV RDIKEKLCYV ALDFEQEMAT AASSSLEKS
401 YELPDGQVIT IGNERFRCPE ALFQPSFLGM ESCGIHETTF NSIMKCDVDI
451 RKDLYANTVL SGGTTMYPGI ADRMQKEITA LAPSTMKIKI IAPPERKYSV
501 WIGGSILASL STFQQMWISK QEYDESGPSI VHRKCF

```

Start	End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Peptide
2	-	9	945.57	944.57	944.51	0.06	0 GFLEVQPR
98	-	106	1082.55	1081.54	1081.45	0.09	0 DWDVMAASR + Oxidation (M)
1	-	9	1118.47	1117.47	1117.56	-0.09	0 MGFLEVQPR + N-Acetyl
358	-	367	1132.50	1131.50	1131.52	-0.02	0 GYSFTTTAER
400	-	415	1790.81	1789.81	1789.88	-0.08	0 SYELPDGQVITIGNER
257	-	274	1954.00	1953.00	1953.06	-0.06	0 VAPEEHPVLLTEAPLNPK

No match to: 1036.51, 1259.59, 1320.49, 1323.58, 1379.63, 1434.66, 1462.65, 1837.86, 2022.84, 2064.10, 2399.05, 3312.54

(2) Prohibitin:

Type of search	Peptide Mass Fingerprint
Enzyme	Trypsin
Variable modifications	N-Acetyl (Protein),Oxidation (M), Oxidation (HW)
Mass values	Monoisotopic
Protein Mass	Unrestricted
Peptide Mass Tolerance	± 90 mmu
Peptide Charge State	1+
Max Missed Cleavages	0
Number of queries	25

Tabelle 68: Search-Parameter, die für die Proteinidentifikation mittels MALDI-MS für Prohibitin verwendet wurden.

Der Probability Based Mowse Score ist in Abbildung 142 wieder gegeben.

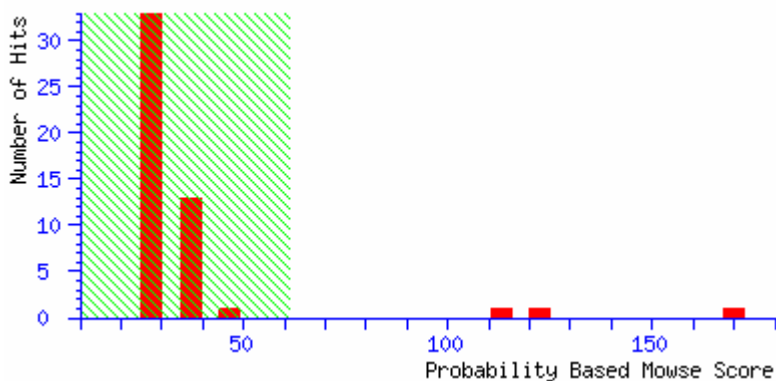


Abb. 142: Probability Based Mowse Score; Ions score ist $-10 \cdot \log(P)$, wobei P die Wahrscheinlichkeit wiedergibt, dass es sich bei dem beobachteten Treffer um einen zufälliges Ereignis handelt. Protein scores größer als 61 sind als signifikant zu erachten ($p < 0.05$).

Die Anzahl der gesuchten Massen war 25 und die Anzahl der übereinstimmenden Peptidmassen betrug 10. Damit wurde eine Sequenzübereinstimmung von 45 % erreicht. Die übereinstimmenden Peptide (in rot) und die zutreffenden Sequenzen sind nachfolgend gezeigt. Durch die Übereinstimmung der bestimmten Peptidmassen, kann gesagt werden, dass die Identifikation des Proteins erfolgreich ist.

```

1  MAAKVFESIG KFG LALAVAG GVN SALYNV DAATDRFRGV QDIVVGEETH
51  FLIPWVQKPI IFDCRSRPRK VPVITGSKDL QNVNITLRIL FRPVASQLPR
101 IYTSIGEDYD ERVLP SITTE ILKSVVARFD AGELITQREL VSRQVSDDLT
151 ERAATFGLIL DDVSLTHLTF GKEFTEAVEA KQVAQQEAER ARFVVEKAEQ
201 QKKAIIISAE GDSKAAELIA NSLATAGDGL IELRKLEAAE DIAYQLSRSR
251 NIT

```

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
70 - 78	928.53	927.53	927.58	-0.05	1	KVPVITGSK
79 - 88	1185.59	1184.59	1184.65	-0.07	0	DLQNVNITLR
89 - 100	1396.75	1395.74	1395.83	-0.09	0	ILFRPVASQLPR
101 - 112	1460.57	1459.56	1459.65	-0.08	0	IYTSIGEDYDER
113 - 123	1213.65	1212.65	1212.73	-0.08	0	VLP SITTEILK
129 - 138	1149.53	1148.52	1148.58	-0.06	0	FDAGELITQR
144 - 152	1062.49	1061.49	1061.50	-0.01	0	QVSDDLTER
182 - 190	1058.49	1057.48	1057.52	-0.03	0	QVAQQEAER
215 - 234	1998.05	1997.05	1997.08	-0.03	0	AAELIANSLATAGDGLIELR
235 - 248	1606.76	1605.76	1605.84	-0.08	1	KLEAAEDIAYQLSR

No match to: 901.47, 991.57, 1037.51, 1107.49, 1117.46, 1165.52, 1190.57, 1235.49, 1254.53, 1315.64, 1365.56, 1493.61, 1635.72, 1707.70, 1934.85

(3) Zytokeratin 8:

Type of search	Peptide Mass Fingerprint
Enzyme	Trypsin
Variable modifications	Oxidation (M)
Mass values	Monoisotopic
Protein Mass	Unrestricted
Peptide Mass Tolerance	± 80 mmu
Peptide Charge State	1+
Max Missed Cleavages	1
Number of queries	28

Tab. 69: Search-Parameter, die für die Proteinidentifikation mittels MALDI-MS für Zytokeratin 8 erwendet wurden.

Der Probability Based Mowse Score ist in Abbildung 143 wieder gegeben.

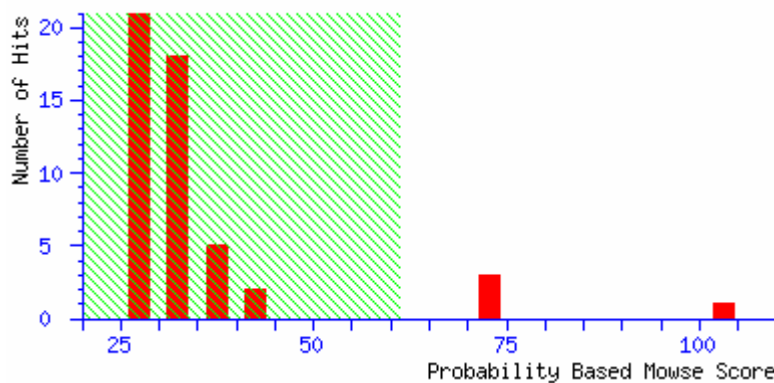


Abb. 143: Probability Based Mowse Score; Ions score ist $-10 \cdot \log(P)$, wobei P die Wahrscheinlichkeit wiedergibt, dass es sich bei dem beobachteten Treffer um einen zufälliges Ereignis handelt. Protein scores größer als 61 sind als signifikant zu erachten ($p < 0.05$).

Die Anzahl der gesuchten Massen war 28, und die Anzahl der übereinstimmenden Peptidmassen betrug 12. Damit wurde eine Sequenzübereinstimmung von 20 % erreicht. Die übereinstimmenden Peptide (in rot) und die zutreffenden Sequenzen sind nachfolgend gezeigt.

1 MSTSGPRAFS SRSFTSGPGA RISSSSFSRV GSSSSSFRGS LGGFGGAGVG
51 GITAVTVNQS LLNPLKLEVD PNIQAVRTQE KEQIKTLNNK FASFIDKVRF
101 LEQQNKMLET KWSLLQQQKT SRSNMDNMF E SYINNLRRQL EALGQEKLKL
151 EVELGNMQGL VEDFKNKYED EINKRTEMEN EFVLIKKDVD EAYMKNVELE
201 SRLEGLTDEI NFLRQIHEEE IRELQSQISD TSVVLSMDNS **RSLDMSIIA**
251 **EVRAQYEEIA NRSRAEAETM YQIKYEELQT LAGK**HGDDL R**SKTEISEMN**
301 **RNISRLQAEI DALKGQRATL EAAIADAEQR** GELAVKDANA KLEDLKNALQ
351 KAK**QDMARQL** REYQELMNVK LALDIEIATY **RKLEGEESR** LESGMQNMSI
401 HTKTTSGYAG GLSSSYGGLT SPGFSYGMSS FQPGFGSVGG SSTYSRTKAV
451 VVKKIETRDG KLVSESSDIM SK

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
242 - 253	1348.60	1347.59	1347.67	-0.08	0	SLDMSIIAEVR
242 - 253	1364.57	1363.57	1363.67	-0.09	0	SLDMSIIAEVR Oxidation (M)
254 - 262	1093.48	1092.48	1092.52	-0.04	0	AQYEEIANR
263 - 274	1442.60	1441.59	1441.69	-0.09	1	SRAEATMYQIK Oxidation (M)
275 - 284	1151.53	1150.53	1150.59	-0.06	0	YEELQTLAGK
292 - 301	1194.52	1193.52	1193.57	-0.05	1	SKTEISEMNR
292 - 301	1210.51	1209.50	1209.57	-0.06	1	SKTEISEMNR Oxidation (M)
306 - 314	1000.55	999.54	999.56	-0.02	0	LQAEIDALK
306 - 317	1341.66	1340.66	1340.74	-0.08	1	LQAEIDALKGQR
318 - 330	1358.61	1357.61	1357.68	-0.08	0	ATLEAAIADAEQR
354 - 361	1033.49	1032.49	1032.51	-0.02	1	QDMARQLR Oxidation (M)
382 - 390	1060.54	1059.53	1059.56	-0.02	1	KLLEGEESR

No match to: 973.53, 982.44, 991.58, 1088.55, 1107.50, 1117.48, 1157.53, 1174.53, 1235.46, 1308.56, 1365.57, 1493.61, 1707.69, 1741.68, 2717.16, 3224.46

(4) FLJ20729:

Type of search	Peptide Mass Fingerprint
Enzyme	Trypsin
Variable modifications	Deamidation (NQ),Oxidation (M), Oxidation (HW)
Mass values	Monoisotopic
Protein Mass	Unrestricted
Peptide Mass Tolerance	± 100 mmu
Peptide Charge State	1+
Max Missed Cleavages	0
Number of queries	17

Tab. 70: Search-Parameter, die für die Proteinidentifikation mittels MALDI-MS für FLJ20729 verwendet wurden.

Der Probability Based Mowse Score ist in Abbildung 144 wiedergegeben.

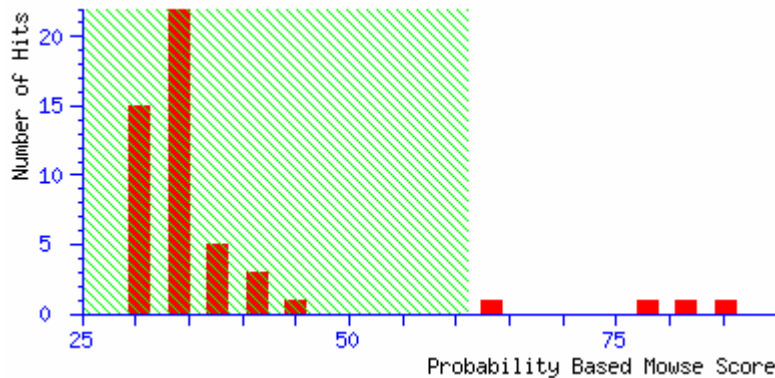


Abb. 144: Probability Based Mowse Score; Ions score ist $-10 \cdot \log(P)$, wobei P die Wahrscheinlichkeit ist, dass es sich bei dem beobachteten Treffer um ein zufälliges Ereignis handelt. Protein scores größer als 61 sind als signifikant zu erachten ($p < 0.05$).

Die Anzahl der gesuchten Massen war 17, und die Anzahl der übereinstimmenden Peptidmassen betrug 11. Damit wurde eine Sequenzübereinstimmung von 32 % erreicht. Die übereinstimmenden Peptide (in rot) und die zutreffenden Sequenzen sind nachfolgend gezeigt.

```

1  MDRVPEEED  CFKREVTEDT  KVKEEPQMNP  RVGCKRKLAM  SRCETCGTEE
51 AKYRCPRCMR  YSCSLPCVKR  HKAELMCSGV  RDKTAYVSLQ  RFTEMNLLSD
101 YRFLEDVART  ADRVSRDIFL  TRPKRKKYLL  FLKNRARKQG  VYLRLLPSGF
151 SKRRENSTVF  DHRNQQFCWH  VKLQFPQSQA  EYVEKRVPDD  KTINEILKPY
201 IDPEKSDPVI  RQRLKAYTQS  QTGVQILMRV  ENMQQNLIRY  YELDPSKSLV
251 NNLRNKVIIE  YPTLHVVLKG  CSNDMQLLHQ  VKSESAQKLG  NGD

```

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
22 - 31	1244.53	1243.53	1243.59	-0.06	1	VKEEPQMNPR Deamidation (NQ); Oxidation
24 - 35	1388.60	1387.59	1387.62	-0.03	1	EPEQMNPRVGCK Deamidation (NQ)
61 - 69	999.46	998.46	998.46	0.00	0	YSCSLPCVK
73 - 81	965.53	964.53	964.45	0.08	0	AELMCSGVR
92 - 102	1405.62	1404.62	1404.62	-0.01	0	FTEMNLLSDYR Deamidation (NQ);
145 - 153	1004.49	1003.49	1003.58	-0.10	1	LLPSGF S KR
154 - 163	1260.52	1259.52	1259.60	-0.08	1	RENSTV F DHR
155 - 163	1121.56	1120.56	1120.48	0.08	0	ENSTV F DHR Deamidation (NQ); Oxidation
164 - 172	1190.55	1189.55	1189.53	0.01	0	NQQFCW H VK Deamidation (NQ)
216 - 229	1596.76	1595.76	1595.80	-0.04	0	AYTQ S QTGVQILMR Deamidation (NQ)
230 - 239	1248.53	1247.52	1247.57	-0.05	0	VENMQQNLIR 4 Deamidation (NQ)

No match to: 899.59, 1053.48, 1119.48, 1300.53, 1436.59, 2085.97

4.7.3.3 Unterschiede des Dünndarm-Proteoms der Ratte in Abhängigkeit vom Selenstatus: Lokalisation und Identifizierung

Abbildung 145 zeigt die Elektropherogramme der Homogenate des Dünndarms von einem Se(+)- und Se(-)Tier.

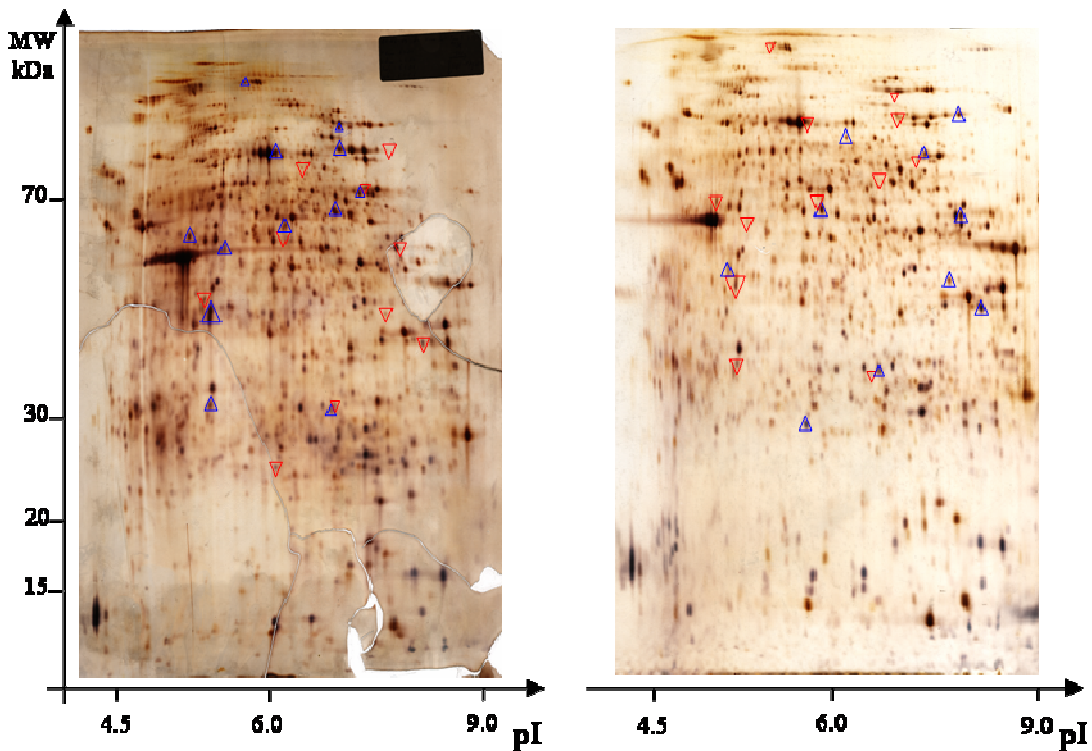


Abb. 145: Elektropherogramm der Dünndarm-Homogenate von Se(+)- und Se(-)-Tieren; blau: stärker exprimierte Proteine, rot: weniger stark exprimierte Proteine
 Mit Hilfe der Auswertungssoftware MELANIE 6.0 konnten 22 Expressionsunterschiede von Proteinen bestimmt werden. 12 von ihnen wurden stärker im Se(+)-Tier und 10 als stärker exprimiert im Se(-)-Tier detektiert. Eine sichere Identifizierung der unterschiedlich exprimierten Spots bzw. der Proteine gelang nicht.

4.7.3.4 Unterschiede des Dickdarm-Proteoms der Ratte in Abhängigkeit vom Selenstatus: Lokalisation und Identifizierung

Die Elektropherogramme der Homogenate des Dünndarms von einem Se(+)- und Se(-)Tier sind in Abbildung 146 wiedergegeben.

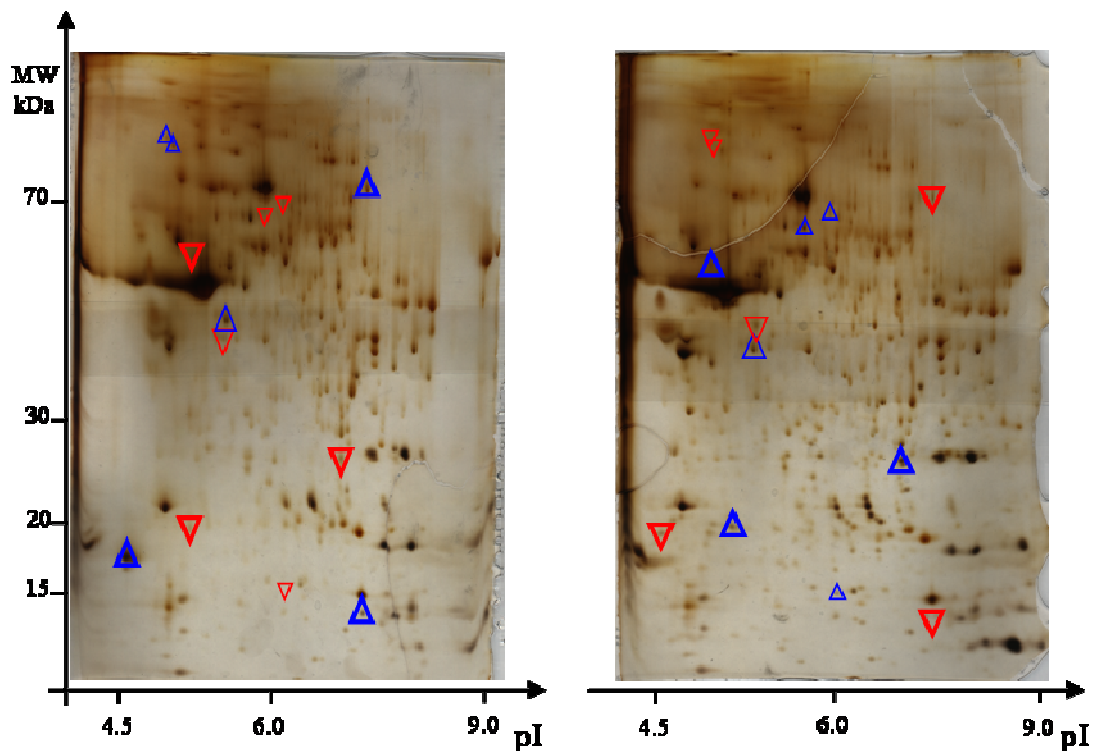


Abb. 146: Elektropherogramm der Dickdarm-Homogenate von Se(+)- und Se(-)-Tieren; blau: stärker exprimierte Proteine, rot: weniger stark exprimierte Proteine

Nach Auswertung der Elektropherogramme konnten durch die Auswertungssoftware MELANIE 6.0 13 Expressionsunterschiede von Proteinen bestimmt werden. Sechs von ihnen wurden stärker im Se(+)-Tier exprimiert. Im Se(-)-Tier konnten sieben Spots als stärker exprimiert detektiert werden. Aufgrund der in der Tat sehr geringen Proteinmengen konnte keine sichere Aussage über die Identifizierung dieser Spots getroffen werden.

4.8 Zusammenfassung

Bei Markierungsversuchen mit radioaktivem ^{75}Se konnte gezeigt werden, dass die Versuchstiere den Radiotracer in die Gewebe und somit in Proteine des gastrointestinalen Traktes inkorporieren. Die Detektion und Lokalisierung der markierten Selenoproteine erfolgte durch Auftrennung der Proteine in den Gewebe-Homogenaten mittels SDS-PAGE oder 2D-Gelelektrophorese und anschließender Autoradiographie. Anhand der Intensität der detektierten Banden scheint jedes Gewebe eine individuelle Zusammensetzung in Bezug auf die Konzentration der Selenoproteine aufzuweisen. Es zeigte sich durch die SDS-PAGE, dass in allen Geweben bei ca. 55 kDa eine Bande zu erkennen war, die der Thioredoxin-Reduktase zugeordnet werden konnte. Ebenfalls ubiquitär verteilt konnte in allen Gewebe-Homogenaten eine Bande bei ca. 23 kDa der Glutathion-Peroxidase, im Bereich von ca. 20 kDa der Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase, bei etwa 18 kDa dem 18 kDa Selenoprotein und im Bereich von 15 kDa dem 15 kDa Selenoprotein, zugeordnet werden. Die Gewebe Zunge und Dünndarm wiesen zusätzlich noch eine weitere Bande bei ca. 10 kDa auf. Im Dünndarm-Homogenat konnte außerdem noch eine diffuse Bande im Bereich von 36-40 kDa detektiert werden. Im Bereich von ca. 13 kDa konnte für das Homogenat vom Magen eine schwache Bande nachgewiesen werden. Für das Stoffwechselvergleichsorgan Leber zeigten sich zusätzliche Banden im Bereich von 45 kDa und 28 kDa, die den Selenoproteinen Selenoprotein P und Deiodase zugeordnet werden

können. Beim Vergleich von Homogenat und Zytosol der Leber war erkennbar, dass die Selenoproteine bei 18 kDa und 28 kDa im Zytosol nicht detektiert werden konnten.

Bei den Untersuchungen zur Selenoproteinverteilung mittels 2D-Gelelektrophorese konnten die meisten und intensivsten Spots in den Homogenaten der Se(-)-Tiere detektiert werden. So wurden im Homogenat der Zunge vom Se(-)-Tier Spots im Bereich von 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 45 kDa und 55 kDa bestimmt. In den Homogenaten des Magens waren die deutlichsten Spots im Massenbereich von 20 kDa und 25 kDa zu erkennen. Ein bei 15 kDa und saurem pI erkennbarer Spot im Se(+)-Homogenat war im Se(-)-Homogenat nicht zu sehen. Dafür konnten im Bereich von 55-60 kDa schwache Signale beobachtet werden. Apparente Massen von 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa und 55-60 kDa für Selenoproteine konnten in den Homogenaten des Dünndarms festgestellt werden. Spots im Bereich von 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 55 kDa und zusätzlich bei 50 kDa wurden für die Dickdarm-Homogenate bestimmt. Durch die erzielten Ergebnisse kann allgemein gesagt werden, dass alle Molekularmassenbereiche der bereits bekannten Selenoproteine gezeigt werden konnten.

Mit Hilfe des Computerprogramms MELANIE 6.0 konnte bei der Analyse der Proteinexpression für die Homogenate der Gewebe des gastrointestinalen Traktes Expressionsunterschiede in jedem Gewebe bestimmt werden. Für die Homogenate der Zunge konnten 35 Unterschiede gezeigt werden. Stärker exprimiert waren dabei 9 Spots im Homogenat der selenadäquat ernährten Tiere. Die Analyse für die Homogenate des Magens ergab 20 Unterschiede, wovon 12 Spots in Se(+)-Tieren stärker exprimierte Spots waren. Die Untersuchung der Homogenate des Dünndarms führte zu 22 signifikanten Expressionsunterschieden. Wesentlich stärker exprimiert waren 12 davon im Se(+)-Homogenat. In den Homogenaten des Dickdarms wurden die wenigsten Unterschiede entdeckt. Von 13 Expressionsunterschieden wurden im Se(+)-Homogenat sechs detektiert.

Mittels MALDI-MS konnten in der Zunge die Proteine UDP-Glucose-6 dehydrogenase, Hydroxyl-Coenzym A dehydrogenase und Ubiquitin C-terminale Hydrolase Isozym L3 identifiziert werden. Weiterhin wurden die Proteine Actin-2, Prohibitin, Zytokeratin 8 und das bisher nur *in silico* bekannte Protein FLJ20729 in den Homogenaten des Magens identifiziert. Die Analyse und Identifikation unter der Berücksichtigung des Selenstatus stellt bislang völlig neu erzielte Ergebnisse dar.

4.9 Detektion und Lokalisation von Spurenelementproteinen mittels Immunotests

Die Immunotests gelten als die spezifischsten Identifizierungsmethoden von Proteinen, sofern geeignete Antikörper zur Verfügung stehen. Durch die SEC-ICP-MS konnte gezeigt werden, dass die Spurenelemente Arsen, Cadmium, Chrom, Kobalt, Kupfer, Eisen, Mangan, Molybdän, Nickel, Selen, Titan, Vanadium und Zink an Proteine gebunden sind. Mit Ausnahme von Selen werden diese Spurenelemente von den Proteinen während der SDS-PAGE durch die Denaturierung der Proteine abgelöst. Versuche, spurenelementbindende Proteine nach der SDS-PAGE mittels LA-ICP-MS nachzuweisen, zeigten weder in den Gelen noch auf PVDF-Membran geblottete Proteine keinerlei positive Signale. Bei Markierungsversuchen mit ⁷⁵Se konnten die Selenoproteine durch SDS-PAGE und 2D-Gelelektrophorese nachgewiesen und zum Teil charakterisiert werden. Im Rahmen der Untersuchungen durch Immunotest wurden die Homogenate der Zunge, des Magens, des Duodenums, des Dünndarms und des Dickdarms von Ratten der beiden Populationen auf die Proteine Superoxid dismutase (SOD), Dermatoptin (DPT), Lysyl oxidase (LOX), Metallothionein (MT), 15kDa Selenoprotein (Sep15) und Plasma Glutathion peroxidas (Gpx3) überprüft. Nach dem Auftrennen der Proteine durch die SDS-PAGE wurden die Proteine auf Nitrocellulosemembran geblottet und mit dem Primären Antikörper ca. 3 h inkubiert. Mittels eines fluoreszierenden sekundären Antikörpers wurde der primäre Antikörper detektierbar. Die Inkubation des sekundären Antikörpers betrug ca. 1h.

4.9.1 Immunochemischer Nachweis von Superoxid dismutase (SOD)

Das Enzym Superoxid dismutase wandelt die Superoxid-Anionen, eine reaktive Sauerstoffspezies, die Proteine oder das Genom schädigen können, in Wasserstoffperoxid um. Die Superoxid-Anionen treten bei der Energiegewinnung in den Mitochondrien als Nebenprodukt auf. Zusammen mit dem Enzym Katalase kann das gebildete Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff katalysiert werden [100]. Bei der SOD kann zwischen der Mn-bindenden und Cu/Zn-bindenden Form unterschieden werden. Die Mn-bindende Form (ca. 25 kDa) ist den Mitochondrien lokalisiert, während die Cu/Zn-bindende SOD (ca. 16 kDa) im Zytosol vorkommt [101]. Der Immunotest erfolgte gegen die Cu/Zn-bindende SOD in den Homogenaten des Verdauungstraktes selenadäquat- und selenmangelernährter Tiere. Den Antikörpertest zeigt Abbildung 147.

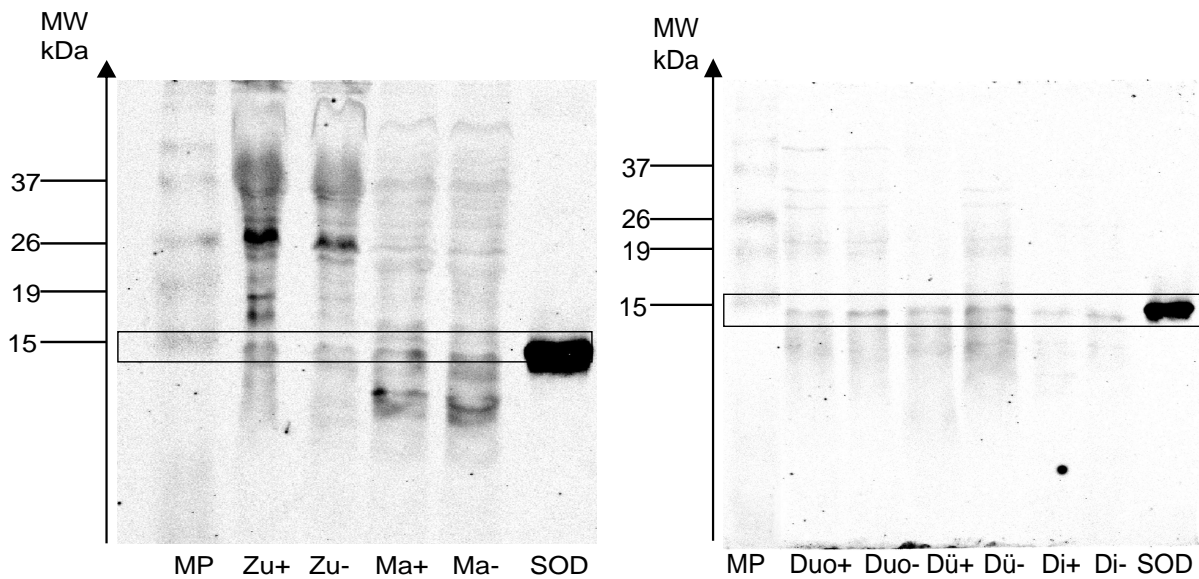


Abb. 147: Antikörpertest zum Nachweis der SOD (Cu/Zn) in den Homogenaten von Se(+)- und Se(-)-Tieren; MP = Markerprotein, Zu = Zunge, Ma = Magen, Duo = Duodenum, Dü = Dünndarm, Di = Dickdarm

Der Antikörpertest für die Cu/Zn-bindende SOD zeigt positive Signale im Bereich von 15 kDa für alle aufgetragene Homogenate. Das heißt, sie ist in allen Gewebekomponenten vorhanden.

4.9.2 Immunochemischer Nachweis von Dermatopontin (DPT)

Das Dermatopontin ist ein weitgehend in der extrazellulären Matrix verteiltes Protein mit relativ kleinem Molekulargewicht von ca. 22 kDa [102-104]. Die extrazelluläre Matrix spielt eine fundamentale Rolle in der Morphogenese, Zelldifferenzierung oder Reparatur [105]. In der Haut ist es hauptsächlich an der Oberfläche der Kollagenfasern lokalisiert. Das auch als TRAMP (tyrosine rich acidic matrix protein) bezeichnete Dermatopontin wird in engem Zusammen mit der Lysyl oxidase gebracht, da bei der Aufreinigung der LOX aus der Haut des Schweins ebenfalls Aufgereinigt auftritt [106]. Der Antikörper Test wurde für die Homogenate des gastrointestinalen Traktes von Se(+)- und Se(-)-Tieren durchgeführt.

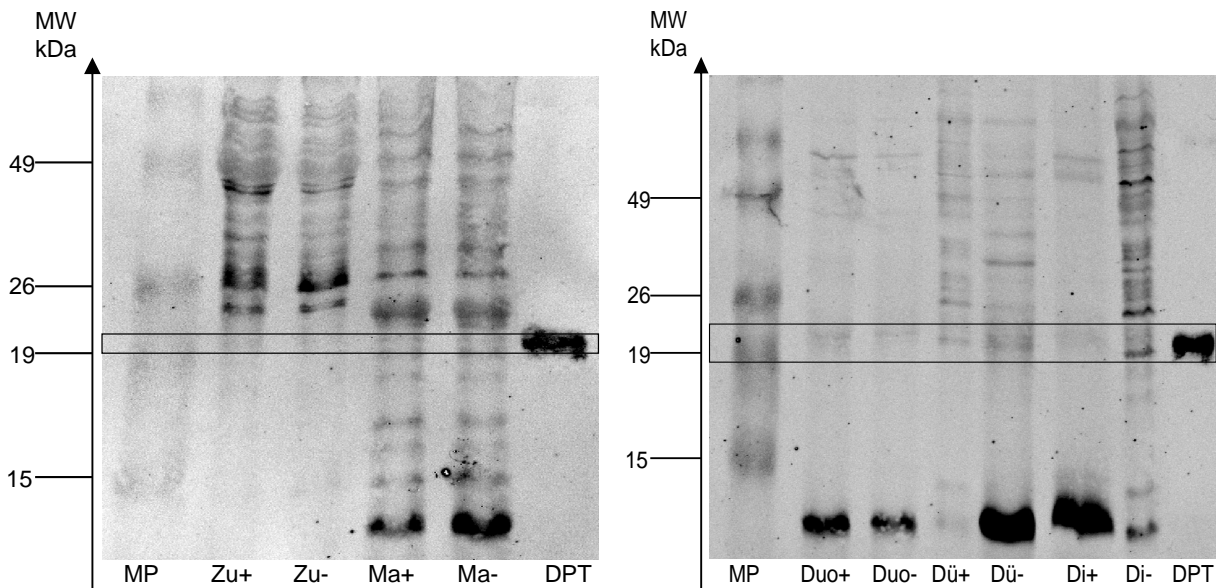


Abb. 148 Antikörpertest zum Nachweis des DPT in den Homogenaten von Se(+)- und Se(-)-Tieren; MP = Markerprotein, Zu = Zunge, Ma = Magen, Duo = Duodenum, Dü = Dünndarm, Di = Dickdarm

Das positive Ergebnis auf den Antikörper Test des kupferbindenden Proteins Dermatopontin zeigt sich für alle eingesetzten Homogenate von Se(+)- sowie Se(-)-Tieren. In den Homogenaten der Zunge von Se(+)- und Se(-)-Tieren scheint es in einer geringeren Konzentration vorhanden zu sein. Die stärkere Expression im Se(-)-Dickdarm-Homogenat gegenüber dem Se(+)-Homogenat ist auf die Unterschiedliche Lauffront der Proteinbanden zurückzuführen. Im Gegensatz zu der in der Literatur angegebenen Molekularmasse von 22 kDa zeigt die Dermatopontin-Bande eine apparente Molekularmasse von ca. 20 kDa.

4.9.3 Immunochemischer Nachweis von Lysyl oxidase (LOX)

Die Lysyl oxidase ist ein extrazelluläres Metalloprotein, welches Kupfer als reaktives Zentrum besitzt [107]. Es oxidiert Peptidyl lysin in Kollagen und Elastin zu Aldehyden. Die Peptidyl aldehyde können spontan durch Kondensation mit benachbarten Amino-Gruppen oder anderen Peptidyl aldehyd-Gruppen kovalente Bindungen eingehen. Dadurch kommt es zur Quervernetzung von Kollagen bzw. Elastin [108]. Diese Quervernetzung ist für die Stabilität von Kollagen und die Elastizität von Elastin essentiell. Die Lysyl oxidase hat eine Molekülmasse von ca. 47 kDa. Untersucht wurden die Homogenate von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm der Se(+)- und Se(-)- Tiere. Der immunochemische Nachweis der LOX ist in Abbildung 149 wiedergegeben.

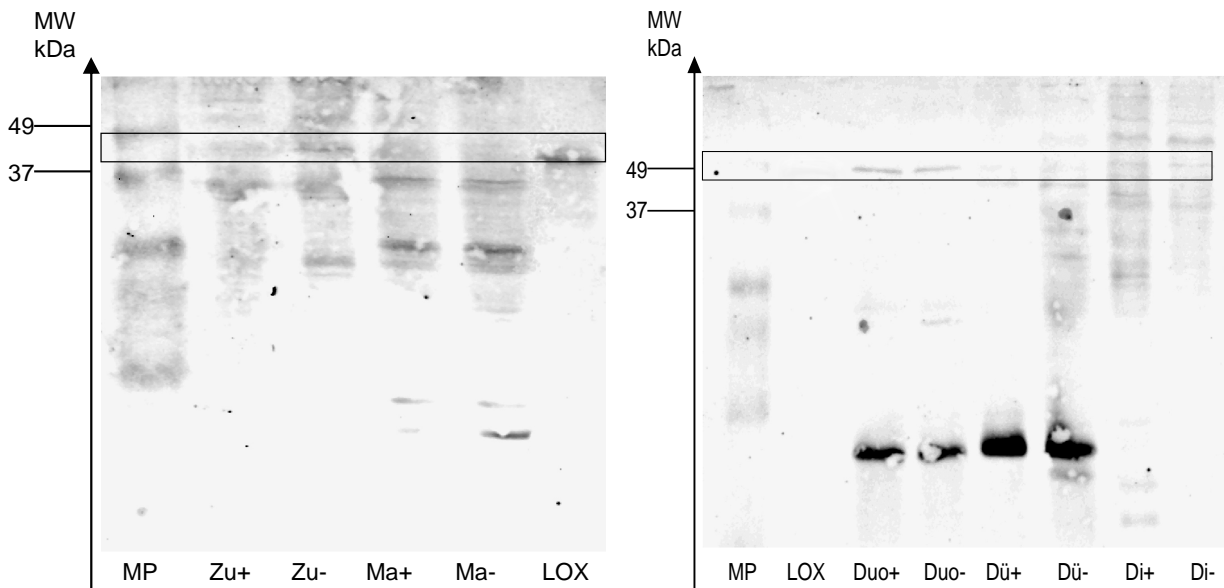


Abb. 149: Antikörpertest zum Nachweis der LOX in den Homogenaten von Se(+)- und Se(-)-Tieren; MP = Markerprotein, Zu = Zunge, Ma = Magen, Duo = Duodenum, Dü = Dünndarm, Di = Dickdarm

Im Bereich von 47 kDa sind positive Signale auf den Antikörpertest der Lysyl oxidase zu erkennen für alle untersuchten Homogenate und entspricht der in der Literatur angegebenen ubiquitären Verteilung der Lysyl oxidase.

4.9.4 Immunochemischer Nachweis von Metallothionein (MT-I/MT-II)

Metallothioneine weisen in der Regel einen hohen Metallgehalt auf. Ihre Funktion besteht aus der homöostatischen Regulation der essentiellen Spurenelemente im Cu- und Zn-Stoffwechsel, dem Metalltransport, als Akutphasenprotein, als Radikalfänger und Antioxidant sowie zur Metaldetoxifikation [109-111]. Bei den Säugetieren gibt es die beiden Hauptisoformen MT-I und MT-II. Sie unterscheiden sich allerdings nur geringfügig in ihrer Aminosäuresequenz, besitzen aber unterschiedliche isoelektrische Punkte. Die Bildung dieser Metallothioneine wird durch Metalle induziert [112]. So bewirkt die Anreicherung von Schwermetallen wie Cadmium einen Anstieg der MT-Gehalte in den Geweben, besonders aber in der Leber und der Niere [113]. Weiterhin wird auch in der Literatur von einem spezifisch in der Zunge vorkommenden MT-IV berichtet [114]. Die Metallothioneine gelten als Proteine mit sehr kleinem Molekulargewicht von 6-7kDa [115].

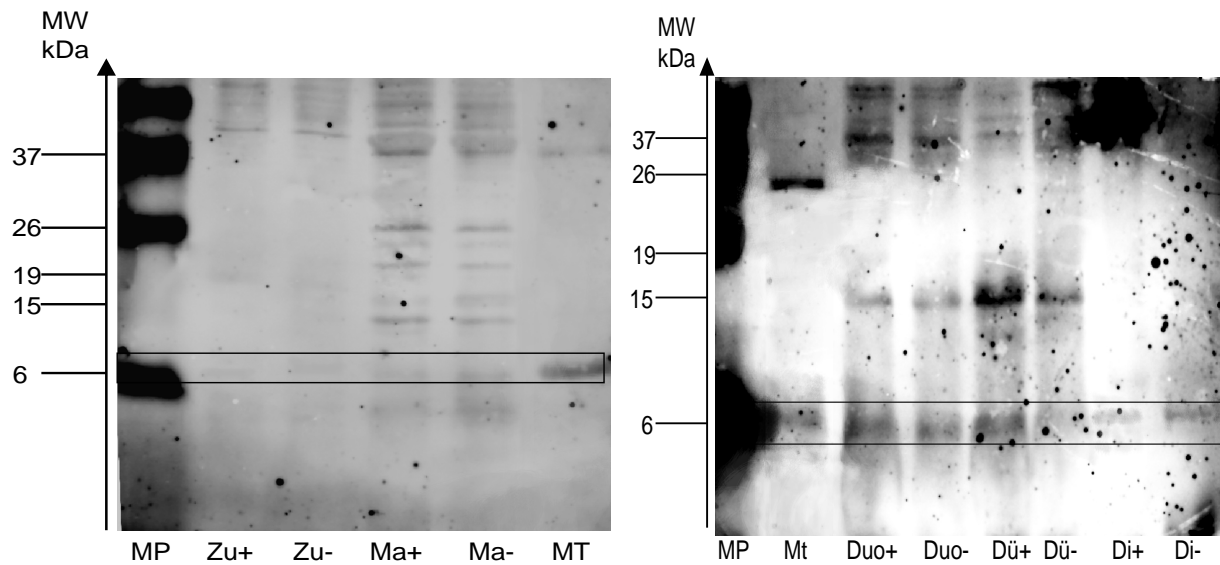


Abb. 150: Antikörpertest zum Nachweis des MT in den Homogenaten von Se(+)- und Se(-)-Tieren; MP = Markerprotein, Zu = Zunge, Ma = Magen, Duo = Duodenum, Dü = Dünndarm, Di = Dickdarm

Der Nachweis von Metallothionein in den Homogenaten des Verdauungstrakts der Se(+)- und Se(-)- Tiere zeigt positive Signale im Bereich von ca 6 kDa. Die Expression dieses Proteins scheint im Duodenum und Dünndarm der beiden Populationen mit unterschiedlichem Selenstatus stärker als in den anderen untersuchten Geweben zu sein.

4.9.5 Immunochemischer Nachweis des 15 kDa Selenoprotein (Sep15)

Die zuvor durchgeführten Autoradiogramme der Homogenate von Zunge, Magen, Dünndarm und Dickdarm von ⁷⁵Se markierten Tieren zeigten Proteinspots im Bereich von 15 kDa. Von diesem Protein ist bislang bekannt, dass es in vielen Geweben exprimiert wird, dessen Funktion allerdings noch nicht bekannt ist [116,117]. Von Kyriakopoulos et. al. konnte gezeigt werden, dass neben der Prostata, dem Gehirn oder der Lunge auch im Dickdarm das 15 kDa Selenoprotein exprimiert wird [118]. Der immunochemische Nachweis des 15 kDa Selenoprotein ist in Abbildung 151 wiedergegeben.

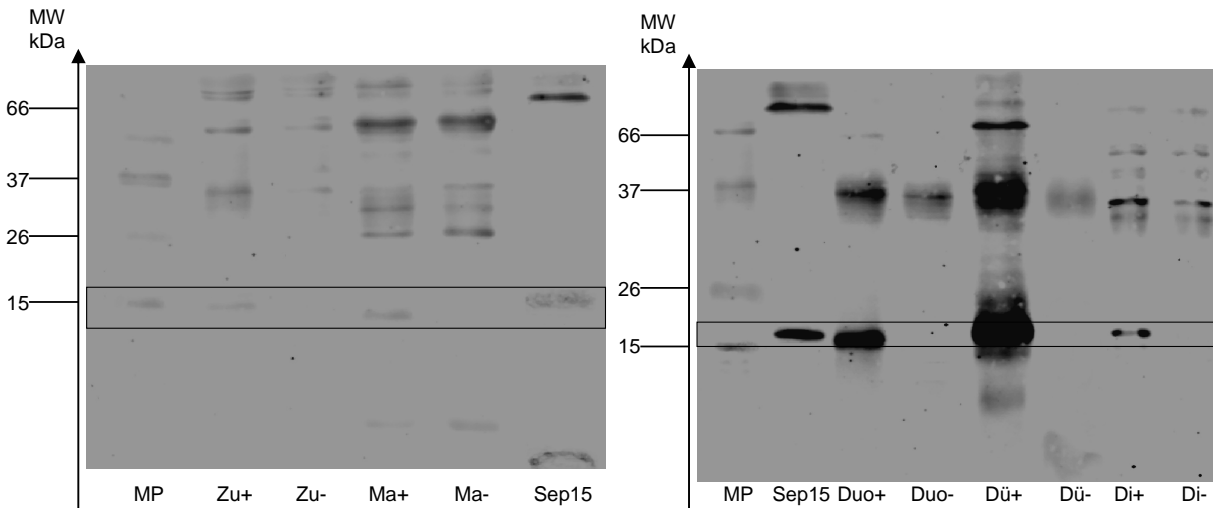


Abb. 151: Antikörpertest zum Nachweis des Sep15 in den Homogenaten von Se(+)- und Se(-)-Tieren; MP = Markerprotein, Zu = Zunge, Ma = Magen, Duo = Duodenum, Dü = Dünndarm, Di = Dickdarm

Die Untersuchung mittels Antikörpertest auf das 15 kDa Selenoprotein für die Homogenate des gastrointestinalen Traktes der Ratte zeigen, dass das 15 kDa Selenoprotein stärker in den selenadäquat ernährten Tieren exprimiert wird. Auch wenn für die selenmangelernährten Tiere kein positives Signal für den Antikörpertest zu erkennen ist, bedeutet es nicht, dass es nicht vorhanden ist, sondern unterhalb der Nachweisgrenze selbst für diese hochempfindliche Methode liegt. Dieser Effekt ist auf den Selenstatus der Tiere zurückzuführen [119]. Die intensivsten Signale für die Se(+)-Homogenate sind im Dünndarm bzw. dem Duodenum zu finden.

4.9.6 Immunochemischer Nachweis der Plasma Glutathion peroxidase (GPx3)

Bekannt sind vier Isoformen der GPx (GPx1-GPx4). Die Gemeinsamkeit aller GPx besteht in der katalytischen Wirkung, bei der Peroxide mit Hilfe von Glutathion zu den entsprechenden Alkoholen umgesetzt werden. Die im Plasma enthaltene GPx3 wird hauptsächlich in den Epithelzellen der proximalen Tubuli der Niere exprimiert und in das Plasma sezerniert [120,121]. Die extrazelluläre Plasma Glutathion peroxidase besitzt eine Molekularmasse von ca. 26 kDa. Abbildung 152 zeigt den Antikörpertest auf die GPx3 in den Homogenaten von Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm und Dickdarm der Se(+)- und Se(-)-Tiere.

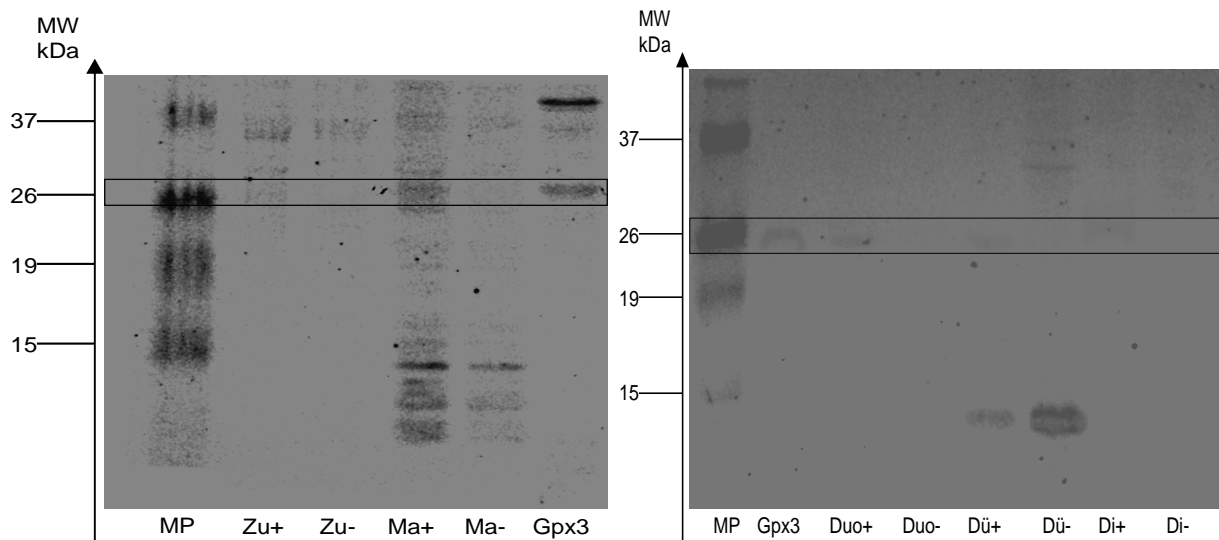


Abb. 152: Antikörpertest zum Nachweis der Gpx3 in den Homogenaten von Se(+)- und Se(-)-Tieren; MP = Markerprotein, Zu = Zunge, Ma = Magen, Duo = Duodenum, Dü = Dünndarm, Di = Dickdarm

Der Antikörpertest auf GPx3 zeigt eine Präsenz des Proteins bei einer Molekularmasse von ca. 26 kDa in allen untersuchten Homogenaten der Se(+)-Tiere. Das stärkste Signal ist im Magen zu erkennen. Im Vergleich mit dem Magen scheint die Expression der GPx3 in den anderen Geweben schwächer zu sein. In den Homogenaten der Se-mangel Tiere ist kein positives Signal erkennbar.

4.10 Zusammenfassung

Durch die Anwendung von spezifischen Antikörpern konnte bei den immunochemischen Untersuchungen von den Homogenaten der Zunge, des Magens, des Duodenums, des Dünndarms sowie des Dickdarms, die Bestandteil des Verdauungstrakts sind, selenadäquat- bzw. selenmangelernährter Tiere spurenelementhaltige Proteine nachgewiesen werden.

Die Cu/Zn-bindende Superoxid dismutas (SOD) konnte in allen untersuchten Gewebe-Homogenaten mittels Antikörpertest gezeigt werden. Als Referenz-Antigen wurde eine von der Firma Biocol gereinigte humane SOD verwendet. Ein Konzentrationsunterschied in der SOD in den Geweben war nicht ersichtlich. Positive Signale auf den Antikörpertest waren im Bereich von 15 kDa erkennbar.

Das laut Literatur 22 kDa große Kupfer bindende Protein Dermatopontin (DPT) wurde in allen aufgetragenen und untersuchten Homogenaten im Bereich von ca. 20 kDa detektiert. Das als Referenz-Antigen aufgetragene porcines DPT erschien aber ebenfalls bei ca. 20kDa. Unterschiede in der Expression gab es dabei weder zwischen den Geweben noch zwischen den beiden Populationen mit unterschiedlichem Selenstatus.

Ein weiteres Kupfer bindendes Protein ist die Lysyl oxidase (LOX). Dieses Protein besitzt eine molekulare Masse von 47 kDa. In diesem Bereich konnten auch positive Signale durch den Antikörpertest auf die LOX in den Homogenaten des Verdauungstrakts gezeigt werden. Ein Expressionsunterschied zwischen den Geweben oder den Se(+)- und Se(-)-Tieren ist nicht ersichtlich.

Im Bereich von 6 kDa konnte durch den Antikörpertest das Protein Metallothionein in den Homogenaten gezeigt werden. Die stärksten positiven Signale auf den Antikörpertest waren in den Homogenaten von Duodenum und Dünndarm der Se(+)- und Se(-)-Tiere zu erkennen. Die Homogenate der Gewebe des gastrointestinalen Traktes von Se(+)- und Se(-)-Tieren und das 15 kDa Selenoprotein als Antigen-Referenz, welches aus einer Rattenprostatazytosol gewonnen und durch Säurefällung sowie Dialyse aufkonzentriert wurde, wurden auf die Präsenz des Sep15 immunologisch untersucht. Dabei zeigte sich deutlich, dass nur in den selenadäquat ernährten Tieren das 15 kDa Selenoprotein nachgewiesen werden konnte. In den Homogenaten der selenmangelernährten Tieren konnte dieses Protein nicht detektiert werden. Die Konzentration dieses Proteins in den Se(-)-Geweben ist selbst für die so nachweisstarke Methode zu gering. Die intensivsten Signale waren in den Homogenaten des Dünndarms und des Duodenums. Das extrazelluläre Selenoprotein Plasma Glutathion peroxidase (GPx3) konnte wie beim 15 kDa Selenoprotein nur in den Homogenaten der Se(+)-Tiere nachgewiesen werden. Die Molekularmasse dieses Proteins liegt bei 26 kDa. Die Expression ist im Vergleich der Se(+)-Homogenate im Magen am Höchsten. Die beiden Selenoproteine Sep15 und GPx3 konnten nur in den Homogenaten selenadäquat ernährter Tiere gezeigt werden. Die vier Metalloproteine SOD, DPT, LOX und MT konnten in allen Homogenaten des gastrointestinalen Traktes detektiert werden.

4.11 Identifizierung des 7 kDa-Molybdän-bindenden Proteins

Für die Identifizierung des 7 kDa-Molybdän-bindenden Proteins wurden jeweils die zytosolischen Proteine des Dickdarms und der Leber mittels Größenausschlusschromatographie nach ihren nativen Molekulargewichten getrennt und in Fraktionen gesammelt. Die Zytosole ließen sich durch Ultrazentrifugation bei 100000 x g für 80 min bei 4°C gewinnen. Diese Fraktionen wurden mit Hilfe der GF-AAS auf Molybdän untersucht. Abbildung 153 bzw. 154 zeigen das Molybdänprofil eines Dickdarmzytosols bzw. Leberzytosols einer Selen-adäquat ernährten Ratte.

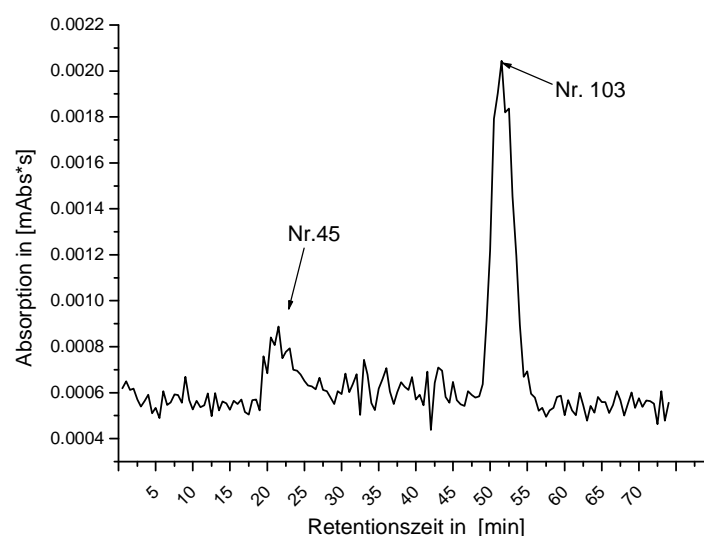


Abb. 153: Dargestellt ist das Molybdänprofil nach chromatographischer Trennung des Dickdarmzytosols einer selenadäquat ernährten Ratte.

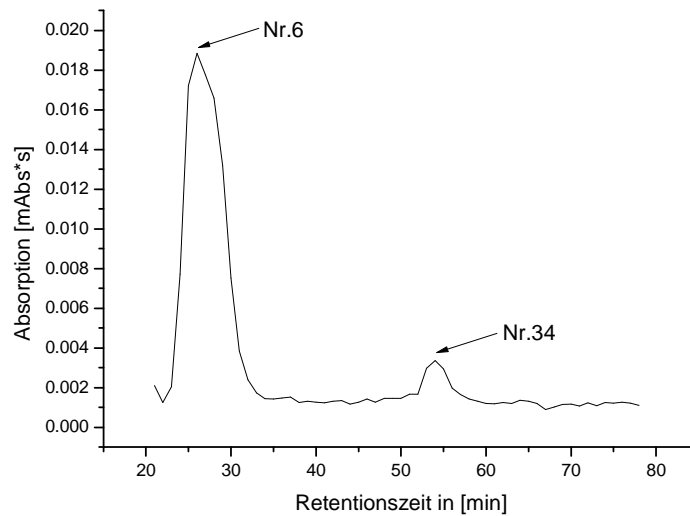


Abb. 154: Dargestellt ist das Molybdänprofil nach chromatographischer Trennung des Leberzytosols einer selenadäquat ernährten Ratte. Der Vorlauf von 20 min wurde verworfen.

Die Fraktionierung des Dickdarmzytosols erfolgte mit 1 ml/30 s. Die durch Säulenkalibrierung zugeordneten Molekularmassen betragen für die Fraktion Nr. 45 ca. 50 kDa und für die Fraktion Nr. 103 ca. 7 kDa. Ähnliche Molekularmassen konnten den Fraktionen Nr. 6 und Nr. 34 des Leberzytosols zugeordnet werden, wobei die Fraktionierung mit 2 ml/min erfolgte. Um eine möglichst hohe Proteinkonzentration zu erhalten wurde bei der Gewinnung des Dickdarmzytosols das Gewebe mit einem 1-fachem Volumen des Organs homogenisiert. Das Lebergewebe hingegen wurde mit einem 3-fachem Volumen des Tris-HNO₃-Puffers (pH 7,4) bezüglich der Feuchtmasse homogenisiert. Trotz dieser Unterschiede in den Zytosolverdünnungen wurde eine 2-mal so hohe Absorptionsrate für Molybdän für das 7 kDa-Molybdän-bindende Protein gefunden. Beim 50 kDa-Molybdän-bindende Protein ist dieser Unterschied sogar noch höher. Aufgrund der viel höheren Proteinkonzentrationen in der Leber, im Verhältnis zu den viel geringeren Proteinkonzentrationen im Dickdarm, wurde für die weiteren Untersuchungen zur Identifizierung des 7 kDa-Molybdän-bindende Proteins das Stoffwechselvergleichsorgan Leber verwendet.

Ein Aliquot von 400 µl der Fraktion 34 wurde lyophilisiert, in 40 µl Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE die Proteine in dieser Fraktion der molekularen Größe nach aufgetrennt. Eingesetzt wurde ein Gel mit hohem Vernetzungsgrad (17 %iges SDS-Gel). Abbildung 155 zeigt das SDS-Gel der Fraktion 34.

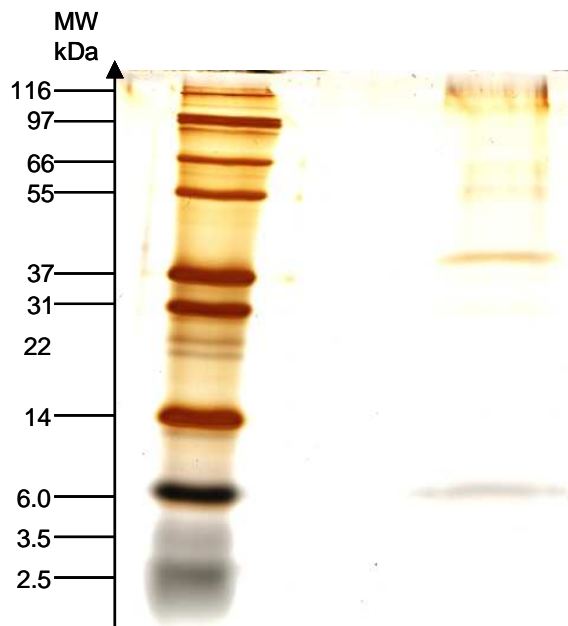


Abb. 155: SDS-Gel der Fraktion 34 aus der Größenausschlusschromatographie (7 kDa-Molybdän-bindendes Protein) rechts; Markerprotein links

Das SDS-Gel zeigt zwei Banden. Die apparenten Molekularmassen betragen ca. 7 kDa und ca. 40 kDa. Die Überprüfung der Einheitlichkeit des 7 kDa großen Proteins erfolgte mit Hilfe der dSDS-PAGE. Hierbei handelt es sich um zwei einander nachgeschaltete Gele verschiedener Vernetzungsgrade. In der ersten Dimension wurde ein 10 %iges SDS-Gel verwendet. Die zweite Dimension bildete ein 15 %iges SDS-Gel.



Abb. 156: SDS-Gel der Fraktion 34 aus der Größenausschlusschromatographie (7 kDa-Molybdän-bindendes Protein) rechts; Markerprotein links

Die dSDS-PAGE zeigt, dass die Hauptspezies bei einer apparenten Molekularmasse von 7 kDa als Spot zu erkennen ist. In diesem Bereich sind jedoch noch weitere Proteine vorhanden. Dieses zeigt sich durch die diffuse Art des Spots.

Die bei einer apparenten Molekularmasse von 7 kDa erhaltene Proteinbande im SDS-Gel wurde ausgestochen und für die Analyse mittels LC/ESI-MS/MS durch In-Gel-Verdauung, wie in 2.2.2.14

beschrieben, vorbereitet. Die Analyse der LC/ESI-MS/MS ergab mehrere Mikrosequenzen. Die statistische Validierung der Suchergebnisse wurde unter Verwendung der Programme Peptide Prophet und Protein Prophet durchgeführt. Diese Programme weisen jedem identifizierten Peptid bzw. Protein eine Wahrscheinlichkeit der richtigen Identifizierung zu. Aus dem Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit verschiedenen Datenbanken wurden sechs potentiell mögliche Proteine identifiziert. Diese sechs Proteine sind: (1) „Putative uncharacterized protein LOC500475“, (2) Transcription factor E3, (3) Tmprss13 (Transmembrane protease, serine 13), (4) Coatomer subunit beta, (5) Zinc finger protein 297B und (6) Nuclear receptor DAX-1.

Die Proteine (2)-(6) sind weitestgehend charakterisierte Proteine, die in keinem Zusammenhang stehen, molybdänhaltig zu sein. Die aus den Datenbanken erhaltenen Informationen bzw. Parameter für die Proteine (2)-(6) sind im Anhang wiedergegeben.

Folgende Informationen konnte für das bislang uncharakterisierte Protein LOC500475 aus den Datenbanken UniProtKB/TrEMBL sowie SWISS-Prot über ExPASy.org (Expert Protein Analysis System) erhalten werden. Der Sequenzvergleich für Sequenzhomologien erfolgte mittels BLAST Network Service. Mit Hilfe von netzbasierenden Analyseprogrammen wie ProtParam und NetPhos ließen sich physikalische und chemische Parameter für das Protein berechnen.

Putative uncharacterized protein LOC500475

Names and origin

Protein names Submitted name:

Putative uncharacterized protein LOC500475 EMBL AAH79053.1

Gene names

Name: LOC500475 RGD 1563460

Organism Rattus norvegicus (Rat) EMBL AAH79053.1

Taxonomic identifier 10116 [NCBI]

Taxonomic lineage Eukaryota > Metazoa > Chordata > Craniata > Vertebrata > Euteleostomi > Mammalia > Eutheria > Euarchontoglires > Glires > Rodentia > Sciurognathi > Muroidea > Muridae > Murinae > Rattus

Protein attributes

Sequence length 491 AA.

Sequence status Complete.

Sequence processing The displayed sequence is not processed.

Protein existence Evidence at transcript level.

ProtParam

```
      10      20      30      40      50      60
MRLRSSIRTG SVMKGRKAFD SMRVVDESQW NEAVCTLAGC QHPQCWASLR RIERGHPRIL

      70      80      90     100     110     120
DTSSKSPWES EDKLPRTLTVV NIMDTCLWAK KRVVQRQASE FTFPKERSLL LKPASKCHGR

     130     140     150     160     170     180
SWKSLRDKDA TSHSRPPKLS VLNLNEAKLP FSGDDRMVV TWVPEEMAKK TIQEKAGVPS

     190     200     210     220     230     240
RSVKRRRKKW GETSKPSLYY RGRRYLRSPA VLVPPPSPVH FLEQLHSEAI PLWAQVDMLP

     250     260     270     280     290     300
QDLLKECILS HEKSTACPEV KMELSKMKKS LPLEKSRPDS AVSSKMYLTI QRLTLQRPSL

     310     320     330     340     350     360
RYPDCLKKLR HNLKRDSWKQ QEEKTSTKKQ EAKKKAKRDV EEQYGEETMS SDSFHDPSFH

     370     380     390     400     410     420
DHVGLRISRR EIERKLLKGE VGMEKTSLER RVSVEEPMAY EFGSYYTASY YTSPESEALLY

     430     440     450     460     470     480
ETIYQDLNDG EETELEVEAF SKDNNPKSLS AVMDNISWNP ELKLLRILQA TEEENEEGHL

     490
SRAQSEASLE A
```

Number of amino acids: 491

Molecular weight: 56567.5

Theoretical pI: 9.15

Amino acid composition:

Ala (A) 27 5.5% Arg (R) 38 7.7% Asn (N) 12 2.4% Asp (D) 22 4.5% Cys (C) 8
1.6% Gln (Q) 18 3.7% Glu (E) 49 10.0% Gly (G) 16 3.3% His (H) 12 2.4% Ile (I)
13 2.6% Leu (L) 50 10.2% Lys (K) 46 9.4% Met (M) 14 2.9% Phe (F) 9 1.8% Pro
(P) 29 5.9% Ser (S) 55 11.2% Thr (T) 23 4.7% Trp (W) 10 2.0% Tyr (Y) 13 2.6%
Val (V) 27 5.5% Pyl (O) 0 0.0% Sec (U) 0 0.0% (B) 0 0.0% (Z) 0 0.0% (X) 0
0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 71

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 84

Carbon	C	2477
Hydrogen	H	3985
Nitrogen	N	715
Oxygen	O	755
Sulfur	S	22

Formula: C₂₄₇₇H₃₉₈₅N₇₁₅O₇₅₅S₂₂

Total number of atoms: 7954

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of M-1 cm-1, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 74870
 Abs 0.1% (=1 g/l) 1.324, assuming ALL Cys residues appear as half cystines

Ext. coefficient 74370
 Abs 0.1% (=1 g/l) 1.315, assuming NO Cys residues appear as half cystines

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
 >20 hours (yeast, in vivo).
 >10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 69.66
 This classifies the protein as unstable.

Aliphatic index: 71.49

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.812

NetPhos

```

MRLRSSIRTGSVMKGRKAFDSMRVVDESQWNEAVCTLAGCQHPQCWASLRRIERGHPRILDTSSKSPWESEDKLPTLTVV      80
NIMDTCLWAKKRVVQRQASEFTFPKERSLLLPASKCHGRSWKSLRDKDATSHSRPPKLSVLNLNEAKLPFSGDDRNMVV      160
TWVPEEMAKKTIQEKAGVPSRSVKRRKRWGETSKPSLYYRGRRYLRSPAVLVPPPSPVHFLEQLHSEAIPLWAQVDMPLP      240
QDLLKECILSHEKSTACPEVKMELSKMKSLPLEKSRPDSAVSSKMYLTIQRLTLQRPRLRYPDCLKLRHNLKRDSWKQ      320
QEEKTSTKKQEAKKAKRDVEEQYGEETMSSDSFHDPSFHDHVGRLRISREIERKLLKGEVGMKETSLERRVSVVEEPMAY      400
EFGSYTASYTSPESALLYETIYQDLNDGEETELEVEAFSKDNNPKSLSAVMDNISWNPCLKLRILQATEEENEGL      480
SRAQSEASLEA
...SS...S.....S.....S.....S.....SS..S...S.....      80
.....S.....S.....S.....S.....S.....S.....S.....S.....      160
.....S.....S.....S.....S.....S.....S.....S.....S.....      240
.....S...S.....S.....S.....S.....S.....S.....S.....      320
.....S.....S.....S.....S.....S.....S.....S.....S.....      400
.....S.....S.....S.....S.....S.....S.....S.....S.....      480
....S..S...      560
  
```

Erwartete Phosphorylierungsstellen: Serine: 35

4.11 Zusammenfassung

Mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie mit Offline-Kopplung an die GF-AAS wurden in den Gewebezysolen der Ratte vom Dickdarm sowie dem Stoffwechselvergleichsorgan Leber molybdänbindende Proteine im Bereich von 50 kDa sowie 7 kDa detektiert. Die Überprüfung der Einheitlichkeit der ca. 7 kDa großen Proteinfraction erfolgte mittels SDS-PAGE und dSDS-PAGE. Durch die Analyse der LC/ESI-MS/MS konnte zum einen, wie in der dSDS-PAGE angedeutet, gezeigt werden, dass es sich in der untersuchten Fraktion um mehrere Proteine handelte, zum anderen wurde durch die LC/ESI-MS/MS das bislang uncharakterisierte Protein LOC500475 identifiziert und durch den Vergleich mit den theoretischen Daten von Proteindatenbanken sowie mit Analyseprogrammen zum Teil charakterisiert werden. Dieses Ergebnis wurde erstmalig erzielt.

5 Diskussion

Für biologische und physiologische Funktionen spielen Spurenelemente eine wichtige Rolle im Organismus. Die Funktionen sind von der Konzentration und der chemischen Spezies in den Organen bzw. im Organismus abhängig. Aus diesen Gründen ist die Bestimmung der Gehalte in den Organen und deren Verteilung in den subzellulären Fraktionen wichtig. Dazu wurden Untersuchungen durchgeführt, die die Gehalte in den Geweben des gastrointestinalen Traktes sowie der Leber als Stoffwechselvergleichsorgan bestimmen können. Zu den untersuchten Geweben zählen die Zunge, der Magen, das Duodenum, der Dünndarm sowie der Dickdarm. Diese Gewebe sind ständig vielen oxidativen Spezies ausgesetzt und benötigen daher ein spezifisches antioxidatives System.

Mit Hilfe von elementanalytischen Verfahren wurden die Gesamtgehalte und die Verteilung von Spurenelementen in den Geweben des Verdauungstraktes sowie in den subzellulären Kompartimenten quantitativ und qualitativ untersucht. Mittels INAA, ICP-MS und GF-AAS wurden die Gehalte von Arsen, Cadmium, Kobalt, Chrom, Cäsium, Kupfer, Eisen, Mangan, Molybdän, Nickel, Rubidium, Selen, Titan, Vanadium und Zink in den Geweben Zunge, Magen, Duodenum, Dünndarm, Dickdarm und Leber, die als Stoffwechselvergleichsorgan diente, sowie der humanen Karzenomdickdarmzelllinie HT29 bestimmt. Unter dem Gesichtspunkt, dass Selen eine Beziehung zum gastrointestinalen Trakt hat, wurde der Einfluss von Selen auf andere Spurenelemente der Versuchstiere untersucht. Die Ergebnisse der Gehaltsbestimmungen mit den drei Methoden variierten von Methode zu Methode ein wenig, stimmen aber innerhalb der Standardabweichungen überein. Die unterschiedliche Probenvorbereitung kann ein Grund für die Varianz der Ergebnisse sein. Für die INAA wird die zu untersuchende Probe lediglich lyophilisiert, während für die Messungen mit der ICP-MS und GF-AAS die Probe mittels Mikrowellendruckaufschluss weiter vorbereitet werden muss. Als „Universalmethode“ kann aber keine der drei Methoden betrachtet werden, da jede von ihnen ihre Vor- und Nachteile hat, die in den meisten Fällen element- oder probenmatrixabhängig sind. So sind bei der INAA zum Teil die Nachweisgrenzen nicht gering genug, oder das durch die Bestrahlung entstandene radioaktive Nuklid besitzt eine zu kurze Halbwertszeit. Die Nachweisgrenze spielt bei der ICP-MS oder GF-AAS ebenfalls eine wichtige Rolle. Im Rahmen des Mikrowellendruckaufschlusses können die Gehalte der zu bestimmenden Elemente durch Verdünnungen in den Bereich der Nachweisgrenzen gelangen, da beim Mikrowellendruckaufschluss gewisse Bedingungen eingehalten werden müssen. Die bei einem erfolgreichen Aufschluss verwendeten Reagenzien dürfen ein bestimmtes Volumen nicht unterschreiten. Dieses führt zur ersten Verdünnung des Elementgehaltes. Die quantitative Überführung der Aufschlusslösung und die auf ein bestimmtes Volumen folgende Auffüllung führen zur zweiten Verdünnung. Diese Aufschlusslösung kann im Gegensatz zur ICP-MS schon bei der GF-AAS verwendet werden. Obwohl die ICP-MS für viele Elemente nachweisstärker ist und einen weitaus größeren dynamischen Messbereich hat, muss die Aufschlusslösung aufgrund der meist noch sehr hohen Säurekonzentration weiter verdünnt werden, da die Stabilität des Plasmas von der Ionenkonzentration abhängig ist. Dies kann dazu führen, dass dann ein zu bestimmendes Element nicht mehr quantitativ nachgewiesen werden kann. Ein weiterer Nachteil der ICP-MS sind die Interferenzen, die beispielsweise für Arsen, Selen oder Chrom auftreten können. Die Detektion des monoisotopischen Arsens (^{75}As) kann durch eine $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ -Interferenz gestört werden. Die Störung kann dadurch auftreten, weil Argon als Plasmagas eingesetzt wird und hohe Chloridkonzentrationen bei biologischen Proben keine Seltenheit sind. Eine hohe Chloridkonzentration kann unter Umständen aber auch durch den Einsatz von Salzsäure beim Aufschluss mit eingetragen werden. Obwohl Chrom mehrere Isotope besitzt, so können diese mit starken Interferenzen belegt sein, so dass sich die Bestimmung dieses Elements als sehr schwierig gestalten kann. ^{52}Cr und ^{53}Cr sind durch die Interferenzen von $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$ bzw. $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}$ gestört. Auf dem Isotop ^{54}Cr liegt eine ^{54}Fe - und auf dem ^{50}Cr liegen ^{50}Ti - oder ^{50}V -Störungen. Ähnlich ist es auch beim Selen. Die Hauptisotope ^{80}Se und ^{78}Se werden

durch $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$ bzw. $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$ gestört. Die restlichen natürlichen Isotope des Selen liegen bei unter 10 %, was dazu führen kann, dass eine Selenbestimmung nicht mehr quantitativ vorgenommen werden kann. Wird der Zeitfaktor bei der Auswahl der Methoden mit in Betracht gezogen, so ist die Probenvorbereitung bei der INAA zwar nicht ganz so aufwändig, jedoch kann es einige Wochen dauern, bis die Ergebnisse vorliegen. Bei einer Bestimmung von mehreren Elementen ist die ICP-MS zu bevorzugen, da sie als Multielementmethode bei mehreren Proben die Ergebnisse innerhalb kürzester Zeit liefert. Bei einer Bestimmung von wenigen Elementen und Proben ist die GF-AAS als Einzelementmethode sehr gut geeignet, da sie außerdem nur eine sehr geringe Probenmenge benötigt und im Fall von Zytosolen oder Plasma die Bestimmung direkt erfolgen kann.

Der Selengehalt lag in den Geweben des gastrointestinalen Traktes um etwa eine Größenordnung in den selenadäquat ernährten Tieren höher als in den selenmangelernährten Tieren. Damit konnte ich einen hochsignifikanten Unterschied ($P < 0,001$) zwischen den beiden Populationen feststellen. Arsen ist in den Geweben homogen verteilt, wobei die höchste Konzentration in der Leber bestimmt werden konnte. Im Vergleich zu den Geweben ist die Konzentration von Arsen im Futter deutlich niedriger, so dass vermutet werden kann, dass es sich dabei um eine Akkumulation oder eventuell um Essenzialität handeln kann. Interessanterweise konnte bei der Bestimmung von Cadmium in den Geweben eine 5- bzw. 3-mal so hohe Konzentration im Duodenum bzw. Dünndarm im Vergleich zu den übrigen Organen detektiert werden. Dieses entspricht der aus der Literatur bekannten Aufnahme und zeitlich begrenzten Speicherung von Cadmium durch das Duodenum [122,123]. Eine nahezu homogene Verteilung von Kobalt konnte mit Ausnahme der Zunge, beobachtet werden. In der Zunge war die Konzentration nur halb so groß wie in den übrigen Organen. Cäsium, Rubidium und Mangan waren inhomogen in den Geweben verteilt. In der Leber konnte Rubidium mit einem schwach signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) bestimmt werden. Einen ebenfalls schwach signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) konnte ich für den Eisengehalt im Magen detektieren. Die Eisenkonzentration lag bei den Se(-)-Tieren höher als bei den Se(+)-Tieren. In der Literatur wird über ähnliche Unterschiede für die Leber, Niere und Milz berichtet, so dass man hier vom Einfluss des Selenstatus auf die Konzentration von Eisen im Magen sprechen kann [124,125]. Die Spurenelemente Nickel und Zink waren homogen auf die Gewebe des Verdauungstraktes verteilt. Im Vergleich zu den anderen Organen war die höchste Konzentration von Nickel und Vanadium in der Zunge zu finden. Für Chrom konnte die höchste Konzentration im Dickdarm der Se(+)-Tiere detektiert werden, die jedoch mit einer hohen Standardabweichung versehen war, so dass eine Signifikanz nicht feststellbar war. Die geringsten Kupfergehalte wurden im Dün- und Dickdarm im Vergleich zu den anderen Organen gefunden. Sie waren im Vergleich zu den übrigen Organen nur halb so groß. Die höchsten Molybdänkonzentrationen weisen Duodenum und Dünndarm für den gastrointestinalen Trakt auf. Im Vergleich dazu besitzt die Leber eine drei mal so hohe Konzentration. Diese Werte korrelieren mit denen, die Higgins *et al.* für verschiedene Gewebe des gastrointestinalen Traktes sowie der Leber bestimmen konnte [126]. Die ermittelten Gehalte in den Geweben sind je nach Art des Gewebes 3- bis 16-mal höher als im Futter, welches die Versuchstiere erhielten, und spiegeln die Essenzialität von Molybdän im Organismus wider [127]. Für Titan konnte eine acht mal höhere Konzentration in der Leber im Vergleich zu den Geweben des Verdauungstraktes bestimmt werden.

Der Vergleich der Spurenelementgehalte der humanen Karzenomdickdarmzelllinie HT29 mit den Gehalten des Dickdarms der Se(+)- und Se(-)-Tiere zeigte ähnliche Gehalte für Kobalt, Mangan, Rubidium, Kupfer und Zink. Eine doppelt so hohe Konzentration an Arsen und Molybdän war in der Zelllinie feststellbar. Für Cäsium war der Wert um den Faktor 3 höher. Der Gehalt an Cadmium ist im Vergleich zu den Geweben um den Faktor 35 erhöht. Nickel sowie Vanadium sind sieben- bzw. zehnfach erhöht. Ein ebenfalls um den Faktor 10 erhöhter Wert konnte für Titan festgestellt werden. Dieser war jedoch mit einer sehr großen

Standardabweichung behaftet. Für Eisen und Selen konnten vergleichsweise geringere Gehalte festgestellt werden. Diese liegen bei ca. der Hälfte im Vergleich zu den Geweben.

Die Verteilung der Spurenelemente und deren Konzentrationen in den subzellulären Fraktionen, die durch differenzielle Ultrazentrifugation erhalten wurden, wurden zum einen mittels INAA quantitativ und zum anderen mit Hilfe der LA-ICP-MS quasi quantitativ bestimmt. Aufgrund der Anwendung eines vereinfachten Protokolls zur subzellulären Fraktionierung wurde die Qualität der Fraktionierung durch immunochemische Nachweise überprüft. Der immunochemische Nachweis zeigte, dass die Co-Sedimentation schwerer Mitochondrien bei der Trennung der Kernfraktion sich häufig nicht vermeiden lässt.

Erwartungsgemäß konnte ich auch auf subzellulärer Ebene zeigen, dass ein signifikanter Unterschied für Selen zwischen selenadäquat- und selenmangelernährten Tieren besteht. Die aus der Literatur bekannte Verteilung von Selen in den subzellulären Fraktionen der Se(+)-Tiere wurde für die Zunge, den Duodenum und den Dickdarm bestätigt werden [128]. Demnach befindet sich in der Kernfraktion die geringste und in der zytosolischen Fraktion die höchste Konzentration von Selen. In den subzellulären Fraktionen des Magens und Dünndarms wurden zwar ebenfalls die geringsten Gehalte in der Kernfraktion bestimmt, jedoch zeigten die mikrosomalen Fraktionen gleiche oder höhere Konzentrationen als die zytosolischen Fraktionen. Der höchste Gehalt an Eisen ließ sich in allen Geweben in der mikrosomalen Fraktion detektieren. Interessanterweise zeigten sich signifikante Unterschiede in der mikrosomalen Fraktion der Gewebe Zunge und Magen für selenadäquat und selenmangelernährte Tiere, wobei die höhere Konzentration in den Se(-)-Tieren gefunden wurde. Diese Ergebnisse stimmen mit denen überein, die Chareonpong-Kawamoto *et al.* zeigen konnten [129]. Dort beobachtete man eine dramatische Erhöhung der Eisengehalte bei selenmangelernährten Tieren in Leber, Niere, Herz und Milz. Bei Parenchymal- und Kupffer-Zellen der Leber zeigten sich morphologisch veränderte Lysosomen, die Bestandteil der mikrosomalen Fraktion sind. Dieser Effekt könnte vielleicht damit erklärt werden, dass bei Selenmangel intravaskuläre Hemolyse begünstigt wird. Eine ähnliche Lokalisierung von Eisen in der Leber oder der Niere wird oft bei Patienten mit intravaskulärer Hemolyse beobachtet [130]. Die Alkalielemente Rubidium und Cäsium kommen fast ausschließlich im Zytosol der untersuchten Gewebe vor. Überdies wurde gezeigt, dass Zink, mit Ausnahme der Zunge und des Dickdarms, homogen auf die subzellulären Fraktionen verteilt war. Kobalt, Chrom, Mangan, Vanadium, Nickel, Kupfer, Arsen, Molybdän und Cadmium wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den subzellulären Kompartimenten von selenadäquat oder selenmangelernährten Tieren auf. Ein besonderes Verteilungsmuster in den subzellulären Fraktionen konnte nicht beobachtet werden.

Durch die Untersuchungen mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) mit Kopplung an die ICP-MS konnte ich zeigen, dass die Spurenelemente Arsen, Cadmium, Kobalt, Kupfer, Eisen, Mangan, Molybdän, Nickel, Selen, Titan, Vanadium und Zink in proteingebundener Form in den Zytosolen der Zunge, des Magens, des Duodenums, des Dünndarms, des Dickdarms sowie der humanen Karzenomdickdarmzelllinie HT29 vorliegen. Rubidium und Cäsium wurden in allen Gewebezytosolen im Permeationspeak detektiert, d.h., sie liegen nicht in proteingebundener Form vor. Zur Abschätzung der molekularen Massen wurde die Säule mit einem Satz geeigneter Proteine kalibriert, bei denen es sich allerdings um globuläre Proteine handelte. Aufgrund dessen kann nur ein Bereich für die Molekularmasse der Proteine in den Zytosolen angegeben werden, da diese teilweise nicht globulär sind. Nicht ganz auszuschließen ist, dass bei der Präparation der Gewebe auch Blutgefäße mit dem darin enthaltenen Blut und dem entsprechend auch Serum nicht vollständig entfernt wurden. Aus diesem Grund könnten metallbindende Proteine, die charakteristisch für das Serum sind, ebenfalls detektiert worden sein. Arsenbindende Proteine wurden bei 21 kDa und 7 kDa gefunden. Laut Literaturangaben könnte es sich bei dem 7 kDa Protein um Metallothionein handeln, welches mit As(III) interagieren kann [131]. In den Gewebezytosolen konnte ich cadmiumbindende Proteine bei molekularen Massen im Bereich von 65 kDa, 45 kDa, 35 kDa und 12 kDa detektieren. Bei dem

45 kDa Protein könnte es sich dabei um Betain-homocystein S-Methyltransferase 1 handeln [132]. Kupferbindende Proteine wurden für die Molmassen im Bereich von über 67 kDa, 27 kDa, 43 kDa, 15 kDa und 10 kDa bestimmt. Bei dem Protein im Bereich von 67 kDa könnte es sich um die Lysyl oxidase 1 (LOX) [133] oder Albumin [134] handeln, welches neben Zink auch Kupfer oder Eisen bindet. Das bei 43 kDa aufgetretene Protein könnte die Lysyl oxidase 6 (LOX) sein [135]. Der Superoxid dismutase III (SOD) könnte das Protein bei 27 kDa und das Protein bei 15 kDa der SOD I entsprechen [101]. Das eisenbindenden Protein bei 67 kDa kann dem Hämoglobin oder dem Albumin zugeordnet werden. Das Protein bei 22 kDa könnte den Isoformen des Ferritin entsprechen [136]. Eine mögliche Erklärung für das bei 28 kDa manganbindende Protein wäre die Aminopeptidase P [137]. Den zinkbindenden Proteinen bei 67 kDa und 28 kDa könnten zum einen Albumin oder die LOX 1 zugeordnet werden, zum anderen die SOD III [138,139]. Aufgrund der zum Teil sehr breiten Peaks des Nickelprofils erwies sich die Kalkulation der daraus resultierenden Molekularmassen als sehr schwierig. Mögliche nickelbindende Proteine im Bereich von 67 kDa könnten das Albumin, L-histidin oder α_2 -macroglobulin sein [140-142]. Für den Bereich um 33 kDa käme die Aldolase A in Frage [143]. Oligosaccharide oder saure Peptide entsprechen den kalkulierten Massen mit geringem Molekulargewicht [144]. Das im Bereich von 25 kDa nickelbindende Protein konnte dem Lipovitellin 2 beta zugeordnet werden [145]. In den Gewebezytosolen konnte für Selen gezeigt werden, dass es sich bei dem über 67 kDa detektierten Protein möglicherweise um das Selenoprotein O (SeO) handelt [146]. Das Selenoprotein P (SeP) entspricht dem Protein, welches im Bereich von 37 kDa bestimmt worden ist [147]. Außerdem konnten bei ca. 12 kDa das Selenoprotein R (SeR), und bei 10 kDa das Selenoprotein W (SeW) zugeordnet werden [148,149]. Bis heute sind Proteine, die Kobalt, Vanadium, Molybdän oder Titan binden und in einem Zusammenhang mit denen stehen könnten, die im gastrointestinalen Trakt detektiert wurden, laut Literatur nicht bekannt. Die Elementprofile der humanen Karzenomdickdarmzelllinie zeigten im Vergleich zu den Elementprofilen der Dickdarmzytosele der Se(+)- und Se(-)-Ratten eine sehr gute Übereinstimmung. Für Cadmium konnte aufgrund des starken tailings jedoch nur eine Molekularmasse von über 67 kDa gezeigt werden. Im Bereich von weniger als 6 kDa ist ein zusätzlicher Kupferpeak vorhanden. Besonders auffällig ist, dass nicht nur die Dickdarmzytosele der Ratten für Molybdän ein molybdänbindendes Protein im Bereich von 50 kDa aufweisen, sondern alle untersuchten Gewebezytosele. Dieses Protein ist im Zytosol der Zelllinie nicht erkennbar.

In den mit radioaktivem ^{75}Se durchgeführten Markierungsversuchen wurde gezeigt, dass die Versuchstiere den Radiotracer inkorporieren. In selenadäquat ernährten Tieren wird das zugeführte ^{75}Se mit dem in ausreichender Menge zur Verfügung stehenden Selen verteilt. Im Gegensatz dazu wird das ^{75}Se in selenmangelernährten Tieren stärker metabolisiert, so dass eine größere Menge an ^{75}Se in die Selenoproteine eingebaut wird und diese mit Hilfe der Autoradiographie leichter zu detektieren sind. Aus diesem Grund wurden die Homogenate der Gewebe von Se(-)-Tieren mittels SDS-PAGE untersucht. Die Lokalisierung der markierten Selenoproteine erfolgte mittels Autoradiographie. Insgesamt konnte ich neun Selenoproteine auf diesem Weg zeigen. Die apparenten Molekularmassen waren dabei 55 kDa, 36-40 kDa, 28 kDa, 23 kDa, 20 kDa, 18 kDa, 15 kDa, 13 kDa und 10 kDa. In allen Geweben war bei ca. 55 kDa die Thioredoxin-Reduktase [88,89] zu erkennen. Ebenfalls ubiquitär verteilt wurde in allen Gewebekomogenaten die Glutathion-Peroxidase (ca. 23 kDa), die Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase (ca. 20 kDa), das 18 kDa Selenoprotein und das 15 kDa Selenoprotein gefunden. Immunochemisch wurde in allen Gewebekomogenaten der Se(+)-Tiere die Plasma-Glutathion-Peroxidase (GPx3) und das saure 15 kDa Selenoprotein nachgewiesen. Die Gpx3 ist ein extrazelluläres Protein, welches die Reduktion von H_2O_2 und organischen Peroxiden katalysiert. Die Funktion des sauren 15 kDa Selenoproteins ist nicht detailliert geklärt. Die Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase (PHGPx) tritt zytosolisch sowie membrangebunden auf. Die Funktion soll der Schutz der Zellorganellen durch reaktive

Sauerstoffspezies (ROS) sein [150]. Das 18 kDa Selenoprotein wurde in Markierungsversuchen mit ^{75}Se als membrangebundenes Protein in den Mitochondrien der subzellulären Fraktionen gefunden [93]. Dieses ließ sich auch durch den Vergleich des Autoradiogramms des Homogenats und des Zytosols der Leber zeigen, in dem die Bande bei 18 kDa im Zytosol nicht erkennbar war. Die bei 10 kDa auftretende Bande bei den Homogenaten der Zunge und des Dünndarms kann dem Selenoprotein W (SelW) zugeordnet werden. Bei diesem Protein handelt es sich um ein zytosolisches Protein mit antioxidativer Funktion. Mittels SEC-ICP-MS konnte ich es ebenfalls in den Zytosolen der Zunge und des Dünndarms lokalisieren. Eine diffuse Bande im Dünndarmhomogenat bei 36-40 kDa könnte das Selenoprotein P (SelP) sein. Bei dem SelP handelt es sich um ein Glykoprotein, das als Se-Transportprotein diskutiert wird. Durch das SDS können Zuckerreste abgespalten werden, so dass das Protein mit unterschiedlichen Molekularmassen erscheint, was eine diffuse Bande zur Folge hat. Die bei 13 kDa erscheinende Bande im Magenhomogenat könnte von dem Selenoprotein H (SelH) stammen. Es gilt als zytosolisches Protein mit unbekannter Funktion [146]. Die bei 28 kDa detektierte Bande trat nur im Leberhomogenat auf. Bei ihr handelt es sich definitiv um die Deiodase 1 (D1) [151]. Sie ist ebenfalls wie das 18 kDa Selenoprotein ein membrangebundenes Protein. Für das Homogenat der humanen Karzenomdickdarmzelllinie HT29 wurden die gleichen Selenoproteine detektiert wie im Dickdarmhomogenat der Ratte.

Bei den Untersuchungen zur Selenoproteinverteilung mittels 2D-Gelelektrophorese konnte ich die meisten und intensivsten Spots in den Homogenaten der Se(-)-Tiere mit einer sehr guten Auflösung detektieren. In den Homogenaten des Verdauungstraktes wurden Selenoproteine im Bereich von 10-80 kDa und mit pI-Werten zwischen 3-10 gefunden. Die Verteilung der Spots der selenbindenden Proteine war in allen Homogenaten ziemlich ähnlich. Allerdings ist aus den verschiedenen Autoradiogrammen auch sehr gut erkennbar, dass bei den Tieren mit einer Selenunterversorgung verhältnismäßig mehr Selen in andere Proteine eingebaut wird als in die GPx, und unterstreicht somit deren Wichtigkeit im antioxidativen Schutzmechanismus. Dieses steht im Einklang mit früheren Untersuchungen von Behne *et al.*, dass zuerst andere Proteine mit Selen versorgt werden, bevor die GPx1 aufgefüllt wird, und sich somit eine Hierarchie der Selenversorgung etabliert [128]. Diese Tatsachen deuten darauf hin, dass der präventiv wirkende Mechanismus von Selen sich auf mehr als nur eine Komponente verteilt. Die Ergebnisse zeigten alle Molekularmassenbereiche der bereits bekannten Selenoproteine.

Für die Untersuchungen des Proteoms der Gewebe aus dem Verdauungstrakt der Ratte wurde die 2D-Gelelektrophorese (NEPHGE) angewendet. Mittels dieser Methode können die Proteine in den Homogenaten des Verdauungstraktes von Se(+)- und Se(-)-Tieren in einer sehr hohen Auflösung dargestellt werden. Unter Zuhilfenahme des Computerprogramms MELANIE 6.0 führte ich eine Analyse der Proteinexpressionen durch und fand in der Zunge 35, im Magen 20, im Dünndarm 22 und im Dickdarm 13 Proteinspots mit unterschiedlichen Expressionen. Mittels MALDI-MS konnten die Proteine UDP-Glucose-6 dehydrogenase, Hydroxyl-Coenzym A dehydrogenase und Ubiquitin C-terminale Hydrolase Isozym L3 in der Zunge und Actin-2, Prohibitin, Zytokeratin 8 und das bisher nur *in silico* bekannte Protein FLJ20729 im Magen identifiziert werden. Die UDP-glucose-6 dehydrogenase ist ein Schlüsselenzym für die Synthese von UDP-glucuronat aus Glucose [152]. Dieses Substrat ist für eine Anzahl von Glucuronosyl transferasen (UDP-GT) notwendig. In verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass Selen vorbeugend bzw. therapeutisch bei Krebserkrankungen eingesetzt werden kann [153,154]. Die Herabregulierung der UDP-GT, und damit auch der UDP-glucose dehydrogenase steht im Zusammenhang mit dem Selenstatus. So konnten Thirunavukkarasu *et al.* zeigen, dass die UDP-GT-Aktivität signifikant herabgesetzt ist bei Ratten, denen krebsinduzierendes N-Nitrosodiethylenamin (DEN) verabreicht wurde und denen Selen über das Futter vor bzw. nach Verabreichung von DEN gegeben wurde [155].

Das Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase (HCAD) ist am Abbau der Fettsäuren (β -Oxidation) beteiligt [156]. Geht man bei einer Selenmangelversorgung auch von erhöhtem

oxidativen Stress aus, so kann dies in modifizierten, oxidativ geschädigten Fettsäuren resultieren [157]. Beim Vergleich der Expression des Proteins HCAD in den Se(+)- bzw. Se(-)-Tieren wurde dieses in den Se(+)-Tieren höher exprimiert. Eine Herabregulierung in den Se(-)-Tieren kann zwei mögliche Gründe haben. Zum einen können geschädigte Lipo-Proteine nicht in die Zellen eindringen. Als Folge davon kommt es zu keiner β -Oxidation und zur Verfettung der Arterien (Arteriosklerose) [158]. Intrazellulär kann das Ausbleiben von Fettsäuren zur verminderten Bildung der HCAD des Organismus als Antwort führen. Auf der anderen Seite wären oxidativ geschädigte Lipide intrazellulär nur mit hohem Energieaufwand verwertbar. Eine solche Verwertung könnte sich nicht für den Organismus lohnen, so dass die Herabregulierung der HCAD eine Folge davon ist [159].

Die Ubiquitinierung dient als Signal für den Abbau eines Proteins (proteasomalen Abbau) [160]. Die Funktion einer jeden Ubiquitin hydrolase (Uch) ist das Abspalten des Ubiquitins vom Substrat (Protein). Dabei konnte von Koenig *et al.* gezeigt werden, dass das Deubiquitinieren die Halbwertszeit des Selenoproteins Deiodianse erhöht [161]. Dieser Umstand würde die höhere Expression der Uch-L3 in selenmangelernährten Tieren erklären. Das Ubiquitin C-terminale hydrolase Isozym L3 (Uch-L3) und die Ubiquitin-specific-processing protease 33 (VDU1) gehören der gleichen Enzymfamilie an. Jeong *et al.* zeigten, dass das Selenoprotein 56 (SP56) an VDU1 bindet und es damit wahrscheinlich aktiviert [162]. Für dieses Protein ist Selen essenziell. In der Literatur gibt es Hinweise, die einen Zusammenhang zwischen der Uch-L3 und Krebserkrankungen nahe legen. So war die Rückfallrate bei Brustkrebspatientinnen deutlich erhöht, wenn die Uch-L3 hochreguliert war [163]. Es wurden aber auch Autoantikörper im Serum der Patienten nachgewiesen, die an Blasenkrebs erkrankt waren [164]. Die Uch-L3 wurde außerdem immunochemisch in verschiedenen Krebsgeweben und Karzenomzelllinien detektiert [165]. Die Hinweise auf die Zusammenhänge zwischen der Uch-L3 und Krebserkrankungen erhärten sich, zieht man die antiapoptotisch wirkende Eigenschaft der Uch-L3 mit in Betracht [166-169].

Aktine sind Strukturproteine, die in allen eukaryotischen Zellen vorkommen und in verschiedene Formen der Zellmotilität involviert sind. Sie sind Bestandteil des Zytoskeletts und gleichzeitig die fünf häufigsten Proteine in Eukaryoten. In der Zelle bildet Aktin dynamische Filamente, die als Bestandteil des Zytoskeletts zur Stabilisierung der äußeren Zellform dienen, intrazelluläre Transporte und zentraler Bestandteil des Kontraktionsapparats der Muskeln sind. Durch oxidativen Stress hervorgerufene Veränderungen der Actine können zu Muskel- oder anderen Erkrankungen führen. Die Expression des Actin-2 scheint von der Selenkonzentration abhängig zu sein. Das entspricht dem Ergebnis, welches auch Lee *et al* im Zusammenhang zu Untersuchungen zur Zellalterung mit Selen erhalten haben [170].

Das Prohibitin (PHB) ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, welches in verschiedenen zellulären Kompartimenten, hauptsächlich aber in den Mitochondrien, lokalisiert ist. Es wird mit verschiedenen Zellfunktionen in Verbindung gebracht. Zu diesen zählen unter anderem die Zellzykluskontrolle, die Zellalterung, Apoptose und die Stabilisierung von mitochondrialen Proteinen [171-173]. Rajalingam *et al* konnten eine bis dahin unerforschte Rolle von PHB im Signalweg der Extracellular-signal Regulated Kinase (ERK), die zu Apoptose führt, zeigen [174]. Dieser Signalweg wird aber auch durch Selen aktiviert [175]. Die Krebsforschung konnte aber auch zeigen, dass ERK an der onkogenen Transformation von Zellen, das heißt an der Veränderung normaler Zellen zu Krebszellen, beteiligt ist. Dieser Signalweg ist bei 30 % aller Krebsarten hyperaktiviert [176]. Die erhöhte Expression von Prohibitin im Magenhomogenat der Se(+)-Tiere und somit die erhöhte Möglichkeit, in einer geschädigten Zelle die Apoptose einzuleiten, spricht für einen besseren Schutzmechanismus des Organismus.

Zytokeratine gehören zu einer Gruppe wasserlöslicher Faserproteine, welche Bestandteil des Zytoskellets von Epidermis- oder Epithelzellen sind. Ausgehend von der Tatsache, dass Arsenitoxid giftig und krebserregend ist, konnten Ramirez *et al.* zeigen, dass Arsenit die Expression von Zytokeratin in der humanen Leberzelllinie induziert, was auf eine hohe Affinität

der trivalenten Arsenspezies gegenüber den Thiolgruppen des Zytokeratins zurückzuführen ist [177,178]. Die gefundene höhere Expression im Homogenat des Magens der Se(-)-Tiere und die damit verbundene geringere Selenkonzentration und dadurch auch geringere protektive Wirkung würde mit diesen Ergebnissen in Einklang stehen.

Das im Magenhomogenat der Se(+)-Tiere stärker exprimierte *in silico* Protein FJL20729 könnte durch den Selenstatus der Tiere ein selenbindendes Protein oder sogar ein Selenoprotein sein.

Die Analyse und Identifikation unter der Berücksichtigung des Selenstatus stellt bislang völlig neu erzielte Ergebnisse dar.

Mit Hilfe immunochemischer Tests wurden neben den beiden Selenoproteinen (Sep15 und GPx3) die Metalloproteine SOD, DPT, LOX und MT detektiert. Beim Vergleich der Expressionsintensitäten konnten keine Unterschiede für die SOD, LOX und das DPT beobachtet werden. Eine höhere Expression in den Homogenaten des Duodenums und Dünndarms waren für das Metallothionein zu erkennen. Aufgrund des Selenstatus detektierte ich erwartungsgemäß die Selenoproteine Sep15 und GPx3 nur in den selenadäquat ernährten Tieren. Dabei wurde die GPx3 im Vergleich zu den anderen Gewebekomponenten im Homogenat des Magens am stärksten exprimiert. Im Fall des Sep15 waren die intensivsten Signale in den Homogenaten des Dünndarms und Duodenums zu finden.

Das Protein Dermopontin, MT, Sep15, GPx3 sowie die LOX wurden von mir mittels immunochemischer Tests erstmalig in den Geweben des gastrointestinalen Traktes der Ratte nachgewiesen. Allerdings wurden die GPx3 und die LOX in verschiedenen Geweben, unter anderem auch im Verdauungstrakt der Maus, gezeigt [179,180]. Das detektierte DPT soll die Funktion eines Cu-Lieferanten für das Enzym LOX haben.

Aufgrund der Übereinstimmung, der durch die SEC-ICP-MS erhaltenen Molybdänprofile, für die Gewebezitosole des Verdauungstraktes lag die Vermutung sehr nahe, dass das gleiche Protein auch in der Leber als Stoffwechselvergleichsorgan zu finden war. Aus diesem Grund habe ich eine Größenausschlusschromatographie für mehrere Dickdarm- und Leberzytosole durchgeführt und die gesammelten Fraktionen mittels GF-AAS auf Molybdän untersucht. Es zeigte sich für die Leberzytosole ein ähnliches Molybdänprofil wie für die Dickdarmzytosole. So konnte gezeigt werden, dass es auch in der Leber molybdänbindende Proteine im Bereich von 50 kDa und 7 kDa gibt. Für die Untersuchungen zur Identifizierung des 7 kDa--Molybdänbindenden Proteins wurde die Leber herangezogen, da sie im Vergleich zum Dickdarm bedeutend größer ist. Sie wiegt mit ca. 15-20 g im Vergleich zum Dickdarm (ca. 0,5 g) ein Vielfaches an Gewicht auf und enthält mengenmäßig die meisten Proteine. Für die gleiche Proteinmenge aus dem Dickdarm wären mindesten 50 Ratten sowie deren Präparation nötig und hätte den Rahmen der Promotion überschritten. Bei der Fraktion 34 des Leberzytosols handelte es sich um das Peakmaximum des Molybdänprofils. Diese Fraktion wurde über einen Zeitraum von 1 min gesammelt. Dem entsprechend bestand die Möglichkeit, dass sich in dieser Fraktion Proteine mit Molekulargewichten von ca. 5-9 kDa befinden, da ein Gewebezitosol aus einem komplexen Proteingemisch besteht. Weiterhin gilt die Kalibration der Säule nur für globuläre Proteine. Aus diesen Gründen wurde die Fraktion 34 mittels SDS-PAGE untersucht. Durch die Denaturierung der Proteine während dieser Methode werden diese entfaltet und ihrer molekularen Masse nach getrennt. Bei einer apparenten Molekularmasse von 7 kDa konnte eine Bande gezeigt werden. Diese Molekularmasse korreliert sehr gut mit der kalkulierten Masse für das Molybdänprofil, welches aus der Größenausschlusschromatographie erhalten wurde. Die Homogenität dieser Bande wurde mittels dSDS-PAGE überprüft, und es zeigte sich, dass die Hauptspezies bei 7 kDa als diffuser Spot zu erkennen war, was auf weitere Kontaminationen (Proteine), wenn auch nur in geringen Konzentrationen, schließen lässt. Die im SDS-Gel vorhandene Proteinbande bei 7 kDa wurde ausgestochen und mit Trypsin behandelt. Mittels LC/ESI-MS/MS wurden die Aminosäuresequenzen der erhaltenen Peptide bestimmt. Die Analyse und Vergleich der Aminosäuresequenzen mit den Datenbanken UniProtKB/TrEMBL sowie SWISS-Prot ergab sechs mögliche Proteine und bestätigte die Vermutung, dass der diffuse Spot in der dSDS-PAGE

mehrere Proteine enthielt. Fünf der sechs potentiell möglichen Proteine konnte ich ausschließen, da diese weitestgehend charakterisiert sind und nicht molybdänbindend sind. Für das uncharakterisierte Protein LOC500475 wurde ein Sequenzvergleich durchgeführt und erfolgte mittels BLAST Network Service. An dieser Stelle konnte ausgeschlossen werden, dass das Protein unter anderem Namen geläufig war. Ebenfalls konnte ausgeschlossen werden, dass das Protein in einer anderen Spezies Beispielsweise im Menschen nicht aber in der Ratte bekannt war. Beim Aminosäuresequenzvergleich in Bezug auf Sequenzhomologien wurden zwei Proteine in der Maus und ein Protein im Menschen gefunden, die alle allerdings aber ebenfalls funktionell nicht charakterisiert sind. Die Proteine der Maus zeigten eine relativ geringe Abweichung, konnten aber ebenfalls ausgeschlossen werden. Mit Hilfe des netzbasierenden Analyseprogramms NetPhos konnte eine hohe Anzahl von erwarteten Phosphorylierungsstellen (35 Serine) berechnet werden. Die sehr große Anzahl an theoretisch phosphorylierbaren Serinen lässt vermuten, dass es sich bei LOC500475 um ein sehr fein reguliertes Eiweiß handelt. Die Regulation von Aktivität als auch subzellulärer Lokalisierung von Proteinen wird häufig durch multiple Phosphorylierungen realisiert. Hierbei wird die Übertragung von Phosphatgruppen in der Regel durch spezifische Proteinkinasen umgesetzt. Eine regulierte Transportfunktion ist vor diesem Hintergrund durchaus denkbar. Dadurch resultiert, dass das neue Protein ein molybdänbindendes Protein ist. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse führten zu erstmalig erzielten Ergebnissen.

Ausblick

Zur vollständigen Charakterisierung des neu gefundenen molybdänbindenden Proteins soll die Primärstruktur des untersuchten Proteins ermittelt werden. Aus der Primärstruktur sollen Peptide (je 10-12 Aminosäuren) ausgewählt werden, und für die Produktion von Peptid-Antikörper durch Immunisierung von zwei Kaninchen produziert werden. Anschließend soll der Erfolg des Peptid-Antikörpers getestet werden. Dabei soll zum einen die Lokalisierung des Proteins in den Zellen verschiedener Organe des gastrointestinalen Traktes bestimmt werden. Zum anderen soll die Lokalisation des molybdänbindenden Proteins in der Fluoreszenzmikroskopie am Modell der humanen Karzenomdickdarmzelllinie HT29 durchgeführt werden. Des Weiteren soll der Antikörper mittels Koimmunpräzipitation und anschließender massenspektrometrischer und elementanalytischer Methoden mögliche Bindungs- bzw. Interaktionspartnern des molybdänbindenden Proteins identifizieren. Abschließend sind Bindungsstudien mit potentiellen Interaktionspartnern geplant, die durch den Einsatz von kalorimetrischer Titration, analytischer Ultrazentrifugation und Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie erreicht werden sollen.

6 Zusammenfassung

Die Wichtigkeit der Spurenelemente in der Ätiologie bei Erkrankungen des Verdauungstraktes ist wahrscheinlich zum einen auf die protektive Wirkung der Spurenelementproteine gegen die Schädigung der Zellen durch aggressive Peroxide und zum anderen auf Kettenreaktionen von Missfunktionen unkorrekt exprimierter Proteine zurück zu führen. Untersuchungen an Zelllinien, die mit den jeweiligen Spurenelementen Se, Cu, Mn oder Zn inkubiert wurden, zeigten, dass dabei einige Proteine exprimiert werden, die ihre biologische Aktivität erst entfalten können, wenn sie derartige Elemente binden. Berichtet wurde von anderen Autoren auch, dass Metallo-/Metalloidproteine im Stoffwechsel der Gewebe des Verdauungstraktes involviert sind.

Die durchgeführten Experimente und die daraus gewonnenen Ergebnisse dieser Arbeit sind dem Verdauungstrakt, einem System dessen Wichtigkeit für die Aufrechterhaltung eines gesunden Organismus von sehr großer Bedeutung ist, gewidmet.

Neben analytischen, biochemischen und zellbiologischen Methoden wurden Verfahren der Immunchemie angewendet. Mit Hilfe der analytischen Methoden INAA, ICP-MS und AAS wurden die Gehalte der Spurenelemente As, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Rb, Se, Ti, V und Zn in Geweben des Verdauungstraktes von Laborratten unter Berücksichtigung des Selenstatus der Versuchstiere untersucht. Ein schwach signifikanter Unterschied durch den Se-Einfluss war für den Gesamtgehalt an Fe festzustellen. Für die anderen untersuchten Elemente konnte kein Einfluss des Se beobachtet werden. Festgestellt wurde aber, dass jede der drei verwendeten Methoden nur für bestimmte Elemente geeignet ist. Die ICP-MS ist als eine Multielementbestimmungsmethode hervorragend in der Lage, in kurzer Zeit Ergebnisse zu liefern, und sollte deswegen als erstes angewendet werden, sofern ausreichend Probenmaterial zur Verfügung steht. Bei geringen Probenmengen, wie den subzellulären Kompartimenten, ist INAA der ICP-MS für quantitative Bestimmungen vorzuziehen. Mit Hilfe der INAA konnte die Verteilung sowie die Gesamtkonzentration der Spurenelemente Co, Cr, Cs, Fe, Mn, Rb, Se und Zn in den Zellorganellen (Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zytosol) der Organe des Verdauungstraktes bestimmt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Fe-Gehalte signifikante Unterschiede in den Mikrosomen des Magens von Se(-)- und Se(+)-Tieren aufweisen. Durch die Kopplung von Laserablation mit ICP-MS war die qualitative Bestimmung über die Verteilung der Elemente As, Cd, Cu, Mo, Ni, und V in den subzellulären Fraktionen auch bei extrem geringen Mengen erfolgreich. Aus den Geweben des gastrointestinalen Traktes der Ratte mit unterschiedlichem Selenstatus sowie der humanen Karzenomdickdarmzelllinie HT29 gewonnenen Zytosole wurden durch Onlinekopplung der Größenausschlusschromatographie (SEC) mit der induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie zuerst die Proteine in den Zytosolen mit Hilfe der SEC fraktioniert und anschließend die in den Proteinen enthaltenen Elemente mittels Massenspektrometrie bestimmt. Die erhaltenen chromatographischen Profile von As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Ti, V und Zn weisen darauf hin, dass diese Elemente proteingebunden vorliegen. Für Rb und Cs gilt das nicht. Dieses Resultat legt den Verdacht nahe, dass diese Elemente auch Bestandteile bisher nicht identifizierter Proteine sind. Bei der Detektion spurenelementhaltiger Proteine mittels SEC-ICP-MS wurde unter anderem das Element Molybdän im Dickdarm-Zytosol in zwei verschiedenen Molekularmassen (ca. 50 und 7 kDa) identifiziert, während im Zytosol der humanen Karzenomdickdarmzelllinie HT29 nur die 7 kDa Fraktion zu identifizieren war. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die Zelllinie HT29 mit Mo inkubiert um festzustellen, ob Mo auch in Proteinen mit höheren Molekularmassen dieser Zellen bindet. Parallel zu diesen Untersuchungen wurde die Leber als Vergleichsgewebe herangezogen. Durch Fraktionierung der Leberzellen wurde das Zytosol gewonnen. Mittels SEC wurden die gesammelten Fraktionen durch AAS-Analyse auf Mo untersucht. In den Proteinen des Leber-Zytosols fanden sich neben der 50 kDa Proteinfraction auch die molybdänhaltige 7 kDa-Proteinfraction. Die Analyse durch LC/ESI-MS/MS ergab ein bislang uncharakterisiertes Protein (Primärstruktur von LOC500475 wurde theoretisch berechnet).

Die Identifizierung von Selenoproteinen erfolgte durch *in vivo* Markierung der Ratten von unterschiedlichem Selenstatus mit ⁷⁵Se nach der Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie der Homogenate. Dabei wurden in den Homogenaten der Se(-)-Tiere im Molekularmassenbereich zwischen 10 kDa und 70 kDa Selenoproteine gefunden. Diese Selenoproteine konnten mit Hilfe der 2D-Elektrophorese bestätigt und durch eine sehr gute Aufspaltung der Proteinbanden mit IP-Werten zwischen 3,5 und 9,0 und Molekularmassen zwischen 10 kDa und 80 kDa eindeutig detektiert werden.

Das für die Analyse der Proteinexpression geeignete Computerprogramm Melanie 6.0 lieferte für die Homogenate der Zunge von Se(+)- und Se(-)-Tieren 35 Proteinexpressionsunterschiede. 9 dieser Proteinspots im Se(+)-Homogenat waren signifikant stärker exprimiert als im Se(-)-Homogenat. In den Homogenaten des Magens waren 20 Unterschiede detektierbar. Von diesen Proteinspots waren 12 stärker im Se(+)-Homogenat exprimiert. Die Analyse der Dünndarm-Homogenate ergab 22 unterschiedliche Expressionen, wobei 12 davon in den Se(+)-Homogenaten wesentlich stärker exprimiert waren. In den Dickdarm-Homogenaten der beiden Populationen konnten 13 Ungleichheiten beobachtet werden. Davon waren sechs in den Homogenaten der Se(+)-Tiere signifikant stärker exprimiert. Die Identifizierung der Proteinspots 1-3 im Homogenat der Zunge von selenadäquat ernährten Tieren mittels tryptischer Spaltung sowie die Bestimmung der Massen einiger Peptide durch die Massenspektrometrie (MALDI-MS) erfolgte durch den Vergleich mit den theoretischen Daten der Peptide/Proteine. Identifiziert wurden die Proteine UDP-Glucose-6 dehydrogenase (1), Hydroxyl-Coenzym A dehydrogenase (2) und Ubiquitin C-terminale Hydrolase Isozym L3 (3). Im Magen-Homogenat der Se(+)- und Se(-)-Tiere konnten die Proteine Actin-2, Prohibitin, Zytokeratin 8 sowie das bisher nur *in silico* bekannte Protein FLJ20729 (Spot 1-4) identifiziert werden.

Die Detektion von metallhaltigen Proteinen sowie Selenoproteinen in den Homogenaten des Gastrointestinaltraktes erfolgte durch immunochemische Untersuchungen. Die verwendeten Antikörper, gerichtet gegen bestimmte Proteine, zeigten positive Signale für die Proteine SOD, LOX, MT-I und MT-II, plasma GPx (GPx3), das saure 15 kDa-Selenoprotein sowie für das neu entdeckte Cu-haltige Protein Dermatopontin (DPT), und wurden, mit Ausnahme der SOD für den Darmtrakt, erstmalig mittels immunochemischer Detektion in dieser Arbeit nachgewiesen.

Summary

The importance of the trace elements in the etiology of gastro-intestinal diseases is likely to lead back to two reasons: Firstly to the protective effecting of the trace element containing proteins against the damage of cells by aggressive peroxides. Secondly to a rank of chain reactions with dysfunction of uncorrected expressed proteins. Investigations of cell lines which were incubated with the elements Cu, Mn, Se, Mo, and Zn have shown that some proteins were expressed, which are able to unfold their biological activity if they bind such elements. Additionally, it was also reported by other authors that metalloproteins and metalloid containing proteins are involved in the metabolisms of the tissues of the digestion tract.

The experiments carried out in this thesis and the results obtained are devoted to the digestion tract, a system whose correct function is indispensable for the organism.

For the realisation of the experiments concerning the thesis analytical, biochemical, molecular and immunochemical procedures were applied. By means of the INAA, ICP-MS, and AAS the contents of the trace elements As, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Rb, Se, Ti, V, and Zn in rat tissues of the digestive tract were examined. A low significant value was observed regarding the total content of Fe by the influence of Se. For other elements a significant effect could not be observed. As a result, after the application of the different analytical methods it could be said that each method is suitable only for some elements. Nevertheless, the ICP-MS should be used at first, because the measurements can be carried out quickly and the results are obtainable very fast. In the case of very low amounts of the samples it is better to take the measurements by means of the INNA for quantitative analysis. By means of the INAA, the concentration and the

distribution of the trace elements As, Co, Cr, Fe, Mn, Rb, Se and Zn were determined in the cell organelles (nuclei, mitochondria, microsomes and cytosol) of several tissues of the intestinal tract. It was proved that the Fe concentration showed significant differences in the microsomes of the tongue and stomach of the Se(-) and Se(+) animals. By the coupling of the laser ablation with the ICP-MS, the qualitative determination concerning the distribution of the elements As, Cd, Cu, Mo, Ni, and V in the subcellular fractions, also with extremely little contents, was very successful. The proteins in the cytosols, which were obtained of the tissues of the rats fed with different selenium concentrations as well as of the human colon cell-lines HT29, were determined at first in the cytosols by the online-coupling of the size exclusion chromatography (SEC) with the inductively coupling plasma-massspectrometry. Afterwards, the elements inside the proteins were determined by mass spectrometry. The obtained chromatographic profiles of As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Ti, V, and Zn indicate that the elements above are binding to proteins. This could not be found for Rb and Cs.

By means of these results it is assumed that these elements are part of proteins which are still unknown. By the detection of trace elements containing proteins by means of SEC-ICP-MS it was found that the element Mo was bound to the proteins with the molecular mass of 7 kDa and 50 kDa, whereas in the cytosol of the human colon cell-lines the Mo was bound only to the protein with the molecular mass of 7 kDa. As a result of this outcome the cell-line HT29 was incubated with Mo to find out if the element also binds to proteins with higher molecular masses than 7 kDa. Parallel to this investigation, experiments were carried out with the liver cytosol. The liver cells were fractionated. The proteins in the obtained cytosol were separated by SEC. The resulted protein fractions were analysed with regard to Mo by means of the AAS. In the proteins of the liver cytosol besides the 50 kDa-protein a further Mo containing protein with the molecular mass of 7 kDa was identified. Based of the obtained result the cell lines HT 29 was incubated with Mo to find out if Mo is able to bind to proteins with higher molecular masses. Parallel to this study the organ liver was used as a comparison tissue. By fractionation of the liver cells the cytosol was separated by means of SEC of the total fraction presence of Mo was checked by AAS analysis. In the protein mixture of the liver cytosol it could be detected the Mo-containing protein with the molecular mass of 7 kDa and besides of them the other Mo-containing protein with the molecular mass of 50 kDa was also detected. The analysis of the 7 kDa protein by LC/ESI-MS/MS resulted the still unknown protein LOC500475. The primary structure of this protein is predicted only by theoretical calculation of the amino acids.

The identification of the selenoproteins in the homogenates of the gastrointestinal-tract was done by labelling the rats with ⁷⁵Se *in vivo*, separating the proteins by SDS-PAGE, and determining the selenium in the proteins by autoradiography. Thereby, labelled proteins in the homogenate of the (Se-)-rats were detected in the molecular mass range between 10 kDa and 70 kDa. These proteins were also found using the 2D-electrophoresis distributed in the pI-range between 3.5 and 9.0 and molecular masses between 10 kDa and 80 kDa.

For the analysis of the expressed proteins the appropriate computer program Melanie 6.0 provided 35 differences of the expressed proteins in the tongue homogenates of the (Se+)- and (Se-)-rats. 9 of these proteins were expressed significantly higher in the Se(+)-homogenate than in the Se(-)-homogenate. In the homogenate of the stomach 20 differences were found. 12 of these proteinspots were expressed higher in the Se (+)-homogenate.

The analysis of the small intestine provided 22 differences of the expressed proteins. 12 of them were expressed higher in the Se (+)-homogenate. In the colon homogenate of the (Se+) and (Se-)- rats 13 differences were observed. 6 of these protein spots were expressed stronger significant in the Se (+)-homogenate. The identification of the protein spots 1–3 in the (Se+)-homogenate of the tongue was reached by the MALDI-MS after tryptic digestion of the proteins and comparison of the obtained peptide masses with the theoretical data for peptide masses.

Identified were the proteins UDP-Glucose-6 dehydrogenase (1), Hydroxyl-Coenzym A dehydrogenase (2), and Ubiquitin C-terminale hydrolase isozym L3 (3). Each of these proteins is involved in the metabolic processes of the gastro intestinal tract.

In the stomach homogenate of the Se(+)- und Se(-)-rats the proteins Actin-2, Prohibitin, cytokeratin 8 as well as the protein FLJ20729 (Spot 1-4) were identified. The latter is up to now only known by *in silico* investigations.

The detection of the metalloproteins as well as of the selenoproteins in the homogenate of the digestion tract was reached by the application of several immunochemical tests. The used antibodies provided positive signals for the proteins SOD, LOX, MT-I and MT-II, plasma GPx (GPx3), and for the acid 15 kDa-Selenoprotein as well as the new discovered Cu-containing protein DPT. In this thesis with exception of SOD these proteins had been shown to be expressed in the gastro intestinal tract at the first time by means of immunochemical methods.

7 Literaturverzeichnis

1. Holleman, A., Wiberg, E. Wiberg, N.; Lehrbuch der Anorganischen Chemie, de Gruyter Verlag, Berlin, New York, 101. Aufl. (1995)
2. Kendrick, M., Plishka, M., Robinson, K.; Metals in Biological Systems, Series in Inorganic Chemistry, Ellis Horwood, (1992)
3. Mertz, W.; The Essential Trace Elements, Science, 213, (1981), 1332-1338
4. Ekmekcioglu, C., "Spurenelemente auf dem Weg ins 21. Jahrhundert – zunehmende Bedeutung von Eisen, Kupfer, Selen und Zink", Journal für Ernährungsmedizin, (2000), 2, 18-23
5. Fraga, C. G., "Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health", Mol Aspects Med, (2005), 26, 235-244
6. Oros, J. D., Armitage, J. M., "Structure of the Metal Clusters in rabbit metallothionein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1980), 77, 7094-7098
7. Nordberg, M., "Metallothioneins: historical review and state of knowledge", Talanta (1998), 46, 2, 243-54
8. Klahr S, Schreiner G, Ichikawa I., "The progression of renal disease", N Engl J Med, (1988), 318, 25, 1657-1666
9. Bertelsmann-Stiftung, "Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine – Klinische Aspekte und chemische Analyse", Verlag Bertelsmann Stiftung, Gütersloh, (1997)
10. Expert group on Vitamins and Minerals [EVM], (2002)
11. Krachler, M., Wirnsberger, G. H., "Long-term changes of plasma trace element concentrations in chronic hemodialysis patients", Blood Purif, (2000), 18, 2, 138–143
12. Meltzer, H. L., Taylor, R. M., Platman, S. R., Fieve, R. R., "Rubidium: A potential modifier of effect and behaviour", Nature, (1969), 223, 321–322
13. Canavese, C., DeCostanzi, E., Branciforte, L., "Rubidium deficiency in dialysis patients", J Nephrol, (2001), 14, 3, 169–175
14. Cooper, C., "Metals and Disease", The Biochemist, (2001), 1, 1-13
15. Millhauser, G. L., "Copper Binding in the Prion Protein", Accounts of Chemical Research, (2004), 37, 79-85
16. Maki, J. M., Sormunen, R., Lippo, S., Kaarteenaho-Wiik, R., Soininen, R., Myllyharju, J., "Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues", Am J Pathol, (2005), 167, 927-936
17. Lucero, H. A., Kagan, H. M., "Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function", Cell Mol Life Sci, (2006), 63, 2304-2316
18. Rucker, R. B., Rucker, B. R., Mitchell, A. E., Cui, C. T., Clegg, M., Kosonen, T., Uriu-Adams, J. Y., Tchapanian, E. H., Fishman, M., Keen, C. L., "Activation of chick tendon lysyl oxidase in response to dietary copper", J Nutr, (1999), 129, 2143-2146
19. Robb, E. L., Page, M. M., Wiens, B. E., Stuart, J. A., "Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD", Biochem Biophys Res Commun, (2008), 367, 406-412

20. Anke, M., "Handbuch der Lebensmitteltoxikologie – Belastungen, Wirkungen, Lebensmittelsicherheit, Hygiene", WILEY-VCH-Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Band 5, (2007), 2509-2558
21. Johnson, J. L., Jones, H. P. Rajagopalan, K. V., "In vitro reconstitution of demolybdosulfite oxidase by a molybdenum cofactor for rat liver and other sources", J. Biol. Chem., (1977), 252, 4994-5003
22. Rajagopalan, K. V., „Molybdenum: an essential trace element in human nutrition“, Annu Rev Nutr, (1988), 8, 401-427
23. Mendel, R. R., Smith, A. G., Marquet, A., Warren, M., "J. Metal and cofactor insertion", Nat Prod Rep, (2007), 24, 963-971
24. Schwarz, G. "Molybdenum cofactor biosynthesis and deficiency", Cell. Mol. Life Sci., (2005), 62, 2792-2810
25. Rangarajan, E. S., Asinas, A., Proteau, A., Munger, C., Baardsnes, J., Iannuzzi, P., Matte, A., Cygler, M., "Structure of [NiFe] hydrogenase maturation protein HypE from Escherichia coli and its interaction with HypF", Journal of Bacteriology, (2008), 190, 1447-1458
26. Bock, A., Forchhammer, K., Heider, J., Leinfelder, W., Sawers, G., Veprek, B., Zinoni, F., "Selenocysteine: the 21st amino acid", Mol Microbiol, (1991), 5, 515-520
27. Srinivasan, G., James, C. M., Krzycki, J. A., "Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA", Science, (2002), 296, 1459-1462
28. Combs, G. F., Jr., Gray, W. P., "Chemopreventive agents: selenium", Pharmacol Ther, (1998), 79, 179-192
29. Lu, J., Jiang, C., "Selenium and cancer chemoprevention: hypotheses integrating the actions of selenoproteins and selenium metabolites in epithelial and non-epithelial target cells", Antioxid Redox Signal, (2005), 7, 1715-1727
30. Kohrle, J., "Selenium and the control of thyroid hormone metabolism", Thyroid, (2005), 15, 841-853
31. Behne, D., Kyriakopoulos, A., "Mammalian selenium-containing proteins", Annu Rev Nutr, (2001), 21, 453-473
32. Kyriakopoulos, A., Behne, D., "Selenium-containing proteins in mammals and other forms of life", Rev Physiol Biochem Pharmacol, (2002), 145, 1-46
33. Rowett, H. G. Q., "The rat as a small mammal", John Murray, Thrid Edition, London, (1974)
34. Kreusel, K. M., Fromm, M., Schulzke, J. D., Hegel, U.; "Cl- secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6)", Am J Physiol; 261, 4 Pt 1, (1991), C574-C582
35. Falbe, J., Regitz, M., „Römp Chemie Lexikon“, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 9. Auflage, (1995)
36. Cambers, J.A., Rickwood, D.; "Fractionation of subcellular organelles by differential centrifugation"; Centrifugation: A practical approach, London: Information Retrieval Ltd., (1978), 33-47

37. Wu, S. L., Feng, X. B., Wittmeier, A.; "Microwave digestion of plant and grain reference materials in nitric acid or a mixture of nitric acid and hydrogen peroxide for the determination of multi-elements by inductively coupled plasma mass spectrometry"; *JAAS*, 12, 8, (1997), 797-806
38. Bradford, M.M.; "A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding"; *Anal. Biochem.*, 205, (1976), 22-26
39. Compton, S. J., Jones, C. G.; "Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay"; *Anal Biochem.*; 151, 2, (1985), 369-374
40. Laemmli, U. K.; "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4"; *Nature*, 5259, 227, (1970), 680-685
41. Davis, B. J.; "Disc Electrophoresis. II. Method and Application to Human Serum Proteins"; *Ann. N Y Acad. Sci.*, 121, (1964), 404-427
42. Ornstein, L.; "Disc Electrophoresis. I. Background and Theory"; *Ann. N Y Acad. Sci.*, 121, (1964), 321-349
43. Schägger, H., von Jagow, G.; "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa"; *Anal Biochem.*(1987), 166, 2, 368-379
44. Klose, J.; "Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals"; *Humangenetik*, (1975), 26, 3, 231-243
45. O'Farrell, P. H.; "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins"; *J Biol Chem*, (1975), 250, 10, 4007-4021
46. Klose, J., Kobalz, U.; "Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome"; *Electrophoresis*, (1995), 16, 6, 1034-1059
47. Anderson, N. L., Anderson, N. G.; "The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects"; *Mol Cell Proteomics*, (2002), 1, 11, 845,867
48. Tissot, J., D.,Schneider, P.James, R. W., Daigneault, R., Hochstrasser, D. F.; "High-resolution two-dimensional protein electrophoresis of pathological plasma/serum"; *Appl Theor Electrophor*, (1991), 2, 1, 7-12
49. Piperno, G., Huang, B., Luck, D. J.; "Two-dimensional analysis of flagellar proteins from wild-type and paralyzed mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*"; *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1977), 74, 4, 1600-1604
50. O'Farrell, P. Z., Goodman, H. M., O'Farrell, P. H.; "High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins"; *Cell*, (1977), 12, 4, 1133-1141
51. Rais, I., Karas, M., Schägger, H., "Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification", *Proteomics*, (2004), 4, 2567-2571
52. Richter, G.; „Praktische Biochemie, Grundlagen und Techniken“; Georg Thieme Verlag, (2003), 87, 195-199
53. Blum, H., Gross, H.J., Beier, H.; "Improved silver staining of plant proteins, RNS and DNA in polyacrylamid gels"; *Electrophoresis*, (1987), 8, 2, 93-99

54. Kurien, B. T., Scofield, R. H.; "Protein blotting: a review"; *J Immunol Methods*, (2003), 274, 1-2, 1-15
55. Westermeier, R., Gronau, S., Schickle, H.; „Semidry-blotting von Proteinen aus SDS- und IEF-Polyacrylamidgelen“; Pharmacia LKB Sonderdruck SD 072, (1989)
56. Mori, N., Oikawa, T., Katoh, T., Miyahara, J., Harada, Y.; "Application of the "imaging plate" to TEM image recording"; *Ultramicroscopy*, (1988), 25, 3, 195-201
57. Amemiya, Y., Miyahara, J.; "Imaging plate illuminates many fields"; *Nature*, (1988), 336, 6194,89-90
58. Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H., Schubert, D., "Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction"; *J Neurochem*, (1997), 69, 2, 581-593
59. Reopstorff, P., Larsen, M., Nielsen, H.R., Nordhoff, E.; "Sample preparation Methods for matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry of peptide, proteins and nucleic acid"; *Cell Biologie, A laboratory handbook*, (1997), 2nd edition
60. Holcapek, M., Kolarova, L., Nobilis, M., "High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites", *Anal Bioanal Chem*, (2008), 391, 59-78
61. Behne, D.; Gawlik, D.; „Spurensuche: Neutronenaktivierungsanalyse in der Spurenelementforschung; Berichte aus dem HMI“; (1989), 1/89; 9-22
62. Sommer, D.; Grunenberg, D.; Koch, V.H.; „Auswahlkriterien für ein optimales Zerstäubersystem in der ICP-Spektrometrie“; *GIT Fachz. Lab.*; (1985), 29, 524
63. Sharp, B. L., "Pneumatic Nebulizers and Spray Chambers for Inductively Coupled Plasma Spectrometry - a Review .2. Spray Chambers", *J. Anal. At. Spectr.*, (1988), 3, 7, 939-963
64. Date, A. R.; Gray, A. L.; "Applications of inductively coupled plasma mass spectrometry"; *Am. Soc. Test. Mater.*, (1989), 17-36
65. Tanner, S. D.; "Space-Charge in ICP-MS – Calculation and Implication –"; *Spectrochim. Acta*; (1992), Part B, 47, 809-823
66. Vadecastele, C.; "Suppression of Analyte Signal in Inductively-Coupled Plasma/Mass Spectrometry and the Use of an Internal Standard"; *Anal. Chim. Acta*; (1988), 211, 91-98
67. Naumer, H.; Heller, W.; „Untersuchungsmethoden in der Chemie, Einführung in die moderne Analytik“; Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 3. Auflage, (1997), 308
68. Welz, B., Slemmer, G., Mudakavi, J.R.; "Palladium Nitrate-Magnesium Nitrate Modifier for Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry- Part 5. Performance for the Determination of 21 Elements"; *J. Anal. At. Spectrom.*; 7/8, (1992), 1257-1271
69. Welz, B.; Sperling, M.; „Atomabsorptionsspektrometrie“; Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 4. Auflage, (1999), 102
70. Gueffroy, D.E.; Buffers, "A guide for the preparation and use of buffers in biological systems", *Calbiochem Corporation, La Jolla*, 9. Auflage, (1990)
71. Aced, G., Möckel, H.J.; „Liquidchromatographie: Apparative, theoretische und methodische Grundlagen der HPLC“; VCH Verlag, Weinheim, (1991)
72. Meyer, V.R.; „Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie“; *Laborbücher Chemie, Otto Salle Verlag & Verlag Sauerländer AG*, 6. Auflage, (1990)

73. Informationsbroschüre der Firma Phenomenex; "A user's Guide: Introduction to Peptide and Protein HPLC"; Phenomenex, 2320 West 205th Street, Torrance, California 90501 USA, (1998)
74. Kägi, J.H.R.; "Overview of Metallothionein"; in Riordan, J.F., Vallee, Methods in Enzymology 205, Metallobiochemistry Part B: Metallothionein and Related Molecules, (1991), 613-626
75. Arnold, N., Luky Anchuk, B., Biturin, N.; "A Fast Quantitative Modeling of Ns Laser-Ablation Based on Nonstationary Averaging Technique"; Appl. Surf. Sci., 129, (1998), 184-192
76. Bulgakov, N.M., Bulgakov, A.V.; "Pulsed-Laser Ablation of Solids, Transition From Normal Vaporization to Phase Explosion"; Appl. Phys., A 73, (2001), 199-208
77. Miotello, A. Kelly, R.; "Laser-Induced Phase Explosion – New Physical Problems When a Condensed-Phase Approaches the Thermodynamic Critical Temperature", Appl. Phys. A Mat. Sci Process, 69, (1999), S67-S73
78. Rauch, S., Morrison, G.M., Moldovan, M.; "Scanning Laser Ablation-ICP-MS Tracking of Platinum Group Elements in Urban Particles"; The Science of the Total Environment, 286, (2002), 243-251
79. Plotnikov, A., Vogt, C., Wetzig, K.; "An approach to the reconstruction of true concentration profile from transient signal in spatially resolved analysis by means of laser ablation ICP MS", JAAS, (2002), 17, 9, 1114-1120
80. Horn, I., Guillon, M. Günther, D.; "Wavelength Dependant Ablation Rates for Metals and Silicate Glasses Using Homogenized Laser Beam Profiles – Implications for LA-ICP-MS"; Appl. Surf. Sci., 182, (2001), 91-102
81. Arrowsmith, P.; Hughes, S.K.; "Entrainment and Transportation of Laser Ablated Plumes for Subsequent Analysis"; Appl. Spectrosc., 42, (1988), 1231-1239
82. Takahashi, S., Takahashi, I., Sato, H., Kubota, Y., Yoshida, S., Muramatsu, Y.; "Determination of major and trace elements in the liver of Wistar rats by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry and mass spectrometry"; Laboratory Animals, (2000), 34, 1, 97-105
83. Yu, S. G., Beems, R. B., Joles, J. A., Kaysen, G. A., Beynen, A. C., „Iron and Copper-Metabolism in Analbuminemic Rats Fed a High-Iron Diet”, Comp. Biochem. Physiol., (1995), 110, 2, 131-138
84. Schramel, P., „Anwendung der ICP-MS für die Spurenelementbestimmung in biologischen Materialien“, Analytiker Taschenbuch, Band 15, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, (1997), 89-120
85. Vanhoe, H., "A Review of the Capabilities of Icp-Ms for Trace-Element Analysis in Body-Fluids and Tissues", Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease, (1993), 7, 3, 131-139
86. Hawkes, W. C., Wilhelmsen, E. C., Tappel, A. L., „Subcellular distribution of selenium-containing proteins in the rat”, J Inorg Biochem, (1985), 25, 2, 77-93
87. Richarz, A. N., Wolf, C., Bratter, P. "Determination of protein-bound trace elements in human cell cytosols of different organs and different pathological states", Analyst, (2003), 128, 6, 640-645

88. Sun, Q. A., Zappacosta, F., Factor, V. M., Wirth, P. J., Hatfield, D. L., Gladyshev, V. N., "Heterogeneity within animal thioredoxin reductases. Evidence for alternative first exon splicing", *J Biol Chem*, (2001), 276, 5, 3106-3114
89. Tamura, T., Stadtman, T. C., "A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity", *Proc Natl Acad Sci USA*, (1996), 93, 3, 1006-1011
90. Arthur, J. R., "The glutathione peroxidases", *Cell Mol Life Sci*, (2000), 57, 13-14, 1825-1835
91. Chu, F. F., Doroshov, J. H., Esworthy, R. S., "Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GP", *J Biol Chem*, (1993), 268, 4, 2571-2576
92. Ursini, F., Maiorino, M., Valente, M., Ferri, L., Gregolin, C., "Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides", *Biochim Biophys Acta*, (1982), 710, 2, 197-211
93. Kyriakopoulos, A., Bertelsmann, H., Graebert, A., Hoppe, B., Kuhbacher, M., Behne, D., "Distribution of an 18 kDa-selenoprotein in several tissues of the rat", *J Trace Elem Med Biol*, (2002), 16, 1, 57-62
94. Gladyshev, V. N., Jeang, K. T., Wootton, J. C., Hatfield, D. L., "A new human selenium-containing protein. Purification, characterization, and cDNA sequence", *J Biol Chem*, (1998), 273, 15, 8910-8915
95. Kyriakopoulos, A., Kalcklosch, M., Weiss-Nowak, C., Behne, D., "Studies on 16 kDa selenium-containing proteins enriched by means of preparative electrophoresis", *Electrophoresis*, (1993), 14, 1-2, 108-111
96. Behne, D., Kyriakopoulos, A., Weiss-Nowak, C., Kalckloesch, M., Westphal, C., Gessner, H., "Newly found selenium-containing proteins in the tissues of the rat", *Biological Trace Element Research*, (1996), 55, 1-2, 99-110
97. Motsenbocker, M. A., Tappel, A. L., "Selenocysteine-containing proteins from rat and monkey plasma", *Biochim Biophys Acta*, (1982), 704, 2, 253-260
98. Arthur, J. R., Nicol, F., Beckett, G. J., "Hepatic iodothyronine 5'-deiodinase. The role of selenium", *Biochem J*, (1990), 272, 2, 537-540
99. Oh, T. Y., Yeo, M., Han, S. U., Cho, Y. K., Kim, Y. B., Chung, M. H., Kim, Y. S., Cho, S. W., Hahn, K. B., "Synergism of *Helicobacter pylori* infection and stress on the augmentation of gastric mucosal damage and its prevention with alpha-tocopherol", *Free Radic Biol Med*, (2005), 38, 11, 1447-1457
100. Hwang, T. S., Choi, H. K., Han, H. S., "Differential expression of manganese superoxide dismutase, copper/zinc superoxide dismutase, and catalase in gastric adenocarcinoma and normal gastric mucosa", *Eur J Surg Oncol*, (2007), 33, 4, 474-479
101. Brooksbank, B, Balazs, R; "Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and lipoperoxidation in Down's syndrome fetal brain", *Brain Res*. (1984); 318, (1), 37-44
102. Okamoto, O., Fujiwara, S., "Dermatopontin, a novel player in the biology of the extracellular matrix", *Connect Tissue Res*, (2006), 47, 4, 177-189
103. Takeuchi, T., Suzuki, M., Kumagai, J., Kamijo, T., Sakai, M., Kitamura, T., "Extracellular matrix dermatopontin modulates prostate cell growth in vivo", *J Endocrinol*, (2006), 190, 2, 351-361

104. Takeda, U., Utani, A., Wu, J., Adachi, E., Koseki, H., Taniguchi, M., Matsumoto, T., Ohashi, T., Sato, M., Shinkai, H. , “Targeted disruption of dermatopontin causes abnormal collagen fibrillogenesis”, *J Invest Dermatol*, (2002), 119, 3, 678-683
105. Forbes, E. G., Cronshaw, A. D., MacBeath, J. R., Hulmes, D. J., “Tyrosine-rich acidic matrix protein (TRAMP) is a tyrosine-sulphated and widely distributed protein of the extracellular matrix”, *FEBS Lett*, (1994), 351, 3, 433-436
106. Cronshaw, A. D., MacBeath, J. R., Shackleton, D. R., Collins, J. F., Fothergill-Gilmore, L. A., Hulmes, D. J., “TRAMP (tyrosine rich acidic matrix protein), a protein that co-purifies with lysyl oxidase from porcine skin. Identification of TRAMP as the dermatan sulphate proteoglycan-associated 22K extracellular matrix protein”, *Matrix*, (1993), 13, 3, 255-266
107. Viguet-Carrin, S., Garnero, P., Delmas, P. D., “The role of collagen in bone strength”, *Osteoporos Int*, (2006), 17, 3, 319-336
108. Smith-Mungo, L. I., Kagan, H. M., “Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology“ ,*Matrix Biol* , (1998), 16, 7, 387-398
109. Sato, M., Sasaki, M., Hojo, H., “Induction of Metallothionein synthesis by oxidative stress and possible role in acute phase response”, *Metallothionein III – Biological Roles and Medical Implications*”, Suzuki, K.T., Imura, N., Kimura, M., Birkhäuser Verlag Basel, Boston, Berlin, (1993), 125-140
110. Bremner, I., “Interactions between metallothionein and trace elements”, *Prog Food Nutr Sci*, (1987), 11, 1, 1-37
111. Bremner, I., Beattie, J. H., „Metallothionein and the trace minerals”, *Annu Rev Nutr*, (1990), 10, 63-83
112. Nordberg, M., “Metallothioneins: historical review and state of knowledge”, *Talanta* (1998), 46, 2, 243-54
113. Peng, S., Shan, X. Q., Zheng, Y., Jin, L. Z., Xu, W. B., “Determination of dietary cadmium-induced metallothioneins in rabbit kidneys and cadmium in metallothioneins by anion-exchange high-performance liquid chromatography coupled with graphite furnace atomic absorption spectrometry”, *J Chromatogr*, (1991), 572, 1-2, 73-84
114. Quaipe, C. J., Findley, S. D., Erickson, J. C., Froelick, G. J., Kelly, E. J., Zambrowicz, B. P., Palmiter, R. D., “Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia”, *Biochemistry*, (1994), 33, 23, 7250-7259
115. Wang, R., Sens, D. A., Albrecht, A., Garrett, S., Somji, S., Sens, M. A., Lu, X., „Simple method for identification of metallothionein isoforms in cultured human prostate cells by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry”, *Anal Chem*, (2007), 79, 12, 4433-4441
116. Kalcklosch, M., Kyriakopoulos, A., Hammel, C., Behne, D., „A new selenoprotein found in the glandular epithelial cells of the rat prostate”, *Biochem Biophys Res Commun*, (1995), 217, 1, 162-170
117. Kumaraswamy, E., Malykh, A., Korotkov, K. V., Kozyavkin, S., Hu, Y., Kwon, S. Y., Moustafa, M. E., Carlson, B. A., Berry, M. J., Lee, B. J., Hatfield, D. L., Diamond, A. M., Gladyshev, V. N., “Structure-expression relationships of the 15-kDa selenoprotein gene. Possible role of the protein in cancer etiology”, *J Biol Chem*, (2000), 275, 45, 35540-35547

118. Kyriakopoulos, A., Bukalis, K., Roethlein, D., Hoppe, B., Graebert, A., Behne, D., „Prevention against oxidative stress of eukaryotic cell membranes by selenium compounds of the rat” *Ann N Y Acad Sci*, (2004), 1030, 458-461
119. Behne, D., Hilmert, H., Scheid, S., Gessner, H., Elger, W., „Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins”, *Biochim Biophys Acta*, (1988), 966, 1, 12-21
120. Takahashi, K., Avissar, N., Whittin, J., Cohen, H., “Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme”, *Arch Biochem Biophys*, (1987), 256, 2, 677-686
121. Avissar, N., Ornt, D. B., Yagil, Y., Horowitz, S., Watkins, R. H., Kerl, E. A., Takahashi, K., Palmer, I. S., Cohen, H. J., “Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase”, *Am J Physiol*, (1994), 266, 2 Pt 1, C367-C375
122. Chaney, R. L., Reeves, P. G., Ryan, J. A., Simmons, R. W., Welch, R. M., Angle, J. S., “An improved understanding of soil Cd risk to humans and low cost methods to phytoextract Cd from contaminated soils to prevent soil Cd risks”, *Biometals*, (2004), 17, 5, 549-553
123. Reeves, P. G., Chaney, R. L., “Marginal nutritional status of zinc, iron, and calcium increases cadmium retention in the duodenum and other organs of rats fed rice-based diets”, *Environ Res*, (2004), 96, 3, 311-322
124. Papanastasiou, D. A., Vayenas, D. V., Vassilopoulos, A., Repanti, M., “Concentration of iron and distribution of iron and transferrin after experimental iron overload in rat tissues in vivo: Study of the liver, the spleen, the central nervous system and other organs”, *Pathology Research and Practice*, (2000), 196, 1, 47-54
125. Chareonpongkawatamoto, N., Yasumoto, K., “Selenium Deficiency as a Cause of Overload of Iron and Unbalanced Distribution of Other Minerals”, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, (1995), 59, 2, 302-306
126. Higgins, E. S., Richert, D. A., Westerfeld, W. W., „Molybdenum deficiency and tungstate inhibition studies”, *J Nutr*, (1956), 59, 4, 539-559
127. Anke, M., “Molybdän”, *Handbuch der Lebensmitteltoxilogie*, (2007), Band 5, WILEY-VCH Verlag GmbH & Ko. KGaA, Weinheim, 2509-2558
128. Behne, D., Scheid, S., Kyriakopoulos, A., Hilmert, H., „Subcellular distribution of selenoproteins in the liver of the rat”, *Biochim Biophys Acta*, (1990), 1033, 3, 219-225
129. Chareonpongkawatamoto, N., Higasa, T., Yasumoto, K., “Histological Study of Iron Deposits in Selenium-Deficient Rats”, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, (1995), 59, 10, 1913-1920
130. Lee, G. R., Bithell, T.C., Athens, J. W., Foerster, J., Lukens, J. N., “Wintrobe’s Clinical Hematology”, (1993) 9th Ed., Vol.1, Lea & Febiger, Philadelphia, London, 1232-1244
131. Pizarro, I., Gomez, M., Camara, C., Palacios, M. A., Roman-Silva, D. A., “Evaluation of arsenic species-protein binding in cardiovascular tissues by bidimensional. chromatography with ICP-MS detection”, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (2004), 19, 2, 292-296
132. Katoh, M., Aono, S., Keino, H., Kashiwamata, S., “High-molecular-weight cadmium-binding proteins in rat liver cytosol: isolation and partial characterization of an approximately 50-kDa protein”, *J Biochem*, (1987), 102, 6, 1459-1468

133. Vivoli G, Bergomi M, Rovesti S, Pinotti M, Caselgrandi E, "Zinc, copper, and zinc- or copper-dependent enzymes in human hypertension" *Biol Trace Elem Res.*, (1995), 49, 2-3, 97-106
134. Koolman, J., Röhm, K. H., „Taschenbuch der Biochemie“, (1998), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
135. Shieh, J. J., Yasunobu, K. T., "Purification and properties of lung lysyl oxidase, a copper-enzyme", *Adv Exp Med Biol*, (1976), 74, 447-463
136. Aisen, P., Enns, C., Wessling-Resnick, M., "Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism", *Int J Biochem Cell Biol*, (2001), 33, 10, 940-959
137. Kulkarni, G. V., Deobagkar, D. D., „A cytosolic form of aminopeptidase P from *Drosophila melanogaster*: molecular cloning and characterization", *J Biochem*, (2002), 131, 3, 445-452
138. Scheuhammer, A. M., Cherian, M. G., "Binding of manganese in human and rat plasma", *Biochim Biophys Acta*, (1985), 840, 163-169
139. Lau, S. J., Sarkar, B., "Comparative studies of manganese(II)-, nickel(II)-, zinc(II)-, copper(II)-, cadmium(II)-, and iron(III)-binding components in human cord and adult sera", *Can J Biochem Cell Biol*, (1984), 62, 449-455
140. Herlant-Peers, M. C., Hildebrand, H. F., Kerckaert, J. P., "In vitro and in vivo incorporation of $^{63}\text{Ni}[\text{II}]$ into lung and liver subcellular fractions of Balb/C mice", *Carcinogenesis*, (1983), 4, 387-392
141. Nomoto, S., McNeely, M. D., Sunderman, F. W., Jr., "Isolation of a nickel alpha 2-macroglobulin from rabbit serum", *Biochemistry*, (1971), 10, 1647-1651
142. Glennon, J. D., Sarkar, B., "Nickel(II) transport in human blood serum. Studies of nickel(II) binding to human albumin and to native-sequence peptide, and ternary-complex formation with L-histidine", *Biochem J*, (1982), 203, 15-23
143. Denkhaus, E., Salnikow, K., "Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity", *Crit Rev Oncol Hematol*, (2002), 42, 35-56
144. Templeton, D. M., Sarkar, B., "Peptide and carbohydrate complexes of nickel in human kidney", *Biochem J*, (1985), 230, 35-42
145. Grbac-Ivankovic, S., Antonijczuk, K., Varghese, A. H., Plowman, M. C., Antonijczuk, A., Korza, G., Ozols, J., Sunderman, F. W., Jr., "Lipovitellin 2 beta is the 31 kD Ni(2+)-binding protein (pNiXb) in *Xenopus* oocytes and embryos", *Mol Reprod Dev*, (1994), 38, 256-263
146. Kryukov, G. V., Castellano, S., Novoselov, S. V., Lobanov, A. V., Zehtab, O., Guigo, R., Gladyshev, V. N., "Characterization of mammalian selenoproteomes", *Science*, (2003), 300, 1439-1443
147. Hill, K. E., Lloyd, R. S., Yang, J. G., Read, R., Burk, R. F., "The cDNA for rat selenoprotein P contains 10 TGA codons in the open reading frame", *J Biol Chem*, (1991), 266, 10050-10053
148. Kryukov, G. V., Kumar, R. A., Koc, A., Sun, Z., Gladyshev, V. N., "Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase", *Proc Natl Acad Sci*, (2002), U S A 99, 4245-4250

149. Vendeland, S. C., Beilstein, M. A., Chen, C. L., Jensen, O. N., Barofsky, E., Whanger, P. D. "Purification and properties of selenoprotein W from rat muscle", *J Biol Chem*, (1993), 268, 17103-17107
150. Hattori H, Imai H, Furuhashi K, Sato O, Nakagawa Y, "Induction of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in human polymorphonuclear neutrophils and HL60 cells stimulated with TNF-alpha", *Biochem Biophys Res Commun*, (2005), 2, 337, 464-473
151. Behne, D., Kyriakopoulos, A., Meinhold, H., Kohrle, J., "Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme", *Biochem Biophys Res Commun*, (1990), 173, 1143-1149
152. Bontemps, Y., Vuillermoz, B., Antonicelli, F., Perreau, C., Danan, J. L., Maquart, F. X., Wegrowski, Y., "Specific protein-1 is a universal regulator of UDP-glucose dehydrogenase expression: its positive involvement in transforming growth factor-beta signaling and inhibition in hypoxia", *J Biol Chem*, (2003), 278, 24, 21566-21575
153. Ip, C., "Lessons from basic research in selenium and cancer prevention", *J Nutr*, (1998), 128, 11, 1845-1854
154. Ganther, H. E., "Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase", *Carcinogenesis*, (1999), 20, 9, 1657-1666
155. Thirunavukkarasu, C., Prince Vijeya Singh, J., Thangavel, M., Selvendiran, K., Sakthisekaran, D., "Dietary influence of selenium on the incidence of N-nitrosodiethylamine-induced hepatoma with reference to drug and glutathione metabolizing enzymes", *Cell Biochem Funct*, (2002), 20, 4, 347-356
156. Carpenter, K., Pollitt, R. J., Middleton, B., "Human liver long-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase is a multifunctional membrane-bound beta-oxidation enzyme of mitochondria", *Biochem Biophys Res Commun*, (1992), 183, 2, 443-448
157. Huang, K., Liu, H., Chen, Z., Xu, H., "Role of selenium in cytoprotection against cholesterol oxide-induced vascular damage in rats", *Atherosclerosis*, (2002), 162, 1, 137-144
158. Prabhu, K. S., Zamamiri-Davis, F., Stewart, J. B., Thompson, J. T., Sordillo, L. M., Reddy, C. C., "Selenium deficiency increases the expression of inducible nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages: role of nuclear factor-kappaB in up-regulation", *Biochem J*, (2002), 366, Pt 1, 203-209
159. Schafer, K., Kyriakopoulos, A., Gessner, H., Grune, T., Behne, D., "Effects of selenium deficiency on fatty acid metabolism in rats fed fish oil-enriched diets", *J Trace Elem Med Biol*, (2004), 18, 1, 89-97
160. Nandi D., Tahiliani P., Kumar A. and Chandu D., "The ubiquitin-proteasome system", *J Biosci*, (2006), 1: 137-55
161. Koenig, R. J., "Ubiquitinated deiodinase: not dead yet", *J Clin Invest*, (2003), 112, 2, 145-147
162. Jeong, J. Y., Wang, Y., Sytkowski, A. J., "Human selenium binding protein-1 (hSP56) interacts with VDU1 in a selenium-dependent manner", *Biochem Biophys Res Commun*, (2009), 379, 2, 583-588

163. Nam M. J., Madoz-Gurpide J., Wang H., Lescure P., Schmalbach C. E., Zhao R., Misek D. E., Kuick R., Brenner D. E. and Hanash S. M., "Molecular profiling of the immune response in colon cancer using protein microarrays: occurrence of autoantibodies to ubiquitin C-terminal hydrolase L3", *Proteomics* (2003), 11: 2108-2115
164. Miyoshi Y., Nakayama S., Torikoshi Y., Tanaka S., Ishihara H., Taguchi T., Tamaki Y. and Noguchi S., "High expression of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1 and -L3 mRNA predicts early recurrence in patients with invasive breast cancer", *Cancer Sci* (2006), 6: 523-529
165. Rolen U., Kobzeva V., Gasparjan N., Ovaa H., Winberg G., Kisseljov F. and Masucci M. G., "Activity profiling of deubiquitinating enzymes in cervical carcinoma biopsies and cell lines", *Mol Carcinog* (2006), 4: 260-269
166. Kwon J., Wang Y. L., Setsuie R., Sekiguchi S., Sato Y., Sakurai M., Noda M., Aoki S., Yoshikawa Y. and Wada K., "Two closely related ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes function as reciprocal modulators of germ cell apoptosis in cryptorchid testis", *Am J Pathol* (2004), 4: 1367-1374
167. Kwon J., Sekiguchi S., Wang Y. L., Setsuie R., Yoshikawa Y. and Wada K., "The region-specific functions of two ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes along the epididymis", *Exp Anim* (2006), 1: 35-43
168. Kwon J. "The new function of two ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes as reciprocal modulators of germ cell apoptosis", *Exp Anim* (2007), 2: 71-77
169. Sano Y., Furuta A., Setsuie R., Kikuchi H., Wang Y. L., Sakurai M., Kwon J., Noda M. and Wada K., "Photoreceptor cell apoptosis in the retinal degeneration of Uchl3-deficient mice", *Am J Pathol* (2006), 1: 132-141
170. Lee, J. H., Chung, K. Y., Bang, D., Lee, K. H., „Searching for aging-related proteins in human dermal microvascular endothelial cells treated with anti-aging agents”, *Proteomics*, (2006), 6, 4, 1351-1361
171. Nijtmans, L. G., de Jong, L., Artal Sanz, M., Coates, P. J., Berden, J. A., Back, J. W., Muijsers, A. O., van der Spek, H., Grivell, L. A., "Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins", *Embo J*, (2000), 19, 11, 2444-2451
172. Terashima, M., Kim, K. M., Adachi, T., Nielsen, P. J., Reth, M., Kohler, G., Lamers, M. C., „The IgM antigen receptor of B lymphocytes is associated with prohibitin and a prohibitin-related protein”, *Embo J*, (1994), 13, 16, 3782-3792
173. Wang, S., Fusaro, G., Padmanabhan, J., Chellappan, S. P., "Prohibitin co-localizes with Rb in the nucleus and recruits N-CoR and HDAC1 for transcriptional repression", *Oncogene*, (2002), 21, 55, 8388-8396
174. Rajalingam, K., Rudel, T., "Ras-Raf signaling needs prohibitin", *Cell Cycle*, (2005), 4, 11, 1503-1505
175. Rudolf, E., Rudolf, K., Cervinka, M., "Selenium activates p53 and p38 pathways and induces caspase-independent cell death in cervical cancer cells", *Cell Biol Toxicol* (2008), 2: 123-141
176. Garnett, M. J., Marais, R., "Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene", *Cancer Cell*, (2004), 6, 4, 313-319

177. Ramirez, P., Del Razo, L. M., Gutierrez-Ruiz, M. C., Gonsebatt, M. E., "Arsenite induces DNA-protein crosslinks and cytokeratin expression in the WRL-68 human hepatic cell line", *Carcinogenesis*, (2000), 21, 4, 701-706
178. Squibb, K.S., Fowler, B.A., "The toxicity of arsenic and its compounds", *Biological and Environmental Effects of Arsenic*, (1983), Elsevier, Amsterdam, 223-269
179. Hayashi, K., Fong, K. S., Mercier, F., Boyd, C. D., Csiszar, K., Hayashi, M., "Comparative immunocytochemical localization of lysyl oxidase (LOX) and the lysyl oxidase-like (LOXL) proteins: changes in the expression of LOXL during development and growth of mouse tissues", *J Mol Histol*, (2004), 35, 845-855
180. Maser, R. L., Magenheimer, B. S., Calvet, J. P., "Mouse plasma glutathione peroxidase. cDNA sequence analysis and renal proximal tubular expression and secretion", *J Biol Chem*, (1994), 269, 27066-27073

Erklärung

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

Torsten Bartz

Vorabveröffentlichungen von Teilen der Arbeit

Veröffentlichungen

1. **Bartz, T.; Wolf, C.; Alber, D.; Zimmer, A.; Kyriakopoulos, A.**
„Distribution of trace elements in organs of the digestive system of the rat”
Proceedings of the 5th Fall Conference on Metallobiolumics 2006 Berlin, Herbert Utz Verlag, 65-69
2. **Bartz, T. ; Wolf, C. ; Alber, D. ; Bartel, J. ; Kyriakopoulos, A.**
„Comparison of different analytical methods for the detection of selenium in the stomach of the rat”
Proceedings of the European Conference on Metallobiolumics 2007 Berlin, Herbert Utz Verlag, 53-61
3. **Bartz, T., Wolf, C., Alber, D., Bartel, J., Kyriakopoulos, A.**
“Detection of selenium by different analytical and biochemical methods in the stomach of the rat”
FEBS Journal Volume 275 Suppl. 1, 2008
4. **Bartz, T., Bartel, J., Soete, J., Charkiewicz, E., Kyriakopoulos, A.**
“Expression Pattern of the Ubiquitin C-terminal Hydrolase in Rat Colon and the Human Colon Carcinoma Cell line HT-29”
Anticancer Research, 2008, 28
5. **Bartz, T., Charkiewicz, E., Bartel, J., Söte, A., Kyriakopoulos, A.**
„Molybdän im Dickdarm und in der Dickdarmkarzinomzelllinie HT29“
Experimentelle Modelle der Spurenelementforschung, 2008 München, Herbert Utz Verlag, - submitted
6. **Bartz, T., Schmidt, D., Charkiewicz, E., Bartel, J., Kyriakopoulos, A.**
„Investigation of metal- and metalliod binding proteins in the tongue of the rat by means of SEC-ICP-MS”
Proceedings of the European Conference on Metallobiolumics 2008 Berlin, - submitted
7. **Kyriakopoulos A, Bartz T.**
“Distribution of metal-containing proteins in the mu-organelles of the rat liver”
EJCB, 2007, 86, 27
8. **Bartel, J., Bartz, T., Wolf, C., Charkiewicz, E., Kühbacher, M., Pohl, T. Kyriakopoulos A.**
“Activity of the Glutathione Peroxiase-2. Differences in the Selenium-dependent Expression between Colon and Small Intestine”
Cancer Genomics & Proteomics, 2007, 4 (5), 369-372
9. **Bartel, J., Bartz, T., Wolf, C., Charkiewicz, E., Kühbacher, M., Pohl, T. Kyriakopoulos A.**
„Distribution of the proteins in the small intestine of the rat investigated by 2D-electrophoresis”
Cancer Genomics & Proteomics , 2007 4 (4)

10. **Bartel, J., Bartz, T., Wolf, C., Charkiewicz, E., Kühbacher, M., Pohl, T. Kyriakopoulos A.**
"Expression of the proteins in the small intestine of the rat investigated by 2D-electrophoresis"
Proceedings of the 5th Fall Conference on Metallobiolomics **2006** Berlin, Herbert Utz Verlag, 60-64
11. **Charkiewicz, E., Bartel, J., Bartz, T., Wolf, C., Kühbacher, M., Pohl, T. Kyriakopoulos A.**
"Distribution of small proteins in the colon of the rat in consideration of the selenium status"
Proceedings of the 5th Fall Conference on Metallobiolomics **2006** Berlin, Herbert Utz Verlag, 70-74
12. **Bartel, J., Charkiewicz, E., Bartz, T., Kyriakopoulos A.**
"Expression Pattern of the Ubiquitin C-terminal Hydrolase in Apoptosis of HepG2"
Ann N Y Acad Sci., **2008** - submitted
13. **Charkiewicz, E., Bartel, J., Bartz, T., Kyriakopoulos A.**
"Relationship of Selenite and Glutathione Peroxidase in Apoptosis"
Ann N Y Acad Sci., **2008** - submitted
14. **Charkiewicz, E., Bartel, J., Plotnikov, A., Bartz, T., Bartel, J., Kyriakopoulos, A.**
"The Role of Selenium in the Antioxidative Defence System of Skeletal Muscle"
Proceedings of the European Conference on Metallobiolomics **2008** Berlin, Herbert Utz Verlag - submitted
15. **Bartel, J., Charkiewicz, E., Bartel, J., Bartz, T., Kyriakopoulos, A.**
"Studies about the Deubiquitinating Enzyme UCH-L3 in the Metabolism of Selenium"
Proceedings of the European Conference on Metallobiolomics **2008** Berlin, Herbert Utz Verlag - submitted
16. **Röntgen, T., Bartz, T., Schmidt, D., Plotnikov, A., Kyriakopoulos, A.**
"Chemical analysis of kidney tissues from several animal species by different methods in particular consideration of their advantages and disadvantages for determination of the trace elements concentrations"
Proceedings of the European Conference on Metallobiolomics **2008** Berlin, Herbert Utz Verlag - submitted
17. **Schmidt, D., Graebert, A., Plotnikov, A., Bartz, T., Kyriakopoulos, A.**
"Combination of biochemical and analytical methods in the studies of trace elements and metalloproteins in the nuclear envelope"
Proceedings of the European Conference on Metallobiolomics **2008** Berlin, Herbert Utz Verlag - submitted

Posterpräsentationen

Bartz, T., Wolf, C., Alber, D., Zimmer, A., Kyriakopoulos, A.

„Verteilung von Spurenelementen in den Geweben des Gastrointestinalen Trakts der Ratte“
5th Fall Conference on Metallobiomics **2006** Berlin

Bartz, T., Wolf, C., Alber, D., Bartel, J., Kyriakopoulos, A.

“Comparison of different analytical methods for the detection of selenium in the stomach of the rat”

1st European Conference on Metallobiomics **2007** Berlin

Bartz, T., Schmidt, D., Kyriakopoulos, A.

“Investigation of trace elements and trace element binding proteins in the tongue of the rat by bioanalytical methods”

2nd European Conference on Metallobiomics **2008** Berlin

Bartz, T., Bartel, J., Söte, A., Charkiewicz, E., Bartel, J., Kyriakopoulos, A.

“Expression Pattern of the Ubiquitin C-terminal Hydrolase in Rat Colon and the Human Colon Carcinoma Cell line HT-29.”

8th International Conference of Anticancer Research **2008**, Kos

Bartz, T., Charkiewicz, E., Bartel, J., Söte, A., Kyriakopoulos, A.

“Molybdenum in Rat Colon and the Human Colon Carcinoma Cell line HT29.”

24. Jahrestagung der GMS **2008**, Berlin

Bartz, T., Wolf, C., Alber, D., Bartel, J., Kyriakopoulos, A.

“Detection of selenium by different analytical and biochemical methods in the stomach of the rat”

33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference Biochemistry of Cell Regulation **2008**, Athen

Posterpreise

Bartz, T., Wolf, C., Alber, D., Zimmer, A., Kyriakopoulos, A.

„Verteilung von Spurenelementen in den Geweben des Gastrointestinalen Trakts der Ratte“
5th Fall Conference on Metallobiomics **2006** Berlin – 3. Preis

Bartz, T., Schmidt, D., Kyriakopoulos, A.

“Investigation of trace elements and trace element binding proteins in the tongue of the rat by bioanalytical methods”

2nd European Conference on Metallobiomics **2008** Berlin – 3. Preis

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

Anhang

Tmprss13 predicted similar to Transmembrane protease, serine 13

Names and origin

Protein names Submitted name:

Tmprss13 protein EMBL AAI66801.1

Gene names

Name: Tmprss13 EMBL AAI66801.1 RGD 1310872

Organism Rattus norvegicus (Rat) EMBL AAI66801.1

Taxonomic identifier 10116 [NCBI]

Taxonomic lineage Eukaryota > Metazoa > Chordata > Craniata > Vertebrata > Euteleostomi > Mammalia > Eutheria > Euarchontoglires > Glires > Rodentia > Sciurognathi > Muroidea > Muridae > Murinae > Rattus

Protein attributes

Sequence length 539 AA.

Sequence status Complete.

Sequence processing The displayed sequence is not processed.

Protein existence Evidence at transcript level.

Ontologies

Gene Ontology (GO)

Biological process proteolysis

Inferred from electronic annotation. Source: InterPro

Cellular component membrane

Inferred from electronic annotation. Source: InterPro

Molecular function scavenger receptor activity

Inferred from electronic annotation. Source: InterPro

serine-type endopeptidase activity

ProtParam

10	20	30	40	50	60
MDRGSHRNAS	PARPSPQASP	ARASPQASPA	RTPPPQASPA	RASPPQASPA	RASPARASPV
70	80	90	100	110	120
RASPARAPPS	RSSSGRSSSA	RSASTTSSPT	RVYLVRAIPV	GTVIRASPAR	SAPATRATRE
130	140	150	160	170	180
SPGLSFPKFS	WQETQRQLPL	IGCVLLLISL	VISLILLFYF	WRGHTGIKYK	EPLESCPKHA
190	200	210	220	230	240
VRCDGVVDCK	MKSDELGCVR	FDWDKSLKLV	YSGSSGEWLP	VCSSSWNDTD	SERTCQQLGF
250	260	270	280	290	300
DSAYRTTEVA	HRDVTSSFLI	SEYNSTIQES	LTRSECPSRR	YVSLQCAHCG	LRAMTGRIVG
310	320	330	340	350	360
GALTSESKWP	WQVSLHFGTT	HICGGTLIDA	QWVLTAACHF	FVTREKILEG	WKVYAGTSNL
370	380	390	400	410	420
HQLPEAASIS	QIIINGNYTD	EQDDYDIALV	RLSKPLTLA	HIHPACLPLH	GQTFGLNETC
430	440	450	460	470	480
WITGFGKTKE	TDEKTSFPFLR	EVQVNLIDFK	KCNDYLVYDS	YLTPRMMCAG	DLRGGRDSCQ
490	500	510	520	530	
GDSGGPLVCE	QNNRWYLAGV	TSWGTGCGQK	NKPGVYTKVT	EVLPWYIRKM	ESEVFRKRS

Number of amino acids: 539

Molecular weight: 59261.1

Theoretical pI: 9.16

Amino acid composition:

Ala (A) 43 8.0% Arg (R) 41 7.6% Asn (N) 12 2.2% Asp (D) 22 4.1% Cys (C) 19 3.5% Gln (Q) 21 3.9% Glu (E) 24 4.5% Gly (G) 37 6.9% His (H) 12 2.2% Ile (I) 21 3.9% Leu (L) 44 8.2% Lys (K) 22 4.1% Met (M) 6 1.1% Phe (F) 15 2.8% Pro (P) 39 7.2% Ser (S) 64 11.9% Thr (T) 37 6.9% Trp (W) 13 2.4% Tyr (Y) 16 3.0% Val (V) 31 5.8% Pyl (O) 0 0.0% Sec (U) 0 0.0% (B) 0 0.0% (Z) 0 0.0% (X) 0 0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 46

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 63

Atomic composition:

Carbon	C	2603
Hydrogen	H	4090
Nitrogen	N	754
Oxygen	O	782
Sulfur	S	25

Formula: C₂₆₀₃H₄₀₉₀N₇₅₄O₇₈₂S₂₅

Total number of atoms: 8254

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of M⁻¹ cm⁻¹, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 96465

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.628, assuming ALL Cys residues appear as half cystines

Ext. coefficient 95340

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.609, assuming NO Cys residues appear as half cystines

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).

>20 hours (yeast, in vivo).

>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 57.47

This classifies the protein as unstable.

Aliphatic index: 71.69

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.374

Transcription factor E3

Gene:

Tcfe3 (Rattus norvegicus)
transcription factor E3

Synonyms: similar to Tcfe3 protein; RGD1559642; RGD1559642_predicted;
transcription factor E3 (predicted); Tcfe3_predicted; similar to Tcfe3
protein (predicted); LOC317376;

ArrayIDs: 5814282; 6733566; 1388967_at; 6433756; 1378919_at; rc_AI012945_at;
6193232; 6319388; 1389985_at; 6168203; 6400839; 6055661; 6595241;
A_43_P20681; 6192246; 6115108; 5808233; A_44_P166749; 6211708; 5886241;
6429979; A_43_P10707; 5654095; GE1183917; GE1152931; 6325045; 5881114;
Gene Type: protein-coding

Annotation

Molecular Function

Gene Ontology

DNA binding, transcription factor activity, protein binding ...

Biological Process

Gene Ontology

positive regulation of transcription, DNA-dependent, biological_process,
regulation of osteoclast differentiation

Cellular Component

Gene Ontology

cellular_component

Disease

Ontology

Carcinoma, Renal Cell

ProtParam:

10	20	30	40	50	60
MSSSSSRVLL	RQQLMRAQAQ	EQERRERREQ	AAAAPFPSPA	PASPAISVIG	VSAGGHTLSR
70	80	90	100	110	120
PPPAQVPREV	LKVQTHLENP	TRYHLQQARR	QQVKQYLSTT	LGPKLASQAL	TPPPGPSSAQ
130	140	150	160	170	180
PLPAPETAHA	TGPTGSAPNS	PMALLTIGSS	SEKEIDVID	EIISLESSYN	DEMLSYPGG
190	200	210	220	230	240
TAGLQLPSTL	PVSGNLLDVY	SSQGVATPAI	TVSNSCP AEL	PNIKREISET	EAKALLKERQ
250	260	270	280	290	300
KKDNHNLIER	RRRFNINDRI	KELGTLIPKS	NDPEMRWNKG	TILKASVDYI	RKLQKEQQRS
310	320	330	340	350	360
KDLESRQRSL	EQANRSLQLR	IQELELQAQI	HGLPVPPNPG	LLSLATSSVS	DSLKPEQLDI
370	380	390	400	410	420
EEEGRPSTTT	FHVSGGPTQN	APPQOPPAPP	SDTL LDLHFP	SDHLGDLGDP	FHLGLEDILM
430	440	450	460		
EEEGMVGGLS	GGALSPLRAA	SDPLLSSVSP	AVSKSSRRS	SFSMEDES	

Number of amino acids: 468

Molecular weight: 50641.9

Theoretical pI: 5.89

Amino acid composition:

Ala (A) 36 7.7% Arg (R) 30 6.4% Asn (N) 15 3.2% Asp (D) 20 4.3% Cys (C) 1
0.2% Gln (Q) 31 6.6% Glu (E) 35 7.5% Gly (G) 28 6.0% His (H) 10 2.1% Ile (I)
20 4.3% Leu (L) 55 11.8% Lys (K) 18 3.8% Met (M) 8 1.7% Phe (F) 6 1.3% Pro
(P) 47 10.0% Ser (S) 59 12.6% Thr (T) 23 4.9% Trp (W) 1 0.2% Tyr (Y) 6 1.3%
Val (V) 19 4.1% Pyl (O) 0 0.0% Sec (U) 0 0.0% (B) 0 0.0% (Z) 0 0.0% (X) 0
0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 55

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 48

Atomic composition:

Carbon	C	2193
Hydrogen	H	3571
Nitrogen	N	643
Oxygen	O	713
Sulfur	S	9

Formula: C₂₁₉₃H₃₅₇₁N₆₄₃O₇₁₃S₉

Total number of atoms: 7129

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of M⁻¹ cm⁻¹, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 14440
Abs 0.1% (=1 g/l) 0.285, assuming ALL Cys residues appear as half cystines

Ext. coefficient 14440
Abs 0.1% (=1 g/l) 0.285, assuming NO Cys residues appear as half cystines

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
>20 hours (yeast, in vivo).
>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 81.36
This classifies the protein as unstable.

Aliphatic index: 81.97

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.579

Coatomer subunit beta:

Names and origin

Protein names Recommended name:

Coatomer subunit beta'

Alternative name(s):

Beta'-coat protein

Short name=Beta'-COP

p102

Gene names

Name: Copb2

Organism Rattus norvegicus (Rat)

Taxonomic identifier 10116 [NCBI]

Taxonomic lineage Eukaryota > Metazoa > Chordata > Craniata > Vertebrata > Euteleostomi > Mammalia > Eutheria > Euarchontoglires > Glires > Rodentia > Sciurognathi > Muroidea > Muridae > Murinae > Rattus

Protein attributes

Sequence length 905 AA.

Sequence status Complete.

Sequence processing The displayed sequence is further processed into a mature form.

Proteinexistence Evidence at transcript level.

General annotation (Comments)

Function

The coatomer is a cytosolic protein complex that binds to dilysine motifs and reversibly associates with Golgi non-clathrin-coated vesicles, which further mediate biosynthetic protein transport from the ER, via the Golgi up to the trans Golgi network. Coatomer complex is required for budding from Golgi membranes, and is essential for the retrograde Golgi-to-ER transport of dilysine-tagged proteins. In mammals, the coatomer can only be recruited by membranes associated to ADP-ribosylation factors (ARFs), which are small GTP-binding proteins; the complex also influences the Golgi structural integrity, as well as the processing, activity, and endocytic recycling of LDL receptors By similarity.

This coatomer complex protein, essential for Golgi budding and vesicular trafficking, is a selective binding protein (RACK) for protein kinase C, epsilon type. It binds to Golgi membranes in a GTP-dependent manner.

Subunit structure

Oligomeric complex that consists of at least the alpha, beta, beta', gamma, delta, epsilon and zeta subunits. Probably interacts with PEX11A By similarity.

Subcellular location

CytoplasmBy similarity. Golgi apparatus membrane; Peripheral membrane protein; Cytoplasmic sideBy similarity. Cytoplasmic vesicle > COPI-coated vesicle membrane; Peripheral membrane protein; Cytoplasmic sideBy similarity. Note= The coatomer is cytoplasmic or polymerized on the cytoplasmic side of the Golgi, as well as on the vesicles/buds originating from it By similarity. Sequence similarities

ProtParam:

10	20	30	40	50	60
MPLRLDIKRR	LTAMSDRVKS	VDLHPTEPWM	LASLYNGSVC	VWNHETQTLV	KTFEVCDDLQV
70	80	90	100	110	120
RAAKFVARKN	WVVTGADDMQ	IRVFNYNLLE	RVHMFEAHSD	YIRCIAVHPT	QPFILTSSDD
130	140	150	160	170	180
MLIKLWDWDK	KWSCSQVFEG	HTHYVMQIVI	NPKDNNQFAS	ASLDRTIKVW	QLGSSSPNFT
190	200	210	220	230	240
LEGHEKGVNC	IDYYSGGDKP	YLISGADDRL	VKIWDYQNKI	CVQTPEGHAQ	NVSCATFHPE
250	260	270	280	290	300
LPIIITGSED	GTVRIWHSST	YRLESTLNYG	MERVWCVASL	RGSNNVALGY	DEGSIIIVKLG
310	320	330	340	350	360
REEPAMSMDA	NGKIIWAKHS	EVQQANLKM	GDTEIKDGER	LPLAVKDMGS	CEIYPQTIQH
370	380	390	400	410	420
NPNGRFVVVC	GDGEYIIYTA	MALRNKSFSG	AQEFAWAHDS	SEYAIRESNS	VVKIFKNFKE
430	440	450	460	470	480
KKSFKPDFGA	ESIIYGGFLG	VRSVNGLAFY	DWENTELIRR	IEIQPKHIFW	SDSGELVCIA
490	500	510	520	530	540
TEESFFILKY	LSEKVLAAQE	THEGVTEGDI	EDAFEVLGEI	QEIVKTGLWV	GDCFIYTSSV
550	560	570	580	590	600
NRLNYYVGGG	IVTIAHLDR	MYLLGYIPKD	NRLYLGDKEL	NIVSYSLLV	VLEYQTAVMR
610	620	630	640	650	660
RDFSMADKVL	PTIPKEQRTR	VAHFLEKQGF	KQQALTVSTD	PEHRFELALQ	LGELKIAIYQL
670	680	690	700	710	720
AVEAESEQKW	KQLAELAIK	CQFSLAQECL	HHAQDYGGLL	LLATASGNAS	MVNKLAEGAE
730	740	750	760	770	780
RDGKNNVAFM	SYFLQGKLLA	CLELLIRTGR	LPEAAFLART	YLPSQVSRV	KLWRENLSKV
790	800	810	820	830	840
NQKAAESLAD	PTEYENLFP	LKEAFVVEEW	VKETHADLWP	AKQYPLVTPN	EERNVMEEAK
850	860	870	880	890	900
RFQPSRATAQ	QEPDGKPASS	PVIMASQTH	KEEKSFOELE	DDLDTMELED	IDTTDINLDE

DILDD

Number of amino acids: 905

Molecular weight: 102551.2

Theoretical pI: 5.15

Amino acid composition:

Ala (A) 67 7.4% Arg (R) 39 4.3% Asn (N) 38 4.2% Asp (D) 54 6.0% Cys (C) 15
1.7% Gln (Q) 39 4.3% Glu (E) 77 8.5% Gly (G) 51 5.6% His (H) 23 2.5% Ile (I)
50 5.5% Leu (L) 84 9.3% Lys (K) 55 6.1% Met (M) 21 2.3% Phe (F) 35 3.9% Pro
(P) 33 3.6% Ser (S) 62 6.9% Thr (T) 47 5.2% Trp (W) 19 2.1% Tyr (Y) 32 3.5%
Val (V) 64 7.1% Pyl (O) 0 0.0% Sec (U) 0 0.0% (B) 0 0.0% (Z) 0 0.0% (X) 0
0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 131

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 94

Atomic composition:

Carbon	C	4578
Hydrogen	H	7105
Nitrogen	N	1219
Oxygen	O	1386
Sulfur	S	36

Formula: C4578H7105N1219O1386S36

Total number of atoms: 14324

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of M⁻¹ cm⁻¹, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 153055

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.492, assuming ALL Cys residues appear as half cystines

Ext. coefficient 152180

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.484, assuming NO Cys residues appear as half cystines

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).

>20 hours (yeast, in vivo).

>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 35.47

This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 85.66

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.328

Zinc finger protein 297B

Names and origin

Protein names Recommended name:
 Zinc finger and BTB domain-containing protein 43
Alternative name(s):
 Zinc finger protein 297B

Gene names

Name: Zbtb43
Synonyms: Kiaa0414, Zfp297b, Znf297b
Organism Mus musculus (Mouse)
Taxonomic identifier 10090 [NCBI]
Taxonomic lineage Eukaryota > Metazoa > Chordata > Craniata > Vertebrata >
Euteleostomi > Mammalia > Eutheria > Euarchontoglires > Glires > Rodentia >
Sciurognathi > Muroidea > Muridae > Murinae > Mus

Protein attributes

Sequence length 467 AA.
Sequence status Complete.
Sequence processing The displayed sequence is not processed.
Protein existence Evidence at transcript level.

General annotation (Comments)

Function

May be involved in transcriptional regulation.
Subunit structure

Interacts with BDP1 By similarity.
Subcellular location

NucleusProbable.

Sequence similarities

Belongs to the krueppel C2H2-type zinc-finger protein family.

Contains 1 BTB (POZ) domain.

Contains 3 C2H2-type zinc fingers.

Ontologies

Keywords

 Biological process Transcription
Transcription regulation
 Cellular component Nucleus
 Domain Repeat
Zinc-finger
 Ligand DNA-binding
Metal-binding
Zinc

ProtParam:

```
      10      20      30      40      50      60
MEPGTNSFQV EFPDFSSTIL QKLNQQRQQG QLCDVSIVVQ GHIFQAHKAV LAASSPYFCD

      70      80      90     100     110     120
QVLLKNSRRI VLPDVMNPRV FENILLFSYT GRLVMPAPEI VSYLTAASFL QMWHVVDKCT

     130     140     150     160     170     180
EVLEGNPTVL CQKLNHGSDH QSPSSSNYNG LVESFELGSG GHTDFPKAQE LRDGENEEES

     190     200     210     220     230     240
TKDELSSQVT EHEYLPSSNS TEHDRLSTEM ASQDGEEGTN DSTEFHYTRP LYSKPSIMAH

     250     260     270     280     290     300
RRWIHVKPER LEQAWDGM DV HAAYDEHQVT ESVNTMQTDH SAQPSGAE EEE FQIVEKKVEV

     310     320     330     340     350     360
EFDEQAEGSS YDEQVDFYGS SMEEFSGEKL GGNLIGHKQE AALAAGYSEN IEMAMGIKEE

     370     380     390     400     410     420
ASHLGFSATD KLYPCQCGKS FTHKSQRDRH MSMHLGLRPY GCSVCGKKFK MKHHLVGHMK

     430     440     450     460
IHTGIKPYEC NICAKRFMWR DSFHRHVTSC TKS YEAAKAE QNTTEAN
```

Number of amino acids: 467

Molecular weight: 52651.5

Theoretical pI: 5.42

Amino acid composition:

Ala (A) 28 6.0% Arg (R) 17 3.6% Asn (N) 18 3.9% Asp (D) 22 4.7% Cys (C) 11 2.4% Gln (Q) 27 5.8% Glu (E) 46 9.9% Gly (G) 30 6.4% His (H) 25 5.4% Ile (I) 15 3.2% Leu (L) 31 6.6% Lys (K) 26 5.6% Met (M) 16 3.4% Phe (F) 20 4.3% Pro (P) 18 3.9% Ser (S) 46 9.9% Thr (T) 24 5.1% Trp (W) 4 0.9% Tyr (Y) 15 3.2% Val (V) 28 6.0% Pyl (O) 0 0.0% Sec (U) 0 0.0% (B) 0 0.0% (Z) 0 0.0% (X) 0 0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 68

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 43

Atomic composition:

Carbon	C	2289
Hydrogen	H	3515
Nitrogen	N	643
Oxygen	O	734
Sulfur	S	27

Formula: C2289H3515N643O734S27

Total number of atoms: 7208

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of M⁻¹ cm⁻¹, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 44975
Abs 0.1% (=1 g/l) 0.854, assuming ALL Cys residues appear as half cystines

Ext. coefficient 44350
Abs 0.1% (=1 g/l) 0.842, assuming NO Cys residues appear as half cystines

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
 >20 hours (yeast, in vivo).
 >10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 52.64
This classifies the protein as unstable.

Aliphatic index: 61.80

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.650

Nuclear receptor DAX-1

Names and origin

Protein names Recommended name:
 Nuclear receptor subfamily 0 group B member 1

Alternative name(s):
 Nuclear receptor DAX-1

Gene names

Name: Nr0b1

Synonyms: Ahch, Dax1

Organism Rattus norvegicus (Rat)

Taxonomic identifier 10116 [NCBI]

Taxonomic lineage Eukaryota > Metazoa > Chordata > Craniata > Vertebrata >
Euteleostomi > Mammalia > Eutheria > Euarchontoglires > Glires > Rodentia >
Sciurognathi > Muroidea > Muridae > Murinae > Rattus

Protein attributes

Sequence length 472 AA.

Sequence status Complete.

Sequence processing The displayed sequence is not processed.

Protein existence Evidence at transcript level.

General annotation (Comments)

Function

Orphan nuclear receptor. Component of a cascade required for the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal-gonadal axis. Acts as a coregulatory protein that inhibits the transcriptional activity of other nuclear receptors through heterodimeric interactions. May also have a role in the development of the embryo and in the maintenance of embryonic stem cell pluripotency By similarity.

Subunit structure

Homodimer. Interacts with NR5A1/SF-1, NR5A2, NR0B2 and with COPS2 By similarity.
Subcellular location

NucleusBy similarity. CytoplasmBy similarity. Note= Shuttles between the cytoplasm and nucleus. Homodimers exits in the cytoplasm and in the nucleus By similarity.
Domain

Homodimerization involved an interaction between amino and carboxy termini involving LXXLL motifs and steroid binding domain (AF-2 motif).
Heterodimerizes with NR5A1/SF-1 and NROB2 through its N-terminal LXXLL motifs By similarity.
Sequence similarities

Belongs to the nuclear hormone receptor family. NR0 subfamily.

Ontologies

Keywords

Biological process Transcription

Transcription regulation

Cellular component Cytoplasm

Nucleus

Domain Repeat

Molecular function Receptor

Repressor

Gene Ontology (GO)

Biological process adrenal gland development

Inferred from sequence or structural similarity. Source: HGNC
negative regulation of transcription factor activity

Inferred from mutant phenotype. Source: RGD
negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter

Inferred from mutant phenotype. Source: RGD
regulation of steroid biosynthetic process

Traceable author statement. Source: RGD
response to organic substance

Inferred from expression pattern. Source: RGD
response to peptide hormone stimulus

Inferred from expression pattern. Source: RGD
spermatogenesis

Inferred from expression pattern. Source: RGD
Cellular component nucleus

Inferred from sequence or structural similarity. Source: HGNC
polysomal ribosome

Inferred from sequence or structural similarity. Source: HGNC
Molecular function DNA hairpin binding

Inferred from sequence or structural similarity. Source: HGNC
RNA binding

Inferred from sequence or structural similarity. Source: HGNC
basal transcription repressor activity

Inferred from sequence or structural similarity. Source: HGNC

double-stranded DNA binding

Inferred from mutant phenotype. Source: RGD
ligand-regulated transcription factor activity

Inferred from sequence or structural similarity. Source: HGNC
sequence-specific DNA binding

Inferred from sequence or structural similarity. Source: HGNC
steroid hormone receptor activity

Inferred from electronic annotation. Source: InterPro
transcription factor activity

ProtParam

10	20	30	40	50	60
MAGEDHPWHG	SILYNLLMSA	KQKHGSREER	EVRLGAQCWG	CACGTQPVLG	GEGLPGGQAL
70	80	90	100	110	120
SLLYR	CCFCG	ENHPR	QGGIL	YSMLTNARQP	SGATEAPRAR
FRTPCWGCAC	SNAKPLVGRX				
130	140	150	160	170	180
GLPAGQVPSL	LYRCCFCGK	HPRQGSILYS	LLTNAQQTHV	SREVPEAHRG	GEWWQLSYCT
190	200	210	220	230	240
HNVGGPEGLQ	STQAMAFLYR	SYVCCEEQPQ	QSSVASDTPV	RADQTPAAPQ	EQPRAPWWDT
250	260	270	280	290	300
SSGVQRPIAL	KDPQVCEAA	SAGLLKTLRF	VKYLPCFQIL	PLDQQLVLVR	SCWAPLLMLE
310	320	330	340	350	360
LAQDHLHFEM	MEISEPNLMH	EMLTTRRQET	EGPEPADPQA	TEQPQTVSAE	AGHVLSVAAV
370	380	390	400	410	420
QAIKSFFFKC	WSLNIDTKEY	AYLKGTVLFN	PDLPLGLQCVK	YIESLQWRTQ	QILTEHIRLM
430	440	450	460	470	
QREYQIRSAE	LNSALFLLRF	INTDVVTELF	FRPIIGAVSM	DDMMLEMLCA	KL

Number of amino acids: 472

Molecular weight: 52755.8

Theoretical pI: 6.50

Amino acid composition:

Ala (A) 39 8.3% Arg (R) 28 5.9% Asn (N) 11 2.3% Asp (D) 13 2.8% Cys (C) 21 4.4% Gln (Q) 36 7.6% Glu (E) 32 6.8% Gly (G) 33 7.0% His (H) 13 2.8% Ile (I) 15 3.2% Leu (L) 54 11.4% Lys (K) 14 3.0% Met (M) 14 3.0% Phe (F) 15 3.2% Pro (P) 32 6.8% Ser (S) 30 6.4% Thr (T) 23 4.9% Trp (W) 10 2.1% Tyr (Y) 13 2.8% Val (V) 25 5.3% Pyl (O) 0 0.0% Sec (U) 0 0.0% (B) 0 0.0% (Z) 0 0.0% (X) 1 0.2%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 45

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 42

Atom composition:

As there is at least one ambiguous position (B,Z or X) in the sequence considered, the atomic composition cannot be computed.

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 75620

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.433, assuming ALL Cys residues appear as half cystines

Ext. coefficient 74370

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.410, assuming NO Cys residues appear as half cystines

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).

>20 hours (yeast, in vivo).

>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 48.70

This classifies the protein as unstable.

Aliphatic index: 80.64

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.224