

Aus dem Institut für Experimentelle Endokrinologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchungen zur Expression und Verteilung von  
Selenoprotein P**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marcus Scharpf

aus Stuttgart

Gutachter/in:      1. Prof. Dr. J. Köhrle  
                          2. Prof. Dr. R. Brigelius-Flohé  
                          3. Prof. Dr. K. Becker

Datum der Promotion:      24.02.2012

Meiner Familie  
&  
Meinen Freunden

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b><i>Einleitung</i></b> .....	<b>4</b>
<b>1.1</b>	<b>Selen – Eine Einführung</b> .....	<b>4</b>
1.1.1	Die Biologie des Selens .....	4
1.1.2	Selen in der Medizin .....	7
1.1.3	Selen und Krebs .....	8
1.1.4	Selen und Gehirn .....	9
1.1.5	Selenoprotein P .....	12
1.1.6	Ziele dieser Arbeit.....	14
<b>2</b>	<b><i>Material, Methoden &amp; Software</i></b> .....	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Geräte</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Chemikalien, Lösungen und Puffer</b> .....	<b>17</b>
<b>2.3</b>	<b>In-Situ-Hybridisierung</b> .....	<b>18</b>
2.3.1	RNA-Isolation.....	19
2.3.2	cDNA-Synthese .....	19
2.3.3	PCR .....	20
2.3.4	Klonierungen.....	21
2.3.5	Kompetente Bakterien und Transfektion .....	21
2.3.6	Maus-Gewebe für ISH.....	24
2.3.7	In-Vitro Transkription und radioaktive Sonden-Markierung .....	25
<b>2.4</b>	<b>Human Multiple Tissue Expression Array (MTE)</b> .....	<b>29</b>
<b>2.5</b>	<b>Immunhistochemie humanes Gehirn</b> .....	<b>30</b>
2.5.1	Patienten .....	30
2.5.2	Gewebeaufarbeitung .....	31
2.5.3	Antikörper .....	32
2.5.4	Immunhistochemie .....	32
2.5.5	Datenbank .....	34
<b>3</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b> .....	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>In-Situ-Hybridisierung</b> .....	<b>38</b>
3.1.1	Selenoprotein P .....	38
3.1.2	pGPX.....	49
<b>3.2</b>	<b>Multiple Tissue Expression (MTE) Array</b> .....	<b>59</b>
3.2.1	SePP-Expression Gehirn.....	62

3.2.2	SePP-Expression gastrointestinal .....	63
3.2.3	SePP-Expression urogenital .....	63
3.2.4	SePP-Expression tracheobronchial.....	64
3.2.5	SePP Expression Herz .....	64
3.2.6	SePP Expression immunologische/hämatologische Organe/Zell-Linien.....	64
3.2.7	SePP-Expression fetale Organe.....	65
3.2.8	SePP-Expression sonstige Organe.....	67
<b>3.3</b>	<b>Immunhistochemie.....</b>	<b>68</b>
3.3.1	Kontrollen .....	68
3.3.2	Immunhistochemie humanes Gehirn (adult).....	71
3.3.3	Immunhistochemie humanes Gehirn (Frühgeborenes).....	78
3.3.4	Vergleich der Färbeergebnisse mit der Neurotransmitterverteilung .....	84
3.3.5	Pathologische Veränderungen .....	85
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>91</b>
<b>4.1</b>	<b>SePP-Expression.....</b>	<b>91</b>
4.1.1	Methodik ISH & MTE.....	91
4.1.2	SePP-Expression in der Leber .....	92
4.1.3	SePP-Expression in der Niere .....	93
4.1.4	SePP-Expression im Gastrointestinaltrakt .....	94
4.1.5	SePP-Expression in fetalen Organen.....	94
4.1.6	SePP-Expression tracheobronchial.....	98
<b>4.2</b>	<b>Expression pGPX .....</b>	<b>99</b>
<b>4.3</b>	<b>SePP-Expression im humanen Gehirn .....</b>	<b>99</b>
4.3.1	Methodik Immunhistochemie.....	99
4.3.2	SePP in Neuronen .....	100
4.3.3	SePP in Oligodendrozyten & der Myelinscheide .....	101
4.3.4	SePP bei multipler Sklerose .....	103
4.3.5	SePP in Astrozyten .....	104
4.3.6	SePP bei Morbus Alzheimer .....	104
4.3.7	SePP bei Morbus Parkinson .....	105
4.3.8	SePP bei amyotropher Lateralsklerose.....	106
4.3.9	SePP in der Hirnentwicklung .....	107
4.3.10	SePP und Neurotransmitter .....	109
4.3.11	Mögliche Funktionen von SePP im Gehirn .....	110
<b>5</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>113</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>116</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>123</b>

<b>8</b>	<b><i>Danksagungen</i></b> .....	<b>124</b>
<b>9</b>	<b><i>Lebenslauf</i></b> .....	<b>125</b>
<b>10</b>	<b><i>Erklärung</i></b> .....	<b>127</b>
<b>11</b>	<b><i>Anhang</i></b> .....	<b>128</b>
<b>11.1</b>	<b>MTE-Daten</b> .....	<b>128</b>
<b>11.2</b>	<b>Auszug Datenbank Hirnregionen Immunhistochemie</b> .....	<b>131</b>

### 1 Einleitung

#### 1.1 Selen – Eine Einführung

Jöns Jakob Berzelius (1779-1849) beschrieb erstmals im Jahre 1817 bei der Untersuchung eines rotbraunen Sedimentes, welches im Bleikammerbecken einer Schwefelsäurefabrik in Gripsholm anfiel, ein silbern glänzendes Halbmetall und benannte es in Anlehnung an das kurz zuvor entdeckte Tellur (lat. tellus - die Erde) nach der griechischen Mondgöttin Selene<sup>1</sup>. Zu Beginn galt Selen über ein Jahrhundert als ein starkes Gift. Erst Schwartz und Foltz<sup>2</sup> erkannten, dass es sich bei Selen um ein essentielles Spurenelement handelt. Diese Entdeckung wurde Anfang der siebziger Jahre bestätigt, als Flohé et al.<sup>3</sup> und Rotruck et al.<sup>4,5</sup> nachweisen konnten, dass Selen ein kovalent gebundener Kofaktor der Glutathionperoxidase (GPX) ist. Damit war das erste Selenoprotein (SeP) entdeckt und ansatzweise charakterisiert. In den darauffolgenden Jahren gelang es Forstrom et al.<sup>6</sup> nachzuweisen, dass Selen in Form von Selenocystein im aktiven Zentrum der GPX zu finden ist. Bei Untersuchungen der mRNA-Sequenz der Maus-GPX fanden Chambers et al.<sup>7</sup> heraus, dass die Basensequenz der mRNA an der zum Selenocystein korrespondierenden Stelle ein UGA aufweist. Das Codon UGA galt bis dato als eines der drei klassischen Stopp-Codons, so dass die Entdeckung des UGA als codierendes Codon in der mRNA anfangs für Verwirrung sorgte. Bei weiterführenden Untersuchungen bestätigte sich dieser Fund und es kristallisierte sich heraus, dass sich hinter der Selenoprotein-Synthese ein komplexer Mechanismus verbirgt, dessen Komponenten in Eukaryonten erst in jüngster Zeit (vermutlich) vollständig geklärt werden konnten<sup>8</sup> und im Folgenden weiter beschrieben werden.

##### 1.1.1 Die Biologie des Selens

Die Hauptaufnahme des Selens bei Säugetieren erfolgt über pflanzliche und tierische Nahrungsmittel<sup>9</sup>. Die Aufnahme über das Trinkwasser spielt nur in Arealen mit sehr Selen-haltigen Böden eine Rolle. Selenhaltige tierische Nahrungsmittel sind im Besonderen Innereien, Fisch, Meeresfrüchte und Milchprodukte. Bei den pflanzlichen Nahrungsmitteln spielen v.a. Getreide und Körner eine wichtige Rolle, gefolgt von Früchten und Gemüse. Allerdings schwankt auch der Selengehalt von pflanzlichen Nahrungsmitteln in Abhängigkeit des Selengehalts der Böden und der Phytoverfügbarkeit der jeweils im Boden vorkommenden Selenverbindungen beträchtlich.

Selen wird in den Körper in Form unterschiedlicher Verbindungen aufgenommen. Die beiden wichtigsten organischen Verbindungen sind dabei Selenocystein und Selenomethionin (Abbildung 1). Selenomethionin<sup>10</sup> und Selenocystein werden im Darm nahezu vollständig resorbiert. Die

## Einleitung

Resorption von Selen in Form von Selenat und Selenit<sup>11</sup> erfolgt zu etwa 50-100% und ist vom Selenstatus unabhängig, wird jedoch von anderen Inhaltsstoffen des Chymus beeinflusst.

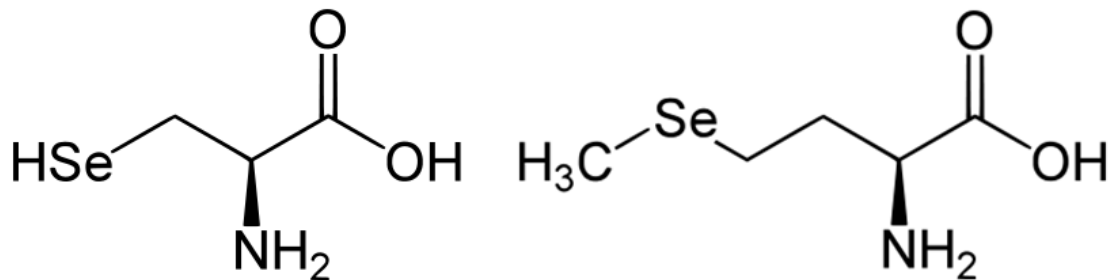


Abbildung 1 Selenocystein (links) und Selenomethionin (rechts) (Bild-Quelle: Wikimedia <sup>12,13</sup>)

Der Selenolrest im Selenocystein ist bei physiologischem pH größtenteils deprotoniert und daher deutlich nukleophiler und damit reaktiver als der Thiolrest im Cystein<sup>14</sup>. Im Selenomethionin ist das Selen kovalent mit zwei Kohlenstoffatomen verbunden und damit deutlich weniger reaktiv als im Selenocystein. Selenomethionin hat im Vergleich zum Selenocystein keine bekannten biochemischen Funktionen. Das hochreaktive Selenocystein hingegen findet sich häufig im reaktiven Zentrum von Enzymen, wo es als redox-aktive Gruppierung an der Katalyse beteiligt ist.

Selenomethionin wird vom Körper primär nicht als Selen-haltige Aminosäure erkannt und wird, in Analogie zur Schwefel-haltigen Aminosäure Methionin, über reguläre AUG-Codons vermittelt bei der Proteinsynthese integriert. Erst beim Abbau des Selenomethionins - vor allem in der Leber und der Niere - wird bei der sog. Transsulfurierung die Selenolgruppe frei und steht zum Aufbau von Selenocystein zur Verfügung. Auch die freie Aminosäure Selenocystein wird nicht direkt an die entsprechende tRNA gebunden. Die Synthese des Selenocysteins erfolgt erst an der entsprechenden tRNA<sup>sec</sup> aus einem anhängenden Serin-Rest unter Verwendung von Selenophosphat durch die Selenocystein-Synthase<sup>15</sup> (Abbildung 2).



## Einleitung

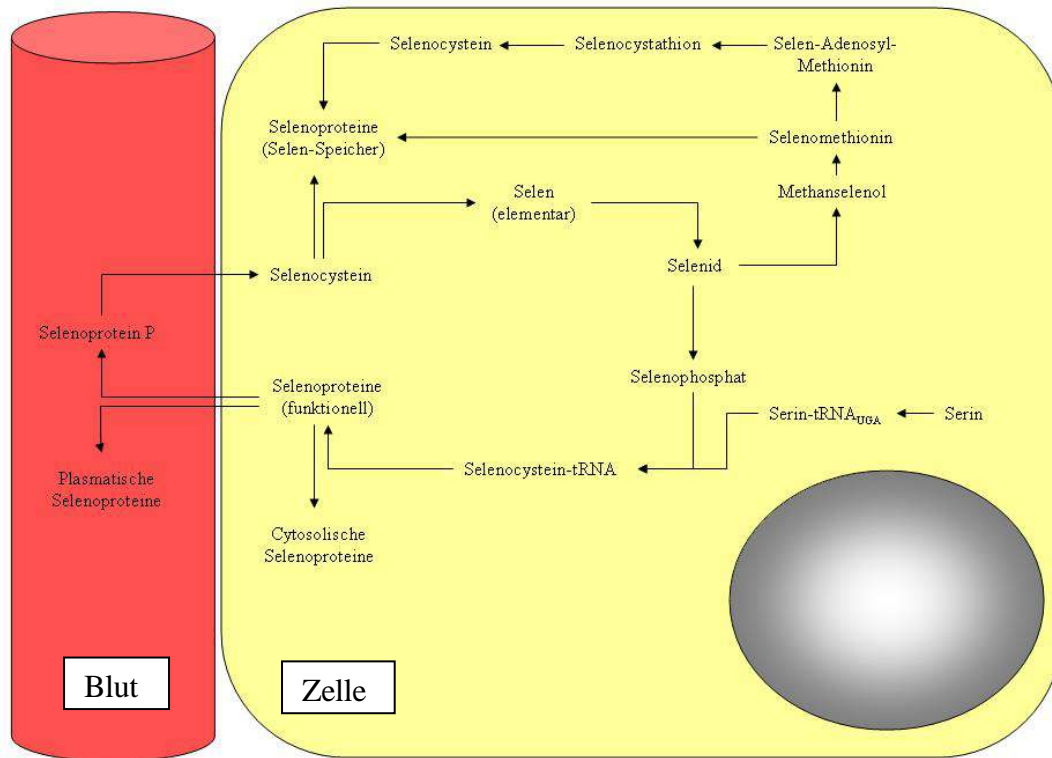


Abbildung 2: Vereinfachte Biochemie des Selens und mögliche physiologische Rolle von SePP (modifiziert nach <sup>16,17</sup>)

### *Translation von Selenoproteinen*

Abbildung 3 zeigt eine typische eukaryontische Selenoprotein-mRNA. Im 3'-untranslatierten Bereich findet sich eine Stem-Loop-Struktur, welche auch als "Selenocysteine Insertion Sequence" oder SECIS-Element bezeichnet wird. Das SECIS-Binding Protein 2 (SBP2) bindet an das SECIS-Element, welches den Selenocystein-spezifischen Elongationsfaktor (EFSec) rekrutiert. Dieser Komplex interagiert mit dem Ribosom, was verhindert, dass das Codon UGA zur Termination der Translation führt, und stattdessen Selenocystein in die Proteinkette eingebaut wird. Bei der Ausbildung des EFSec-SBP2-Komplexes und der Interaktion mit dem Ribosom spielen außerdem zahlreiche weitere Proteine eine wichtige Rolle<sup>18</sup>.

## Einleitung

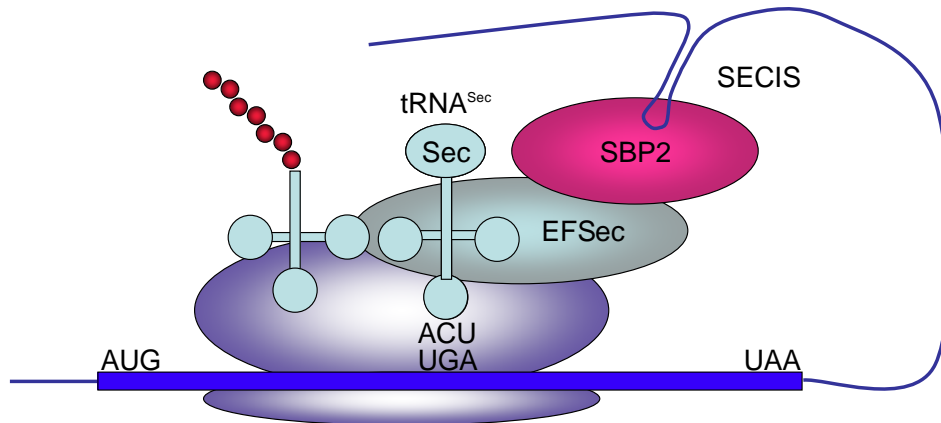


Abbildung 3: Selenoprotein-Synthese (vereinfacht nach <sup>19</sup>)

Das SECIS-Motiv im 3'-untranslatierten Bereich der mRNA bindet SBP2, welches EFSec und tRNA<sup>Sec</sup> rekrutiert. Dieser Komplex interagiert mit dem Ribosom, verhindert die Termination und bewirkt die Insertion von Selenocystein in das wachsende Protein.

Abkürzungen:

AUG = Startcodon, EFSec = Selenocystein-spezifischer Elongationsfaktor, SBP2 = SECIS-Binding Protein 2,

Sec = Selenocystein, SECIS= Selenocystein Insertion Sequence, tRNA<sup>Sec</sup> = Selenocystein-tRNA,

UAA = Stoppcodon, ACU = Anticodon zu UGA

Farben: violett = Ribosom, blauer Balken = codierender Bereich der mRNA, rot = Protein

### 1.1.2 Selen in der Medizin

Selenmangelerkrankungen des Menschen sind selten. Endemisch findet man in bestimmten geographischen Regionen mit Selen-armen Böden Erkrankungen, welche mit einem Selenmangel assoziiert sind. Nicht endemisch traten Selenmangelerkrankungen bei Patienten mit parenteraler Ernährung auf, da erst seit den 90'er Jahren des vorherigen Jahrhunderts Selen in Infusionslösungen zugesetzt wird<sup>20</sup>. Ferner wurden Selenmangel-Erkrankungen bei Patienten mit massivem Alkoholabusus, besonderen Diäten (z.B. Phenylketonurie-Diät) und Hämodialyse diagnostiziert<sup>21</sup>.

In bestimmten Regionen Chinas beträgt die tägliche Selen-Aufnahme unter 15µg und liegt damit deutlich unter der von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V. empfohlenen Tagesdosis von 30-70 µg. In diesen Gebieten wurde endemisch und mit einer jahreszeitlichen Periodik die sog. Keshan-Krankheit beobachtet<sup>22</sup>. Dabei handelt es sich um eine Kardiomyopathie, welche histopathologisch durch diffuse Myokardnekrosen und Myokardfibrosen gekennzeichnet ist<sup>23</sup>. Die Ursache der Keshan-Erkrankung ist vermutlich eine myokardiale Infektion durch das primär nicht kardiotoxische, jedoch unter Selen-Mangel mutierte und dadurch kardioinfektiöse humane Cocksackie-Virus B3<sup>24</sup>. Unter Selen-Supplementation konnte die Inzidenz der Keshan-Erkrankung deutlich reduziert werden<sup>25</sup>.

## Einleitung

Eine weitere endemische Erkrankung in Selenmangel-Gebieten ist die Kashin-Beck-Erkrankung<sup>26</sup>. Dabei handelt es sich um eine häufig bereits im Kindesalter auftretende, chronische Osteoarthropathie mit Nekrose und Degeneration des Gelenkknorpels sowie der Epiphysenfugen der Arme und Beine. Ursächlich diskutiert wird bei dieser Erkrankung v.a. ein Jodmangel, welcher wohl in Kombination mit einem Selen-Mangel die Pathologie des Knorpels induziert<sup>26</sup>.

### 1.1.3 Selen und Krebs

In den späten 60'ern des letzten Jahrhunderts stellten Shamberger und Frost<sup>27</sup> Theorien zur Korrelation von Selenstatus, abgeschätzt anhand des Selengehaltes der Agrarflächen und deren Produkten, mit der Krebsinzidenz auf. Schrauzer et. al.<sup>28</sup> fanden in einer großen Studie eine negative Korrelation zwischen dem Selengehalt der Nahrung und dem Auftreten von Karzinomen der Prostata, des Colons, des Rektums und anderer Gewebe. Eine schwache negative Korrelation wurde überdies zwischen der Inzidenz von Karzinomen der Harnblase, des Pankreas und der Haut gefunden. Kein Zusammenhang wurde bei Karzinomen des Ösophagus, des Magens und der Leber gefunden. Clark et al.<sup>29</sup> untersuchten daraufhin in einer großen doppelblinden prospektiven Studie an 1312 Patienten mit Zustand nach Basaliomen bzw. Plattenepithelkarzinomen der Haut (Spinaliomen), ob Patienten mit einer täglichen Einnahme von 200µg Selen eine geringere Inzidenz von erneuten Spinaliomen bzw. Basaliomen aufweisen würden. Dies konnte nicht beobachtet werden. Es wurde jedoch eine Reduktion der Inzidenz von Lungenkarzinomen (46%), kolorektalen Karzinomen (58%) und Prostatakarzinomen (63%) im Vergleich zur Placebogruppe gefunden.

Die Ergebnisse dieser Studie wurden heftig diskutiert und angezweifelt. In der SELECT-Studie<sup>30</sup> wurden zwischen 2001 und 2004 insgesamt 35 000 Männer rekrutiert und doppelgeblindet jeweils gegen Placebo mit Selen und/oder Vitamin E supplementiert. Primäres Ziel der Studie war die Untersuchung des Effekts der Selensupplementation auf die Inzidenz von Prostata-Karzinomen. Die Studie wurde 2008 vorzeitig abgebrochen, d.h. die Selen- bzw. Vitamin E-Supplementation wurde eingestellt nachdem kein Effekt auf die Inzidenz des Prostata-Karzinoms oder anderer Karzinome durch Selen bzw. Vitamin E festgestellt wurde. Im Selen-Arm der Studie fand sich eine gering erhöhte Inzidenz von Diabetes mellitus Typ 2 und im Vitamin-E-Arm fanden sich eine gering erhöhte Prostatakarzinomrate, ohne dass diese erhöhten Inzidenzen statistisch signifikant auf die Supplementation mit Selen bzw. Vitamin-E zurückzuführen waren. Weiterhin interessant bleibt der Effekt der „relativ kurzen“ Selensupplementation auf die Langzeit-Inzidenz von Karzinomen und anderen Erkrankungen in der Nachbeobachtungsphase.

Zusammenfassend finden sich deutliche Hinweise auf eine negative Korrelation zwischen der

## Einleitung

Höhe der täglichen Selenaufnahme und der Inzidenz von bestimmten Karzinomen, wenngleich ein experimenteller prospektiver Beweis derzeit noch aussteht.

### 1.1.4 Selen und Gehirn

Viele Selenoproteine bzw. deren mRNA konnten bis dato im Gehirn funktionell, mittels ISH oder immunhistochemisch nachgewiesen werden<sup>31</sup>. Weil Selenoproteine häufig im Radikalstoffwechsel eine zentrale Rolle einnehmen und im Rahmen der zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen eine ursächliche, aber zumindest doch Progressions-fördernde Rolle der Radikale angenommen wird, besteht seit längerem die Hypothese, dass man bei entsprechenden Patienten Veränderungen in der Aktivität der Selenoenzyme oder dem Selengehalt im Serum oder Liquor nachweisen könnte.

#### *Selen und Neuronen*

Frühe experimentelle Beobachtungen an Neuronenzellkulturen zeigten, dass es nicht gelingt, Neuronen in Serum-freien Zellkultur-Medien zu halten. Erst mit dem Nerve-Growth-Factor (NGF) wurde eine der essentiellen Komponenten des Serums entdeckt und charakterisiert, welcher für die Neuronen-Kultur essentiell ist. Bei der Suche nach weiteren neurotrophen Serum-Faktoren fanden Kaufmann und Barrett<sup>32</sup> ein weiteres essentielles Serumprotein mit einer Größe von etwa 55 kDa. Dieses Protein wurde im Nachhinein durch Yan und Barrett<sup>33</sup> als Selenoprotein P identifiziert. SePP versorgt die Neuronen in Kultur mit dem offenbar essentiellen Selen. Die heute benutzten serumfreien Neuronen-Zellkulturmedien enthalten daher in der Regel ca. 50 nM Selenit, aus dem die Neuronen selbst Selenoproteine und auch SePP aufbauen.

#### *Einfluss des Selens auf die Myelinbildung bzw. Oligodendrozytenfunktion*

Unterschiedliche Studien konnten in Zellkulturexperimenten zeigen, dass Selen einen essentiellen Faktor bei der Kultur von Oligodendrozyten darstellt<sup>34-36</sup>. Diese Studien beschreiben insbesondere eine wichtige Funktion des Selens bei der Induktion der Myelin-assoziierten Oligodendrozytengene und zeigen damit, dass Selen die Myelinbildung in vitro beeinflusst. Gu et al.<sup>34</sup> beschrieben beispielsweise, dass junge Oligodendrozyten während der initialen Phase der rapiden Hochregulation der Myelin-assoziierten Gene eine sensitive Phase besitzen, in der Selen bzw. Selenoproteine zur Induktion der Myelinbildung notwendig sind. Liegt zu dieser Zeit nicht ausreichend Selen vor, so werden die Myelin-assoziierten Gene dauerhaft supprimiert und damit die Differenzierung des jungen Oligodendrozyten zum reifen Oligodendrozyten unterdrückt. Eine weitere Studie<sup>36</sup> konnte zeigen, dass Selen das Überleben v.a. junger Oligodendrozyten fördert. Diese Studien haben somit gesichert, dass Selen für die Kultur und Differenzierung von

## Einleitung

Oligodendrozyten einen essentiellen Faktor darstellt. Serum-freie Kulturmedien für Oligodendrozyten enthalten daher typischerweise 30 nM Selenit.

### *Selen und neurologische Erkrankungen*

Ein Selen-Mangel wird von mehreren Autoren<sup>37,38</sup> als mögliche Mitursache von Neuralrohrdefekten, mentaler Retardierung und demyelinisierenden Erkrankungen (z.B. multipler Sklerose) diskutiert. Selen bzw. Selenmangel scheint hierbei jedoch nur als Kofaktor zusammen mit anderen Faktoren zu agieren.

Weber et al.<sup>39</sup> und Raemakers et al.<sup>40</sup> konnten bei mehreren Kindern mit behandlungsresistenten Epilepsien einen Selenmangel nachweisen. Unter Selensupplementation nahmen die primär behandlungsresistenten Epilepsien deutlich ab, rezidierten jedoch nach dem Absetzen der Selensupplementation.

### Morbus Parkinson

Oxidativer Stress spielt bei der Pathogenese des sporadischen Morbus Parkinson eine wichtige Rolle<sup>41</sup>. Dabei scheint unter anderem der erhöhte Gehalt an Eisen in der Substantia nigra und die daraus resultierende Entstehung von Hydroxyl-Radikalen nach der sog. Fenton-Reaktion möglicherweise am Untergang der dopaminergen Neuronen beteiligt zu sein<sup>42</sup>.



In mehreren Parkinson-Maus-Modellen konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß des Zellverlustes der Substantia nigra durch Selen-Mangel vergrößert bzw. durch Selen-Supplementation verringert werden kann<sup>43,44</sup>. Dies scheint v.a. durch die Aktivität der GPX1 bedingt zu sein<sup>45</sup>, welche Wasserstoffperoxid unter Verbrauch von Glutathion abbaut.

Studien mit dem Ziel, bei Patienten mit Morbus Parkinson einen (latenten) Selenmangel im Plasma oder dem Liquor cerebrospinalis nachzuweisen, schlugen jedoch fehl.

In mehreren Untersuchungen am Liquor cerebrospinalis von Parkinson-Patienten fand sich jedoch ein erhöhter Selengehalt, was als Hinweis auf einen erhöhten oxidativen Stress im Krankheitsverlauf interpretiert wurde<sup>46,47</sup>.

### Morbus Alzheimer

Morbus Alzheimer ist eine weit verbreitete neurodegenerative Erkrankung, bei der es zum Untergang von Neuronen v.a. im Bereich des Cortex und Hippocampus kommt. Typisch ist der

## Einleitung

histologische Nachweis von sog. Amyloid-Plaques, aufgebaut aus falsch gefalteten Fragmenten des APP (Amyloid Precursor Protein) und anderen Proteinen. Auch in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung wird die schädliche Wirkung von Radikalen diskutiert<sup>48</sup>. Hierzu passend wurde bei Alzheimer-Patienten post mortem eine vermehrte Expression des Selen-haltigen Enzyms Thioredoxin-Reduktase (TrxR) gefunden<sup>49</sup>, welches bei der Reduktion des oxidierten Thioredoxins eine wichtige Rolle spielt und damit am Radikalstoffwechsel beteiligt ist<sup>50</sup>. Untersuchungen von Liquor cerebrospinalis und von Serum von Alzheimer Patienten konnten jedoch keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem Selengehalt und der Alzheimer-Erkrankung zeigen<sup>51,52</sup>. Diskutiert wird jedoch, ob die antioxidativen Proteine/Enzyme den Krankheitsverlauf modifizieren können.

### Amyotrophe Lateralsklerose

Bei der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) handelt es sich um eine neurodegenerative Erkrankung der Motoneurone des Rückenmarks und des ZNS. Die meisten ALS-Erkrankungen treten sporadisch auf. Bei etwa 20% der familiären Form der ALS konnte eine Mutation im Gen der Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase (SOD1) nachgewiesen werden. Dieses Enzym katalysiert die abbauende Reaktion und damit Detoxifikation des hochreaktiven Superoxid-Anion-Radikals zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. Die Mutation im Gen eines radikalabbauenden Enzyms bei der familiären Form der ALS legt die Vermutung nahe, dass auch die sporadische Form der ALS eine Radikal-induzierte Pathogenese hat. Neuere Studien deuten aber eher darauf hin, dass eine sog. Gain-of-Function-Mutation der SOD1 für die Pathogenese der familiären ALS entscheidend ist<sup>53,54</sup>.

In den Jahren 1977 und 1978 zog Selen die Aufmerksamkeit der ALS-Forscher auf sich, als in South Dakota eine ungewöhnliche Häufung von 4 Fällen der sporadischen ALS bei Farmern in einem Areal mit stark Selen-haltigen Böden auftrat<sup>55</sup>. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Selen und ALS ließ sich letztlich jedoch nicht nachweisen.

### Multiple Sklerose

Bei der multiplen Sklerose (MS) handelt es sich um eine entzündliche Autoimmunerkrankung des ZNS, bei der es zu diffus verteilten Entmarkungsherden in der grauen Substanz kommt. Die Entstehung ist multifaktoriell und umfasst neben genetischen Faktoren auch möglicherweise infektiöse Ursachen. Sauerstoffradikale (ROS) scheinen im Krankheitsverlauf v.a. im Rahmen der primären Entzündung bei Freisetzung durch Leukozyten im Rahmen des sog. „respiratory burst“ eine Rolle zu spielen. In zahlreichen Studien wurde versucht den Krankheitsverlauf durch

## Einleitung

Antioxidantien zu beeinflussen<sup>56</sup>. V.a. im Tiermodell der MS, der sog. experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), konnten Antioxidantien den Krankheitsverlauf beeinflussen<sup>57</sup>. Studien am Menschen zur Abhängigkeit von Selensupplementation und MS liegen nicht vor.

### 1.1.5 Selenoprotein P

Selenoprotein P (SePP) ist ein häufiges Selenoprotein im Blutplasma von Mäusen und Menschen<sup>58</sup>. Etwa 50% des Selen-Serum-Gehaltes liegt im Selenoprotein P gebunden vor<sup>59</sup>. Es nimmt unter den Selenoproteinen eine Sonderrolle ein, da es im Gegensatz zu vielen anderen Selenoproteinen bei Mensch und Maus zehn Selenocystein-Reste enthält<sup>58</sup> (vgl. Abbildung 4). Die meisten anderen Selenoproteine enthalten einen Selenocystein-Rest, welcher meist im aktiven Zentrum von Enzymen (z.B. GPX<sup>4,6</sup>) direkt an der Katalyse beteiligt ist.



Abbildung 4: Schematische, linearisierte Darstellung von Selenoprotein P (türkis=Signalpeptid, blau=Protein, gelb = Selenocysteinreste)

Selenoprotein P wird in nahezu allen Geweben exprimiert<sup>60,61</sup>. Hauptproduktionsort des Plasma-SePPs ist die Leber. Die Anzahl der Selenocystein-Reste im Selenoprotein P ließ bereits früh vermuten, dass SePP im Körper eine Transport- und Verteilungsfunktion wahrnimmt<sup>62</sup>.

Dies konnte in Knock-Out (KO)-Maus-Modellen bestätigt werden. Die Knock-Out-Mäuse zeigen dabei eine deutliche Störung in der Verteilung von Selen ins Gehirn, die Hoden und in andere Organe<sup>63, 64</sup>.

Neben der systemischen Funktion als Selen-Speicher bzw. -Transporter scheint das SePP weitere lokale und gewebsspezifische Funktionen auszuüben. So zeigte ein Maus-Modell mit einem Leber-spezifischen Knock-Out der Selenoproteine keine typischen neurologischen Ausfälle, wie sie im generellen SePP-Knock-Out-Modell beobachtet wurden. Daraus lässt sich schließen, dass das im Gehirn gebildete SePP eine lokale spezifische Funktion besitzt<sup>65</sup>.

In der Literatur wird ferner beschrieben, dass SePP mit Schwermetall-Ionen<sup>66</sup> (z.B. Quecksilber) Komplexe ausbilden kann, wodurch die durch Schwermetall-Ionen bedingte Toxizität vermindert werden kann. Ferner konnte gezeigt werden, dass SePP die Peroxinitrit-bedingte Oxidation und Nitrierung *in vitro* verhindern kann<sup>67</sup>. SePP kann *in vitro* Phospholipid-Hydroperoxide reduzieren, so dass eine direkte antioxidative Funktion auch *in vivo* wahrscheinlich ist<sup>68</sup>.

## Einleitung

Eine direkte Verbindung zwischen SePP und spezifischen Erkrankungen konnte noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Vermutet wird ein Einfluss von SePP auf die Genese von Prostatakarzinomen<sup>69</sup> und von kolorektalen Karzinomen<sup>70</sup>.

In einer Pankreaskarzinom-Zell-Linie konnte ferner durch Genexpressionsstudien gezeigt werden, dass SePP im Rahmen der Gemcitabin-Resistenzentwicklung deutlich hochreguliert wird<sup>71</sup>, so dass ein Zusammenhang zwischen der SePP-Expression und der Resistenz gegen Chemotherapie-induzierte Schäden zu diskutieren ist. Zur molekularen Abklärung dieses Zusammenhangs sind jedoch weitere Studien notwendig.

### *SePP-Knock-Out Maus*

Die Rolle des Selen und im Speziellen des SePP konnte in den letzten Jahren mit Hilfe von KO-Mäusen weiter aufgeklärt werden.

Die Generierung einer SePP-KO-Maus gelang im Jahre 2003/2004 der Forschungsgruppe Schomburg/Schweizer sowie der Forschungsgruppe Burk/Hill unabhängig voneinander<sup>63,72</sup>. Die SePP-KO-Maus zeigt in beiden Arbeitsgruppen einen identischen Phänotyp, welcher unter anderem durch einen auffallenden neurologischen Phänotyp gekennzeichnet ist. Die Mäuse zeigen u.a. ataktische Bewegungsstörungen sowie epileptische Anfälle. Dieser neurologische Phänotyp junger KO-Mäuse ist mit Selen-Substitution der säugenden Mutter komplett reversibel<sup>73</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass bei der KO-Maus das substituierte Selen präferentiell ins Gehirn transportiert wird, was die Sonderrolle des Selen im Bezug auf das Gehirn betont.

Renko et al.<sup>74</sup> konnten an Mäusen zeigen, dass Leber-spezifische KO-Konstrukte den Plasma- und Nieren-Selengehalt ähnlich wie bei der SePP-KO-Maus deutlich reduzieren, ohne dass jedoch neurologische Symptome auftraten. Ferner wurde eine SePP-KO-Maus mit einem Leber-spezifischen SePP-Knock-In-Konstrukt versehen. Bei diesem Maus-Modell fand sich eine gegenüber der reinen KO-Maus erhöhte Aktivität der Selen-abhängigen Serum-Enzyme und die Maus blieb fertil. Mit Selen-Mangel-Ernährung traten bei der Maus jedoch die SePP-KO-typischen neurologischen Symptome auf. Damit konnte gezeigt werden, dass das hepatische SePP wichtig für die Verteilung des Selen im Körper in Gehirn, Niere und Hoden ist, dass jedoch offensichtlich im Gehirn eine lokale Expression von SePP zur Aufrechterhaltung des lokalen zerebralen Selengehalts notwendig ist.

Hill et. al.<sup>72</sup> untersuchten im Folgenden die SePP-KO-Mäuse darauf, ob es bezüglich des neurologischen Phänotyps sensible Phasen in der Maus-Entwicklung gibt. Sie konnten zeigen, dass KO-Mäuse mit Selen-Substitution ab der Zeugung/Geburt keinen neurologischen Phänotyp



## Einleitung

aufweisen, solange Selen weiter substituiert wird. Wurde die Selen-Substitution jedoch, egal zu welchem Zeitpunkt, nach der Entwöhnung von der Mutter eingestellt, entwickelte sich progressiv der KO-typische neurologische Phänotyp. Wurde die Selen-Substitution erst nach Entwöhnung von der Mutter begonnen, entwickelten sich bis dahin die typischen neurologischen KO-Symptome, blieben jedoch nach Substitution konstant und stabil ohne Nachweis einer Verbesserung der neurologischen Symptome.

Damit konnte gezeigt werden, dass Selen sowohl in der Phase der Hirnentwicklung als auch im adulten Gehirn eine wichtige Rolle spielt.

Nakajama et al.<sup>75</sup> konnten ferner zeigen, dass sowohl ein SePP-KO, wie auch ein Selenmangel, eine Verringerung des Selengehalts im Cortex, dem Mittelhirn, dem Hirnstamm und dem Kleinhirn mit sich bringen. Im Hippocampus hingegen wurde bei Selenmangel keine eindeutige Erniedrigung des Selengehalts gefunden, jedoch beim KO eine deutliche Reduktion, so dass dem Hippocampus bezüglich der SePP-Funktion eine Sonderrolle zuzukommen scheint.

Die erwähnten Studien deuten darauf hin, dass Selen und SePP im Gehirn eine wichtige Funktion haben. Ob Selen bei der Genese von neurologischen Erkrankungen beim Menschen eine kausale Rolle spielt oder gar einen therapeutischen Ansatzpunkt bietet, bedarf sicherlich noch vieler weiterführender Studien.

### 1.1.6 Ziele dieser Arbeit

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit ist die Beschreibung der Verteilung des SePP-Transkripts und des SePP-Proteins in unterschiedlichen Geweben bei Mensch und Maus. Insbesondere die Fragestellung, ob es sich bei SePP um ein ubiquitär unspezifisch exprimiertes Protein oder um ein sehr zell- bzw. organspezifisch exprimiertes Protein handelt, ist v.a. im Bezug auf die noch nicht abschließend und vollständig geklärte Funktion von SePP von großem Interesse.

Ferner stellt sich die Frage, ob die Zellen, die bezüglich SePP auf Transkript- oder Protein-Ebene positiv sind, negativ für andere Selenoproteine sind, und sich daraus ein Donor-Akzeptor-Verhältnis zwischen den Zellen ableiten lässt. Zur Beantwortung dieser Frage haben wir am Mausgewebe parallel zur SePP-In situ Hybridisierung (ISH) auch ISH-Färbungen mit Hilfe einer pGPX-Sonde durchgeführt.

Aus früheren Studien mit radioaktivem Selen ist bekannt, dass das Gehirn im Selenstoffwechsel eine Sonderrolle einnimmt und bei Selenmangel präferentiell mit Selen versorgt wird<sup>76</sup>. Unsere Hypothese war daher, dass SePP, das im Körper bei der Selenverteilung eine zentrale Rolle

## Einleitung

einzunehmen scheint, auch im Gehirn für die Verteilung von Selen von zentraler Bedeutung sein könnte. In Zusammenschau mit der antioxidativen Funktion von SePP<sup>77,78</sup> stellt sich auch die Frage, ob die Verteilung und Expression von SePP bei neurodegenerativen Erkrankungen, deren Genese durch Radikale schon lange diskutiert wird, verändert ist und daher eine pathogenetische bzw. Pathogenese-beeinflussende Rolle spielen könnte.

Zur Bearbeitung dieser Fragestellungen haben wir SePP auf Transkript-Ebene in ausgesuchten Maus-Geweben mit Hilfe der In-Situ-Hybridisierung sowie einem käuflichen humanen Expressions-Arrays untersucht. Außerdem wurden immunhistochemische Untersuchungen am humanen Gehirn-Gewebe von zerebral gesunden und erkrankten Patienten aus der Brain-Net-Hirngewebebank durchgeführt und ausgewertet.

## 2 Material, Methoden & Software

### 2.1 Geräte

Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Film-Entwickler	Curix-60, Agfa, Leverkusen
Gamma-Counter	Riastar, Canberra Packard Instruments, USA
Gefriermikrotom	Microm, Walldorf
Gelkammer Agarosegel	Minigelkammer, Roth, Karlsruhe
Heizblock	Techne DB3, Gesellschaft für Laborbedarf, Würzburg
Laborwaage	LC420, Sartorius, Göttingen
Mikroskop/Slide Scanner	Zeiss Axioskop bzw. Axio mit Neofluar-Objektiven Mirax-Desk mit Mirax Viewer (V1.12), Zeiss
Phosphoimager	Zyklone, Perkin Elmer, Darmstadt
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	pH 523, WTW, Weilheim
Photometer	UV Visible Spectrophotometer, Pharmacia, Freiburg
Sequencer	Abi Prism 5700, Perkin Elmer, Darmstadt
Thermocycler	MHH, Landgraf, Langenhagen
Vakuum-Trockner	SpeedVac SVC100, Savant Instruments, Farmingdale
Vortexer	Vortex Genie 2, Bender&Hobein, Zürich
Zentrifuge	Biofuge 18 RS, Heraeus, Hanau EBA12, Hettich, Tuttlingen

#### **Software:**

Textverarbeitung	Microsoft Word 2003
Datenbank	Microsoft Access 2003 Microsoft Excel 2003
Zeichnungen	Microsoft Powerpoint 2003 Inkscape (V0.46)
Bildverarbeitung/-aufnahme	Image Access (V6.3.9) Picasa (V3.6.0) Gimp (V2.6)

#### **Bücher/Anatomische Quellen:**

Neuroanatomie:	InterBrain <sup>79</sup>
----------------	--------------------------

## Material & Methoden

Benninghoff, Anatomie<sup>80</sup>

Nolte, The Human Brain<sup>81</sup>

The Mouse Brain Library<sup>82</sup>

Brain Maps.Org<sup>83</sup>

### 2.2 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen:

Amersham (Freiburg), Bio-Rad (München), Boehringer (Mannheim), Gibco BRL bzw. Life Technologies (Paisley, Schottland), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

Lösungen wurden, je nach benötigter Reinheit, mit deionisiertem Wasser, doppelt destilliertem, deionisiertem Wasser oder mit sterilem, RNase-freiem Aqua ad injectabilia (Pharmacia) angesetzt.

Ampicillin	100µg/ml in LB-Medium bzw. Agarplatten
Citratpuffer:	10,5 g Zitronensäure Monohydrat ( MG 210,14, Fa. Merck), 5 g Natriumhydroxid (Fa. AppliChem) ad 2,5 l, pH mit NaOH auf 6,0 eingestellt, bei 4°C aufbewahrt
Denhardt´s (5x):	0,1% BSA, 0,1% Ficoll, 0,1% PolyVinylPyrrolidon (PVP)
Hybridisierungsmix:	Hybridisierungspuffer mit 2% DTT (1 M) und Sonde
Hybridisierungspuffer:	600 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0,05%(w/v) tRNA, 25% (w/v) Denhardt´s 5x, 10 % (w/v) Dextransulfat, 50% (v/v) Formamid 100 µg/ml Sonicated Salmon Sperm DNA, 20 mM DTT
LB-Agar-Platten:	LB-Medium + 1,5 % Agar, autoklaviert
LB-Medium:	1L: 10 g NaCl, 10 g Pepton/Trypton, 5g Hefe-Extrakt, Wasser ad 1L, autoklaviert
Lyse-Puffer:	1l: 8 g NaOH, 50 ml SDS 20%
Neutralisationspuffer:	1l: 294,5 g NaAzetat, pH 5,5 mit Eisessig eingestellt
PBS:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na-Phosphat, 1,47 mM K-Phosphat, pH ad 7,4
Resuspensionspuffer:	1l: 6,06g Tris, 4,72 g Na <sub>2</sub> EDTA *H <sub>2</sub> O, 100 ng RNase, pH 8
Rnase-Puffer:	10 mM Tris HCl (pH 8), 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA,

## Material & Methoden

	20 µg/ml RNase A, 1 U/ml RNase T1
SOB-Medium:	2% Bacto Trypnone, 0,5 % Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 ml KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , pH 6,8-7,0
SOC-Medium:	SOB-Medium + 20 mM Glucose
SSC-Puffer:	1x: 3 M NaCl, 0,3 M Na-Zitrat
Stop-Puffer (5x):	Farbpuffer für Agarosegele: 0,25% Bromphenolblau (w/v), 0,25% Xylencyanol (w/v), 30% Glycerin (w/v), 1 mM EDTA
TAE-Puffer:	800 ml:14,8 g TAE, pH 8 mit 10 N NaOH
TB-Puffer :	10 mM Pipes, 55 mM MnCl <sub>2</sub> , 15 mM CaCl <sub>2</sub> , 250 mM KCl, pH mit KOH auf 6,7 eingestellt, steril-filtriert mit 0,45 µm Filter (Millipore)
TBE-Puffer(10x):	107,8 g/l Tris Base, 55 g/l Borsäure, 7,44 g/l Na <sub>2</sub> EDTA*2 H <sub>2</sub> O, pH ad 8,3 mit HCl
TBS-Puffer:	0,05 M Tris, 0,145 M NaCl, pH mit HCl auf 7,6 eingestellt
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA

### 2.3 In-Situ-Hybridisierung

Die In-Situ-Hybridisierung dient dem Nachweis eines mRNA-Transkripts im histologischen Schnittpräparat. Insbesondere die radioaktive ISH bietet hierbei eine besonders hohe Sensitivität und erlaubt, neben der Zuordnung des ISH-Signals zu einer bestimmten Zelle, auch eine semiquantitative Aussage über den Gehalt einer bestimmten mRNA in einer Zelle.

Zur Herstellung einer radioaktiven ISH-Sonde benötigt man ein Vektor-Konstrukt, das bei der *In vitro*-Transkription als Template für unterschiedliche RNA-Polymerasen dient. Die radioaktive Markierung der Sonde wird durch den Einsatz von <sup>35</sup>S-markierten Nukleotiden bei der *In vitro*-Transkription erreicht.

Bei dem hier verwendeten pGem-T-Vektor handelt es sich um ein käufliches Vektorsystem. In diesen Vektor wird mit Hilfe der sog. TA-Klonierungstechnik (siehe 2.3.4) die interessierende DNA-Sequenz kloniert. Dieses DNA-Fragment wird mit Hilfe einer PCR-Reaktion aus einem cDNA-Gemisch gewonnen.

Das Ziel der ISH in unseren Experimenten ist der semiquantitative Nachweis von SePP-mRNA in unterschiedlichen Maus-Geweben und deren Zuordnung zu spezifischen Zellen und damit möglicherweise spezifischen Zellfunktionen.

### 2.3.1 RNA-Isolation

Zur Isolation von muriner mRNA lag Mausgewebe (Leber) des Black-6-Labormausstamms vor. Zur Isolation der RNA wurde das peqGold TriFast (PEQLAB, Bestellnr. 30-2010) System verwendet. Dieses arbeitet nach dem Prinzip der Guanidinisothiocyanat-Phenol-Methode. Das bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerte Gewebe wurde unter Stickstoff-Kühlung pulverisiert. Ca. 200 mg Organpulver wurden zur RNA-Isolation eingesetzt und mit 2 ml peqGold TriFast-Lösung auf Eis versetzt und mittels Glass-Teflon Homogenisator lysiert. Durch Aufziehen durch eine 22G-Spritzenkanüle (Braun) wurde die DNA geschert, das Lysat weiter suspendiert und dann 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro Milliliter zugesetztem peqGoldTriFast und anschließendem Vortexen wurde das Lysat bei 14.000 RPM zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde mit der Pipette abgenommen. Zur weiteren Aufreinigung wurde anschließend eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde der Überstand 1:1 mit TE-gepufferten Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Anschließend wurde bei 14.000 RPM zentrifugiert und der wässrige Überstand abgenommen. Durch Zugabe von  $\frac{1}{2}$  ml Isopropanol pro Milliliter Lösung und anschließender Lagerung für 15 min bei Raumtemperatur und Zentrifugation bei 14.000 RPM, erfolgte die Präzipitation der RNA. Anschließend wurde die RNA zweimal mit 70%-iger Ethanol-Lösung gewaschen, bei 14.000 RPM 5 min abzentrifugiert und der Überstand mit der Pipette abgenommen. Das gelartige RNA-Pellet wurde dann kurz bei Raumtemperatur getrocknet und in RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mit einem Photometer. Die RNA-Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.3.2 cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA aus der isolierten RNA von 2.3.1 erfolgte mit Hilfe der SUPERScript II RNase H-Reverse Transkriptase (GibcoBRL, Cat. No.18064-014, 200 U/ $\mu\text{l}$ ). Dazu wurde 1  $\mu\text{l}$  Oligo-dT<sub>12-18</sub> (Gibco) mit 5-20  $\mu\text{g}$  RNA in wässriger Lösung auf 10  $\mu\text{l}$  mit Wasser aufgefüllt und gevortext. Anschließend erfolgte im Thermocycler die Inkubation bei  $42^{\circ}\text{C}$  für 3 min und anschließender Inkubation auf Eis für 3 min.

Danach erfolgte die Zugabe des RT-Mixes (4  $\mu\text{l}$  5xRT-Puffer (Gibco), 2  $\mu\text{l}$  DTT (0,1 M), 1  $\mu\text{l}$  dNTPs ( $\hat{a}$  0,1 M), 1  $\mu\text{l}$  Sup.ScriptII (200 U), 2  $\mu\text{l}$  Wasser,  $\frac{1}{2}$   $\mu\text{l}$  RNAsin (40 u/ $\mu\text{l}$ , Promega)) mit anschließender Inkubation auf Eis für 3 Minuten und anschließender Inkubation im Thermocycler bei  $37^{\circ}\text{C}$  für weitere 3 min und dann für 90 min bei  $45^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3.3 PCR

Das Primerdesign für die SePP- und pGPX-Sonde erfolgte anhand der bekannten Maus-Sequenzen (NCBI). Die Synthese erfolgte durch die Firma MWG-Biotech AG. Die gelieferten Primer wurden auf eine Konzentration von 100 pmol/μl (0.1 mM) mit Wasser eingestellt. Die PCR wurde als sog. Hot-Start-PCR durchgeführt, d.h. die DNA-Polymerase wurde zum PCR-Mix erst bei einer Temperatur von 70°C zugegeben.

---

#### PCR-Mix

DNA	ca. 50-200 ng
Forward-Primer	2 μl
Reverse-Primer	2 μl
10xPCR-Puffer	3 μl
dNTP (10 mM)	1 μl
Wasser	ad 30 μl

#### Hot Start Mix:

Taq Polymerase	1 μl
10xPCR-Puffer	1 μl
Wasser	8 μl

---

Die Annealing-Temperatur wurde so gewählt, dass sie ca. 5 °C unter der theoretischen Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) des Primers ( $T_m = 2x(A+T) + 4x(C+G)$  in °C) mit der niedrigeren T<sub>m</sub> lag. Die Dauer des Elongationsschritts t errechnete sich nach der Formel Basenpaare des Amplifikats/(1000 bp/min) in Minuten.

Primer:

---

Name	Sequenz
Forward m_pGPX	CC ATG GCC CGG ATC CTC CGG GCA TC
Reverse m_pGPX	GAT GTT CAG GTT TGA GCA GAA CCA TTG
Forward mSePP	GCC ATG GGA TAC TTG TGT CTT CTG
Reverse mSePP	GTC TCG AGG CTC TCT AAG TGA CCC TGC CTG

---

PCR-Programm:

	Temp. (°C)	Zeit t (s)	Zyklen
Primäre Denatur.	95	60	
Denaturierung	95	15	← 35x
Annealing	$T_m - 5^\circ$	15	
Elongation	72	calc.	
Finale Elongation	72	300	

Zur Kontrolle der Amplifikate wurden 2 µl des PCR-Ansatzes mit Ladepuffer versehen und in einem 1,5 %igen Agarose Gel mit Ethidiumbromid (500 µg/ml) mit ca. 100 Volt in 1xTBE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Aufreinigung der PCR-Amplifikate erfolgte durch Gelextraktion und Ethanol-Fällung.

#### 2.3.4 Klonierungen

Die Klonierungen erfolgten primär über die TA-Klonierungstechnik. Dabei macht man sich zu Nutzen, dass die Taq-Polymerase unspezifisch an amplifizierte PCR-Produkte ein Adenosin-Nukleotid anlagert, so dass ein linearisierter Vektor mit überhängendem Thymin-Nukleotid in der Lage ist, das PCR-Stück anzulagern, und mit Hilfe einer Ligase entsteht ein zirkuläres Plasmid. In unseren Versuchen wurde das TA-Kloning-Set von Promega mit dem pGEM-T-Easy Vektor (Promega, B.-Nr. A1360) verwendet. Die Ligation erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (Promega). Dazu wurden 1µl pGEM-T Vektor (50 ng), 5 µl 2xLigase-Puffer, 50 pg PCR-Produkt, ½ µl T4-Ligase (3 Weiss units/µl) und Wasser ad 10 µl zusammengegeben. Die Ligation wurde über Nacht bei 4°C inkubiert.

#### 2.3.5 Kompetente Bakterien und Transfektion

In unseren Versuchen verwendeten wir den E. coli-Stamm JM-109.

Zur Herstellung von kompetenten E. coli wurde von einer Glycerin-Stamm-Kultur (Lagerung bei -80°C) mit Hilfe einer Impföse Material durch leichtes Streichen über die gefrorene Oberfläche entnommen und auf einer LB-Agar-Platte verdünnend ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden mehrere Kolonien geerntet und in einem 1L-Erlenmeyer-Kolben (Schott) mit 100 ml frischen LB-Medium bei 37°C bis zu einer optischen Dichte bei 600



## Material & Methoden

nm von 0,6 vermehrt. Der Kolben wurde dann für 10 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend in 50 ml Falcons überführt und 10 min in einer Beckmann-Zentrifuge bei 4000 RPM und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet wurde in 32 ml 4°C-kaltem TB-Puffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde erneut bei 4000 RPM, 4°C zentrifugiert. Die Bakterien wurden in 8 ml 4°C-kaltem TB-Puffer resuspendiert, anschließend mit DMSO (Dimethylsulfoxid) langsam bis zur finalen Konzentration von 7% versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Bakterien-Suspension in 1,5 ml Eppendorfgläsern aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Bakterien wurden bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

### Transfektion

Es wurden 100 µl der kompetenten Bakterien-Suspensionen zu 3 µl Ligationsansatz in einem vorgekühlten 1,5 ml-Eppendorfglas hinzugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 90 sek im Heizblock bei 42°C inkubiert, für 1 min auf Eis abgekühlt und mit 700 µl eiskaltem SOC-Medium versetzt. Für 30-90 min erfolgte anschließend die Inkubation im Brutschrank bei 37°C.

Anschließend wurde die Bakterien-Suspension bei 4000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde größtenteils abgenommen, die Bakterien dann im restlichen Medium resuspendiert und anschließend auf einer LB-Agar-Platte mit Ampicillin ausgestrichen. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

### Plasmid DNA Mini-Präparation (Mini Prep)

Am folgenden Tag wurden ca. 10 Bakterien-Kolonien mit der Impföse gepickt und in je 3 ml frisches Medium mit Ampicillin-Zusatz angeimpft. Über Nacht erfolgte die Inkubation bei 37°C auf dem Schüttler. Am nächsten Tag wurden 2 ml der Kulturen bei 4000 RPM im 2 ml Gefäß abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl eiskaltem Resuspensionspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lyse-Puffer wurde das Gefäß 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Neutralisationspuffer wurde das Gemisch für 1 h auf Eis inkubiert, danach bei 14.000 RPM für 15 min zentrifugiert und anschließend der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Zur weiteren DNA-Aufreinigung erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion (s.o.). Zum schnelleren Trocknen kamen die Proben in den Exsikkator (SpeedVac) bis zum völligen Verdampfen des 70% Alkohols.

## Material & Methoden

Das DNA Pellet aus der Phenol-Chloroform-Extraktion wurde in 30  $\mu$ l Wasser aufgenommen. 3  $\mu$ l dieser DNA-Lösung wurden direkt zur Bewertung der DNA-Menge und –Qualität mittels eines 1,5%-igem Agarose-Ethidiumbromid-Gels analysiert.. Zusätzlich erfolgte eine DNA-Bestimmung mittels Photometer bei 260 nm (s.u.).

Zur Kontrolle des Inserts wurden anschließend Restriktions-Reaktionen angesetzt.

Die Detektion der verdauten Produkte erfolgte mittels eines 1,5%-Agarose-Gels durch Elektrophorese bei 100 V. Dabei wurde ein kb-Basenmaßstab mitgeführt.

Bei positivem Ergebnis wurden Glycerin-Stocks der transfizierten Kulturen angefertigt. Dazu wurden 0,7 ml frische, über-Nacht-Bakterienkultur mit 0,3 ml Glycerin-Lösung (50%) vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Plasmid DNA Maxi-Präparation

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu erhalten, wurden aus der Vorkultur (s.o.) der positiv-getesteten Klone 500  $\mu$ l in 100 ml neues LB-Medium mit Ampicillin-Zusatz überführt und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Plasmid-Präparation mit Hilfe eines Qiagen Maxi-Kits (Best.Nr. 12162). Dazu wurden die 100 ml Bakterien-Kultur auf 50 ml Falcon-Tubes verteilt und für 20 min bei 4000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Resuspension des Bakterien-Pellets erfolgte mit 10 ml des mitgelieferten Resuspensionspuffers. Nach Zugabe von 10 ml Lyse-Puffer wurde die Suspension für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml Neutralisationspuffer wurde die Probe für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ansätze wurden bei 4000 RPM zentrifugiert. Die Säulen aus dem Kit wurden zuerst mit 10 ml Äquilibrationspuffer und nach dem vollständigen Durchlauf des Puffers mit dem klaren Überstand der zentrifugierten Probe beladen. Nach vollständigem Durchlauf der Probe wurden die Säulen 2x mit 30 ml Wasch-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 15 ml Elutionspuffer. Durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol wurde die DNA ausgefällt und bei 4000 RPM 20 min zentrifugiert. Nach Waschen des DNA-Pellets in 15 ml 70%-igem Ethanol und erneutem Zentrifugieren bei 4000 RPM wurde das DNA-Pellet in 150  $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen. Von dieser DNA-Probe wurde eine photometrische Konzentrationsbestimmung vorgenommen, und es erfolgte eine Kontrolle durch Agarose-Gel-Elektrophorese. Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden 2  $\mu$ l der DNA-Lösung mit 98  $\mu$ l Wasser verdünnt. Die Messung erfolgte in einer 80  $\mu$ l Quarzküvette im Photometer, das gegen Wasser auf 0 kalibriert wurde. Durch Extinktionsmessung bei 260 nm wurde die DNA-Konzentration berechnet. Dabei wurde davon ausgegangen, dass eine Extinktion von 1.0 bei 260 nm einer doppelsträngigen DNA-Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  entspricht.

### Sequenzkontrolle

Zur Kontrolle der Vektorsequenzen wurden Sequenzier-Reaktionen nach der Kettenabbruch-Methode mit dem AmpliTaq FS1/4 BigDyeTerminator-Premix (ABI PRISM) durchgeführt. Dazu wurden 2 µl des Premixes mit ca. 250 ng Doppelstrang-DNA, 10 pmol Sequenzier-Primer und Wasser ad 10 µl angesetzt.

Sequenzier-PCR-Reaktion: 25 Zyklen (96°C für 10 sek., 50°C für 5 sek., 60°C für 4 min).

Zur Aufreinigung der Sequenzier-Reaktion wurde die Produkte durch Zugabe von 100% Ethanol auf 0,7 Vol% und Zugabe von 3 µl 3M-Natrium-Acetat-Lösung, pH 4,6, ausgefällt, bei 14.000 RPM abzentrifugiert und in 30 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach erneutem Abzentrifugieren bei 14.000 RPM wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet getrocknet und in 10 µl Sequenzier-Puffer (TSR) aufgenommen. Sequenziert wurde auf einem Abi Prism 5700-Sequencer (Perkin Elmer/Applied Biosystems).

Die Kontrolle der Insert-Sequenz erfolgte durch Alignment mit der bekannten Maus-Sequenz.

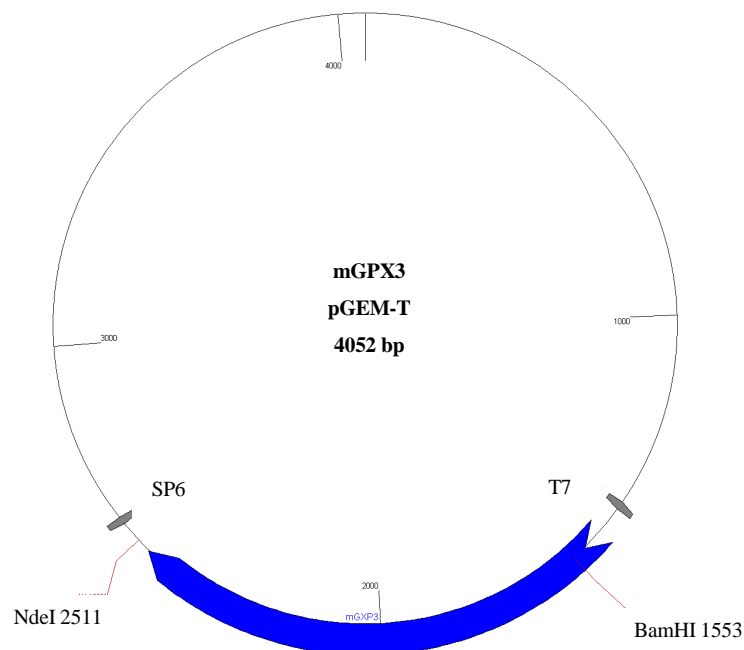


Abbildung 5: Vereinfachte Vektorkarte des pGEM-T-Vektors mit Maus-GPX3 Insert:

Restriktionsverdau-Schnittstellen: NdeI & BamHI

SP6/T7-Polymerase-Promoter: SP6 & T7

### 2.3.6 Maus-Gewebe für ISH

Sämtliche untersuchten murinen Gewebe stammten vom Black-6-Labormausstamm.

Das Betäuben der Mäuse erfolgte durch Einbringen in eine gesättigte CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bis zum

Erlöschen der Reaktion auf Schmerzreize. Anschließend erfolgte das Töten der Tiere durch Translokation der Halswirbelsäule. Die Mäuse wurden direkt im Anschluß seziiert. Die entnommenen Gewebe wurden in O.C.T-Medium (optimal cutting temperature, TissueTek) eingebettet und anschließend bis zum völligen Durchfrieren in mit flüssigem Stickstoff gekühlten 2-Methylbutan verbracht, und um das Austrocknen zu vermeiden in Parafilm eingewickelt. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Das Gewebe wurde im Gefriermikrotom geschnitten. Die Objekt-Temperatur lag zwischen  $-12^{\circ}\text{C}$  und  $-17^{\circ}\text{C}$ . Die Schneidekammer-Temperatur betrug  $-20^{\circ}\text{C}$ . Die Gewebeschnitte wurden auf Objektträger aufgezogen, welche zuvor mit einer 2%-igen Lösung aus 3-Triethoxysilylpropylamin (Merck) in Aceton silanisiert, über Nacht im Ofen bei  $30^{\circ}\text{C}$  getrocknet und anschließend zur Vernichtung von RNasen gebacken wurden ( $200^{\circ}\text{C}$  über Nacht). Die Schnittdicke betrug 10-14  $\mu\text{m}$ . Die Schnitte wurden auf dem Objektträger bei Raumtemperatur für 15 min getrocknet und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.3.7 In-Vitro Transkription und radioaktive Sonden-Markierung

Die aus den Maxi-Präparationen stammenden pGPX- bzw. SePP-Plasmide wurden mit den entsprechenden (s. folgende Tabelle ) Restriktionsenzymen linearisiert, um bei der *In Vitro*-Transkription sog. Run-Off-Transkripte zu erhalten.

Verdau-Ansätze (in Klammer RNA-Polymerase-Site):

Plasmid	Sense	Antisense
#18_pGPX	NdeI (T7)	BamH1 (SP6)
d7_mSeP	XhoI (SP6)	SpeI (T7)

Der Restriktions-Verdau (Enzyme der Fa. NEB) wurde nach Anleitung der Firma durchgeführt. Für den Verdau wurden 3 Units an Restriktionsenzym pro  $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt. Die Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  erfolgte, um einen möglichst vollständigen Verdau zu garantieren, für 5 h. Anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Das DNA-Pellet wurde in einer entsprechenden Menge TE-Puffer aufgenommen und vollständig auf ein 1,5%-Agarose-Ethidium-Bromid-Gel geladen. Die Elektrophorese wurde in TBE-Puffer bei 100 V durchgeführt. Das Agarose-Gel wurde anschließend photographiert, und auf dem UV-Tisch wurden die Banden des linearisierten Plasmids mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Elution des linearisierten Plasmids erfolgte mit

Hilfe des Qiagen Gel-Extraktions-Kits (B.Nr. 28604). Die Konzentration des Eluats wurde mittels eines Photometers bestimmt.

*In vitro*-Transkription:

Bei der *In vitro*-Transkription werden verschiedene DNA-abhängige RNA-Polymerasen (z.B. T7, SP6 (Fa. NEB)) eingesetzt. Diese binden an die entsprechende T7- bzw. SP6-Polymerase-Start-Sequenz auf dem verwendeten pGem-T-Vektor. Man unterscheidet je nach Orientierung der transkribierten Sonden-RNA zur endogenen mRNA die Kontrollsonden (sense) und die antisense Sonden. Dabei binden antisense-Sonden die komplementäre mRNA, sind also die eigentlichen Nachweis-Sonden für die interessierende zelluläre mRNA bei der ISH. Die sense-Sonden, welche die gleiche Orientierung wie die mRNA besitzen, binden diese nicht. Sie werden als Negativ-Kontrolle eingesetzt und geben Auskunft über das Ausmaß der unspezifischen Sonden-Bindung. Es wurde 1 µg linearisiertes Plasmid für die Transkription verwendet. Für die radioaktive Markierung wurde  $\alpha^{35}$  Schwefel in Form von  $\alpha^{35}$  S-UTP eingesetzt. Es wurden 150 µCi für die antisense-Sonde, und 75 µCi für die Sense-Sonde eingesetzt. Die Lösung der radioaktiven Nukleotide (Hartmann Analytik, Braunschweig) wurde in der SpeedVac eingedampft, um eine Volumenreduktion zu erreichen, was die Effizienz des Einbaus der radioaktiven Nukleotide erhöht. Außerdem wurde ein NTP-Mix (0,5 M ATP, CTP, GTP), 12,5 Units RNase-Inhibitor (Rnasin, Promega B.Nr. 2111) und 20 Units der entsprechenden RNA-Polymerase (SP6/T7 (Gibco, B.Nr. 18018-010, 18033-019)) mit dem mitgelieferten 10xPuffer zugesetzt.

<b>Transkriptionsansatz (antisense)</b>	
$\alpha^{35}$ S-UTP	150 µCi
linearisierte DNA	1 µg
NTP-Mix (à 0,5 M)	1,5 µl
DTT (100 mM)	1,0 µl
RNase-Inhibitor	12,5 Units
10x-Polymerase-Puffer	1,0 µl
T7/SP6-Polymerase	20 Units
Wasser	ad 10 µl

Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 90 min. Zum Abbau der eingesetzten Plasmid-DNA und von DNA-RNA-Hybrid-Komplexen wurde der Reaktionsansatz anschließend mit 10 Units DNase bei

## Material & Methoden

37°C für 15 min inkubiert. Um eine bessere Penetration der RNA-Sonde in das Gewebe zu erreichen, wurde eine alkalische Hydrolyse zur limitierten Fragmentierung der Sonde durchgeführt. Dazu wurde der Transkriptionsansatz mit einem Volumen Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (0,2 M, pH 10,2) vermischt und bei 37°C inkubiert. Die Dauer der Inkubation richtet sich dabei nach der Ausgangsgröße und nach der Zielgröße der Sonde.

Sie errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Inkubationszeit (min)} = \frac{\text{Ausgangslänge (kb)} - \text{Ziellänge (kb)}}{0,11 \times \text{Ausgangslänge} \times \text{Ziellänge}}$$

Die Ziel-Länge der Sonden betrug in unseren Experimenten 250 bp. Im Anschluss an die Inkubation erfolgte die Neutralisation mit 1/20 Volumen 10%-iger Essigsäure und Zugabe von TE-Puffer ad 70 µl. Zur Entfernung der nicht eingebauten Nukleotide wurden die Proben in einer Zentrifuge über Sephadex-G50-Säulen (Pharmacia, Sigma-Aldrich B.Nr. 271128) abzentrifugiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Effizienz des radioaktiven Einbaus, indem 2 µl der markierten Sonde in 4 ml Szintillator (Ultima Gold, Packard) im β-Counter (Packard) für 1 min gemessen wurde.

Prähybridisierung der Schnitte:

Alle folgenden Schritte wurden unter Vermeidung von RNase-Kontamination durchgeführt. Das PBS wurde zu diesem Zweck mit 0,1% DEPC (Diethylpyrocarbonat, Sigma-Aldrich B.Nr. 40718) über Nacht inkubiert und anschließend autoklaviert. Alle benutzten Glaswaren wurden gebacken.

Die Schnitte wurden erneut bei Raumtemperatur für 15 min getrocknet und anschließend wurden folgende Schritte bei Raumtemperatur auf dem Schüttler durchgeführt:

## Material & Methoden

### Ablauf Hybridisierung:

	Zeit t
Fixierung in 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS	60 min
0,4% Triton-X-100 in PBS	10 min
Waschen in PBS	5 min
H <sub>2</sub> O	1 min
TAE-Puffer + 0,5 ml Essigsäureanhydrid	10 min
Waschen in PBS	10 min
H <sub>2</sub> O	1 min
50 % Ethanol	30 sek
70 % Ethanol	30 sek

Der TAE-Puffer mit Essigsäureanhydrid diente der Azetylierung der Schnitte. Dieser Schritt blockiert polare und geladene Gruppen des Gewebes, so dass die unspezifische Bindung der Sonde vermindert wird.

Im Anschluß wurden die Schnitte erneut 15 min getrocknet und dann weiterverarbeitet bzw. bei – 20°C weggefroren.

### Hybridisierung:

Die Hybridisierung erfolgte mit Hilfe des Hybridisierungsmixes. Von der Sonde wurde final 50.000 cpm (counts per minute) pro µl Mix eingesetzt. Pro Schnitt wurden je nach Schnittgröße zwischen 35 µl und 70 µl des Hybridisierungsmixes aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte mit aufgelegtem Deckglas bei 60°C über Nacht in einer feuchten Kammer (50% Formamid in H<sub>2</sub>O).

### Posthybridisierung, Exposition & Auswertung:

Am nächsten Tag wurden die Deckgläser durch Spülen in 2x SSC entfernt.

Folgende Waschschritte wurden im Anschluß bei Raumtemperatur (falls nicht anders angegeben) auf dem Schüttler durchgeführt:

	<b>Zeit t</b>
2 x SSC	20 min
RNase-Puffer, 37°C	30 min
1 x SSC	20 min
0,2 x SSC	20 min
0,2 x SSC, 60°C	60 min
0,2 x SSC, 60°C	15 min
H <sub>2</sub> O	15 min

Im anschließenden RNase-Verdau werden alle einzelsträngigen und nicht gebundenen Sonden abgebaut und in den folgenden Schritten vom Schnitt gewaschen. Die Schnitte wurden erneut bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Kontrolle der Hybridisierung wurde, vor dem Auftragen der eigentlichen Nachweis-Emulsion, über Nacht ein Biomax-Röntgenfilm (KODAK, B.Nr. 871 5187) direkt auf die trockenen Schnitte aufgelegt und über Nacht bei Raumtemperatur exponiert. Am nächsten Tag wurde der Film entwickelt und das Ergebnis der Hybridisierung im Hinblick auf Signalstärke und Spezifität anhand der Kontrollhybridisierung beurteilt.

Im Folgenden wurden die Schnitte bei Safelight in der Dunkelkammer in Hypercoat-Emulsion (Autoradiographie-Nachweissystem, Amersham) bei 40°C gedippt. Nach Antrocknen der Photoemulsion wurden die Schnitte in lichtdichte Expositionsboxen mit Trockenmittel (Silica) gestellt. Bei 4°C erfolgte die Exposition je nach Signal auf dem Biomax-Film für 3 bzw. 6 Wochen. Die sense-Sonde (Negativkontrolle) blieb immer 6 Wochen exponiert.

Die Entwicklung erfolgte mittels Kodak-Entwickler D19 (B.Nr. 146-4593) für 3 min. Für die Fixierung wurde entweder Kodak-Fixerer oder Natriumthiocyanat (Sigma) verwendet.

Die Gegenfärbung erfolgte mit Mayer's Hämalaun-Lösung (Sigma B.Nr. 51275) für 1 min und anschließend 5 min Bläuen in fließendem Leitungswasser. Die 10 µm Schnitte wurden zusätzlich mit Eosin (Sigma B.Nr. E4382) für 2 min gegengefärbt und für 2 min in Leitungswasser gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte über eine Alkoholreihe (70%, 90%, 100%, Xylol) dehydriert und mit Eukitt-Eindeckelmedium (Sigma B.Nr. 03989) eingedeckelt.

Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit einem Zeiss Axioskop. Die Schnitte wurden mit einer Sony-CCD-Kamera digitalisiert und im TIFF-Format auf dem Rechner abgespeichert.

#### **2.4 Human Multiple Tissue Expression Array (MTE)**

Bei dem käuflichen MTE-Array handelt es sich um eine Northern Blot-Membran mit punktförmig auftragender cDNA aus unterschiedlichen Geweben bzw. Zellen. Mit Hilfe einer radioaktiven



SePP-Sonde wird durch Hybridisierung mit der Gewebe-cDNA ein quantitativer Wert ermittelt, der mit dem mRNA-Gehalt der aufgetragenen Gewebe korreliert und damit einen Vergleich der unterschiedlichen Gewebe bezüglich ihres SePP-mRNA-Gehalts ermöglicht.

Die folgenden Methoden und die Auswertung des Multiple Tissue Expression Array (MTE) wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Lutz Schomburg durchgeführt.

Die Expressions Analyse des SePP in humanen Geweben wurde mit Hilfe des „Human Multiple Tissue Expression Array“ (MTE™) der Firma BD Bioscience/Clontech durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dCTP-markierten cDNA-Fragmenten entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Die Auswertung der Hybridisierung erfolgte mittels Cyclone Storage Phosphor System (Packard BioScience, Dreieich, Deutschland). Die Signal-Intensitäten wurden nach Abzug des Hintergrunds in „Digital Light Units per Unit Area“ (DLU/mm<sup>2</sup>) gemessen. Dabei wurde die Signal-Intensität der Leber als 100% definiert und die übrigen Signalstärken relativ zur Expression der Leber im Schaubild aufgetragen (% ALE = Prozent der adulten Leberexpression).

### 2.5 Immunhistochemie humanes Gehirn

Bei der Immunhistochemie handelt es sich um eine Technik zum spezifischen Nachweis eines Proteins im Gewebeschnitt. Die Spezifität wird durch den Einsatz eines Antikörpers gegen ein bestimmtes Protein erreicht. In unseren Versuchen verwenden wir die Immunhistochemie zum semiquantitativen Nachweis von SePP im humanen Gewebe-Schnitt.

#### 2.5.1 Patienten

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden Gewebe von Patienten ohne und mit neurologischen Erkrankungen aus dem Brain-Bank Archiv des neuropathologischen Instituts der Universität Würzburg ausgewählt:

<b>Erkrankung</b>	<b>Patientenanzahl (Alter in Jahren)</b>
Kontrollfälle	5 ( ½, 32, 38, 66, 78)
Morbus Alzheimer	2 (76, 80)
Morbus Parkinson	1 (71)
amyotrophe Lateralsklerose (ALS)	5 (60(f), 61, 63, 64, 73)
Multiple Sklerose	1 (73)

Abk.: (f) = familiäre ALS

### 2.5.2 Gewebeaufarbeitung

Die Entnahme, Verarbeitung und der Zuschnitt erfolgten nach den Regeln des Brain Net-Protokolls durch die Neuropathologie der Universität Würzburg. Die Einverständnis-Erklärung der Patienten bzw. Angehörigen zur Organentnahme lag bei allen Patienten, entsprechend dem Brain-Net-Protokoll, vor. Die entnommenen Gewebe wurden direkt nach der Sektion im pathologischen Institut in phosphatgepufferte 5%-ige Formalin-Lösung überführt, für ca. 2 Wochen fixiert und anschließend wie folgt zugeschnitten:

<b>Schnitt</b>	<b>Region</b>
1	Gyrus frontalis medius
2	Gyrus temporalis superior & medius
3	Gyrus supramarginalis des Lobulus parietalis inferior
4	Gyri occipitales (Area striata/parastriata/peristriata)
5	Gyrus cinguli (Area cingularis anterior), Corpus callosum
6	Hippocampus auf Höhe Corpus geniculatum laterale
7	Hippocampus auf Höhe des Uncus, entorhinaler Cortex
8	anteriores Striatum, Nucleus accumbens
9	Pallidum, Putamen auf Höhe des Corpus mammillare
10	Thalamus mit Nucleus mediodorsalis
11	Thalamus, Nucleus subthalamicus, Corpus mamillare
12	Amygdala, Substantia innominata auf Höhe Commissura ant.
13	Kleinhirnwurm
14	Kleinhirnhemisphäre, Nucleus caudatus
15	Mesencephalon mit Substantia nigra (Pars compacta)
16	Pons mit Locus coeruleus
17	Medulla oblongata mit unterem Olivenkern, Ncl. dorsalis nervi vagi, Ncl. nervi hypoglossi

Die in der Tabelle aufgeführten Regionen wurden standardmäßig entnommen. Bei bestimmten Erkrankungen (z.B. ALS) wurden weitere Regionen entnommen. Nicht bei allen Patienten wurden in der vorliegenden Studie alle Blockpräparate untersucht.

Die Aufbereitung der Gewebe erfolgte nach den Standards des Pathologischen Instituts. So wurden die Gewebe nach dem Zuschnitt in Histologiekapseln verbracht. Die Entwässerung & Paraffinierung erfolgte automatisch über Nacht (Programm: 5% Formalin 2x1h, Ethanol 80% 2x2h, Ethanol 100% 4x2h, Xylol 100% 2x2h, Paraffin 4x2h), und anschließend wurden die

Gewebe in Paraffin eingebettet. Der Zugschnitt erfolgte am Mikrotom mit einer Schnittdicke von 8 µm. Die Schnitte wurden auf SuperFrost™-Objektträgern aufgezogen und mindestens über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Parallel wurden HE- und Klüver-Barrera-Färbungen durchgeführt.

### 2.5.3 Antikörper

Zur Herstellung eines für die Immunhistochemie geeigneten Antikörpers wurden die Peptide SePP2 und SePP5 extern von einer Firma synthetisiert, an KLH gekoppelt und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Die gewonnenen Antiseren wurden Affinitäts-gereinigt (Fa. Eurogentec, Belgien). Ak#207 wurde im Schaf gegen ein murines SePP-Peptid produziert, das jedoch eine große Sequenzhomologie im ausgewählten Abschnitt mit humanem SeIP aufweist.

Lokalisation der Antigene:



**Selenoprotein P linear** (61 kDa, 381 AS, türkis = Signalpeptid, gelb = SeCys)

Antigene:

SePP2 (AS 14-28, Kaninchen): L P S G G T E S Q D Q S S L C

SePP5 (AS 253-266, Kaninchen): Q H R Q G H P E N R D M P A

Ak#207 (AS 221-236, Schaf): S K P S E N Q Q P G P S E T A C

Der Antikörper Ak#207 sowie SePP2 wurden nur zu Kontrollzwecken in den folgenden Untersuchungen eingesetzt.

### 2.5.4 Immunhistochemie

Das Entparaffinieren & Wässern erfolgte mittels einer absteigenden Alkoholreihe ( Xylol 2x 10min, Ethanol: 2x100% 5 min, 2x96% 5 min, 2x70% 5 min) und anschließendem Überführen & Spülen der Schnitte in H<sub>2</sub>O. Das Trocknen der Schnitte erfolgte auf einer Heizplatte bei ca. 40°C für max. 10 min. Die Gewebe-Schnitte wurden dabei mit einem Fett-Stift (PapPen, DAKO) auf

dem Objektträger eingerahmt. Die Schnitte wurden in Plastik-Färbeküvetten (mit Deckel) in Citratpuffer überführt und in der Mikrowelle bei 600 Watt Leistung 3 x 5 min gekocht (sog. Antigene Retrieval, Zeit gemessen ab Siedepunkt). Dabei wurde stets darauf geachtet, dass die Gewebeschnitte nicht austrocknen und bei Bedarf Citrat-Puffer nachgefüllt. Die Schnitte wurden dann in TBS-Puffer für 10 min abgekühlt. Zum Blockieren der gewebeeigenen Peroxidase erfolgte ein Inkubationsschritt in einer Wasserstoffperoxid-Lösung (250 ml H<sub>2</sub>O, 6 ml 30%-Wasserstoffperoxid) für 15 min bei Raumtemperatur. Nach dem kurzen Spülen der Schnitte in H<sub>2</sub>O und TBS erfolgte das Blockieren der unspezifischen Protein-Bindungsstellen auf dem Gewebe mit Hilfe von Ziegen Serum (Proteinblock, Fa. Biogenex, HK112-9k) für 20 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Das Ziegen Serum wurde anschließend abgekippt. Zur Antikörper-Verdünnung wurde TBS-Puffer mit Zusatz von 0,1% BSA (Sigma) verwendet. Die Antikörperverdünnung wurde in unterschiedlichen Konzentrationen ausgetestet (1:60, 1:100, 1:120). Dabei zeigten sich die besten Ergebnisse bei einer Antikörperverdünnung von 1:100. Es wurden pro Schnitt ca. 150 µl der Antikörper-Verdünnung aufgetragen und mit Hilfe einer Pipetten-Spitze gleichmäßig auf dem Gewebe-Schnitt verteilt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Am nächsten Tag wurde 2 x 5 min mit TBS-Puffer gespült. Das Spülen der Negativ-Kontrolle erfolgte separat. Anschließend wurde der MultiLink-Antikörper (MultiLink-Kit Konzentrat, Fa. Biogenex, LP 000-UI, Verdünnung: Antikörper + H<sub>2</sub>O = 1 + 20) bis zum vollständigen Bedecken des Gewebes auf den Schnitt geträufelt. Es folgte eine Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Nach 2 x 5 min Spülen in TBS wurde die Label-Lösung (MultiLink-Kit Konzentrat, Fa. Biogenex, LP 000-UI, Verdünnung: Label + H<sub>2</sub>O = 1 + 20) auf den Schnitt pipettiert und für 20 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert.

Nach 2 x 5 min Spülen in TBS erfolgte die Zugabe von 150 µl AEC-Reagenz-Verdünnung (1 ml 5 x Substratpuffer, 4 ml H<sub>2</sub>O, 2 Tropfen AEC, Fa. Biogenex) mit anschließender Inkubation für 2 min bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Spülen in TBS und anschließend in H<sub>2</sub>O gestoppt. Die Schnitte wurden in Mayers-Hämalaun (Sigma) für 1 min gegengefärbt und dann für 10 min in Leitungswasser gebläut. Das Eindecken der Gewebe erfolgte mit dem wasserlöslichen Eindeckelmedium Aquatex (Merck), da das AEC-Reaktionsprodukt Alkohol-löslich ist.

Die Negativkontrollen wurden während des gesamten Ablaufs parallel mitgeführt. In der ersten Antikörper-Inkubation wurde TBS mit 0,1% BSA ohne Antikörper eingesetzt. Die Waschschritte erfolgten separat von den anderen Schnitten. Als Positiv-Kontrollen wurden Schnitte eines

## Material & Methoden

bestimmten Patienten bei allen Färbungen mitgeführt. Bei den ersten Färbungen wurden zusätzlich Antikörper gegen Ubiquitin mitgeführt.

Kontrollen:

Die Spezifität der beiden Antikörper SePP#2 und SePP#5 wurde in Western-Blot-Experimenten gezeigt<sup>84,85</sup>.

Zusätzliche wurden folgende Kontroll-Experimente durchgeführt:

Negativkontrolle:

Bei jedem Färbedurchgang wurde ein Schnitt mit 0,1 % BSA in TBS-Puffer statt des Primärantikörpers durchgeführt.

Spezifitätskontrolle:

Zur Kontrolle der Spezifität führten wir Färbungen mit 3 verschiedenen Antikörpern durch (vgl. Kapitel Antikörper).

Präabsorbitionsexperimente:

Die Antikörper-Lösung wurde mit 0,1% und 1% humanem Serum bei Raumtemperatur 15 min vorinkubiert.

### 2.5.5 Datenbank

Zur Verarbeitung der Daten aus der immunhistochemischen Färbereihe wurde auf Grund der Datenmenge die Verwendung einer Datenbank notwendig. Die Datenbank wurde mit Access 2003 der Firma Microsoft erstellt.

Ziele der Datenbank waren dabei (Abbildungen 6-9):

- Einfache Eingabe der Ergebnisse über eine Eingabemaske
- Sinnvolle Gliederung der Daten nach Patient bzw. Sektionsnummer, Erkrankung und Alter
- Möglichkeit komplexe Abfragen zu erstellen

Ergänzend wurde eine Tabelle aus einer orientierenden Auswertung der Schaubilder aus Nieuwenhuys' „Chemoarchitecture of the Brain“<sup>86</sup> erstellt, in der zu den unterschiedlichen Hirnstrukturen die jeweiligen Neurotransmitter aufgeführt sind.

## Material & Methoden

Patienten : Tabelle		m	w	Alter	Neuropathologie	Sonstige Erkrankungen
+	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		ALS	
+	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		Kontrollfall, altersentsprechend	Frühgeburt 28
+	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		Morbus Alzheimer Cerad C, Stadium VI	
+	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		Kontrollfall	Hypertonie, Koronarsklerose, Akute Koronarinsuffizienz
+	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		familiäre ALS mit bulbärem Beginn	
+	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		Kontrollfall, Status cribrus	Koronarsklerose, Myokardinfarkt
+	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		ALS	
+	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		Kontrollfall	
+	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		Kontrollfall	
+	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		ALS	Hypertonie
+	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		Alzheimer Cerad B, Braak IV, Amyloidangio	
+	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		AGD+PSP	
+	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		Kontrollfall	Myokardinfarkt
+	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		Multiple Sklerose Cerad Plaque Score A	Myokardinfarkt
+	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		ALS (lumbal betont)	Linksherzversagen
+	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		Argyrophilic Brain Disease+Morbus Alzheim	
+	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		M. Parkinson (lt. Klin. Angaben)	Absolute Arrhythmie
+	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		Morbus Parkinson (neokortikaler Subtyp) +	Herz Kreislaufversagen

Datensatz: 1 von 18

Abbildung 6: Tabelle Patienten mit Sektionsnummer, Geschlecht, Alter, Neuropathologie und weiteren Erkrankungen (Daten zur Wahrung der Anonymität hier z.T. ausgeblendet)

Ergebnisse : Tabelle		Regionen	Schnittcode	N 0	N (1)	N 1	N 2	N 3	N 4	N g	N fg	N<50	O	A 0	A (1)	A 1	A 2	A 3	A 4	A g	A fg	A<50	M 0	M (1)	M 1	M 2	M 3	M 4	M g	M fg	M<50
+	Lamina 4	230001																													
+	Lamina 5	230001																													
+	Lamina 6	230001																													
+	Marklager	230001																													
+	Lamina 1	230001																													
+	Corpus callosum	230005																													
+	Gyrus cinguli	230005																													
+	Area entorhinalis	230006																													
+	Subiculum	230006																													
+	Hippocampus CA 1	230006																													
+	Hippocampus CA 2	230006																													
+	Hippocampus CA 3	230006																													
+	Hippocampus CA 4	230006																													
+	Gyrus dentatus Körnerzellen	230006																													
+	Area entorhinalis	230007																													
+	Subiculum	230007																													
+	Gyrus dentatus Körnerzellen	230007																													
+	Hippocampus CA 4	230007																													
+	Cornu ammonis	230007																													
+	Alveus	230007																													
+	Nucleus caudatus	230008																													
+	Capsula interna	230008																													
+	Striae	230008																													
+	Putamen	230008																													
+	Nucleus septalis	230008																													
+	Broca Band	230008																													
+	Nucleus accumbens	230008																													
+	Nucleus caudatus Cornu	230009																													
+	Nucleus reticularis thalami	230009																													
+	Capsula interna	230009																													
+	Pallidum	230009																													
+	Globus pallidus externa	230009																													
+	Globus pallidus interna	230009																													
+	Nucleus caudatus	230010																													
+	Nucleus dorsolateralis thalam	230010																													
+	Nucleus reticularis	230010																													
+	Nucleus posterolateralis thal.	230010																													
+	Nucleus medialis thalami	230010																													
+	Nucleus habenularis thalami	230010																													

Datensatz: 1 von 857

Abbildung 7: Tabelle Ergebnisse

## Material & Methoden

Abbildung 8: Formular Ergebnis-Eingabe

Regionen	Acetylcholin	Dop	Noradrenalin	Adrenalin	Serotonin	Histamin	GABA	Glutamat+As
Colliculus superior	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Commissura anterior	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Cornu ammonis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Cornu anterius	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cornu posterius, Lamina IV, V, VI	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Corpus amygdaloideum	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Corpus amygdaloideum, pars media	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Corpus callosum	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Corpus geniculatum laterale	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Corpus geniculatum mediale	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Corpus mamillare	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Cortex cerebelli	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cortex cerebri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cortex entorhinalis	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cortex frontalis	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cortex praepiriformis	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cortex prefrontalis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cortex prepiriformis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Decussatio pyramidorum	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Eminentia mediana	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fascia dentata	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Fasciculus longitudinalis dorsalis	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fasciculus olivocochlearis	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fasciculus tegmentalis dorsalis	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fasciculus telencephalicus medialis	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Abbildung 9: Ausschnitt Tabelle Chemoarchitektur nach Nieuwenhuys<sup>86</sup>

### SePP-Score

Um die unterschiedlichen Färbeintensitäten der Hirnregionen untereinander besser vergleichen zu können, wurde ein sog. SePP-Score eingeführt. Zur Berechnung des SePP-Scores wurden den unterschiedlichen Kategorien der Färbeintensität jeweils Punktwerte zugeordnet (Intensität 0 entspricht Punktwert 0, Intensität (1) entspricht Punktwert 0,5, Intensität 4 entspricht Punktwert 4 usw.). Pro Messung/untersuchtem Areal wurde so ein Summenscore bestimmt und diese Summen zu einem Gesamtpunktwert addiert. Dieser Wert wurde durch die Gesamtzahl der Messungen in diesem untersuchten Areal dividiert. Dieser Wert ergibt den SePP-Score.

$$SePP - Score = \frac{\sum [n(N(1)) * 0,5 + n(N1) + n(N2) * 2 + n(N3) * 3 + n(N4) * 4]}{n(Messungen)}$$



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 In-Situ-Hybridisierung

Die Färbungen sind insgesamt gut auswertbar mit überwiegend mäßiggradigem unspezifischem Hintergrund. Die positiven InSitu-Signale können spezifischen Zellen zugeordnet werden. Eine Identifikation der einzelnen Zelle als Neuron ist bei großen Zellen bzw. in Kerngruppen gelagerten Zellen unproblematisch. Eine Unterscheidung der kleinen Neuronen gegenüber Gliazellen ist nur eingeschränkt möglich.

##### 3.1.1 Selenoprotein P

*Gehirn (Abbildung 10):*

Cortex:

Einzelne kleine Zellen stellen sich positiv dar. Diese entsprechen am ehesten keinen Neuronen.

Marklager subkortikal:

Einzelne kleine Zellen stellen sich positiv dar. Diese entsprechen am ehesten keinen Neuronen.

Subiculum:

Eine mäßig zeldichte Population an mittelgroßen Zellen, gut vereinbar mit einer Neuronen-Gruppe, ist positiv für SePP-mRNA.

Retrosplenium:

Es finden sich allenfalls einzelne, gering vermehrt positive, mäßig große Zellen, vereinbar mit Neuronen.

Zentrales Höhlengrau:

Histologisch zeigen sich gleichmäßig verteilte, mäßig große Zellen mit mäßiger Expression, passend zu Neuronen.

Colliculus superior:

Es finden sich gruppiert liegende (wohl unterschiedlichen Neuronen-Unterkernen entsprechend), mäßig positive Zellen mit mäßiggradiger Expression.

## Ergebnisse

### Gyrus dentatus:

In der Körnerzellschicht zeigen sich keine positiven Zellen. In der polymorphen Schicht, Körnerzellschicht-nah, finden sich positive mittelgroße Zellen (Neuronen). Im Stratum moleculare zeigen sich gleichmäßig verteilt kleine, gering vermehrt positive Neuronen.

### CA3:

Allenfalls einzelne Zellen stellen sich in der Körnerzellschicht gering vermehrt positiv dar.

### CA1:

In der CA1-Region in der Körnerzellschicht zeigen einzelne mäßig große Neuronen eine gering erhöhte Positivität für SePP-mRNA.

### Amygdala:

Es finden sich keine SePP-mRNA-positiven Zellen.

### Medialer Geniculatum Komplex:

Unterschiedliche Kerngebiete erscheinen unterschiedlich gefärbt. Das laterale Kerngebiet zeigt keine positiven Zellen. Die medial liegenden Kerngebiete lassen z.T. mäßig viele, verstreut liegende, positive Zellen erkennen.

### Stratum griseum superficiale Pars anterior:

Es zeigen sich wenige, mäßig positive mittelgroße Zellen, passend zu Neuronen. Die Zellen scheinen aber insgesamt nur wenig SePP-positiv.

### Nucleus ruber:

Histologisch sind diffus teils deutlich positive Zellen identifizierbar.

### Substantia nigra, pars compacta:

Relativ viele Zellen erscheinen mäßig positiv.

### Substantia nigra, pars reticularis:

Mäßig viele Zellen erscheinen mäßig positiv.

## Ergebnisse

Nucleus peripeduncularis:

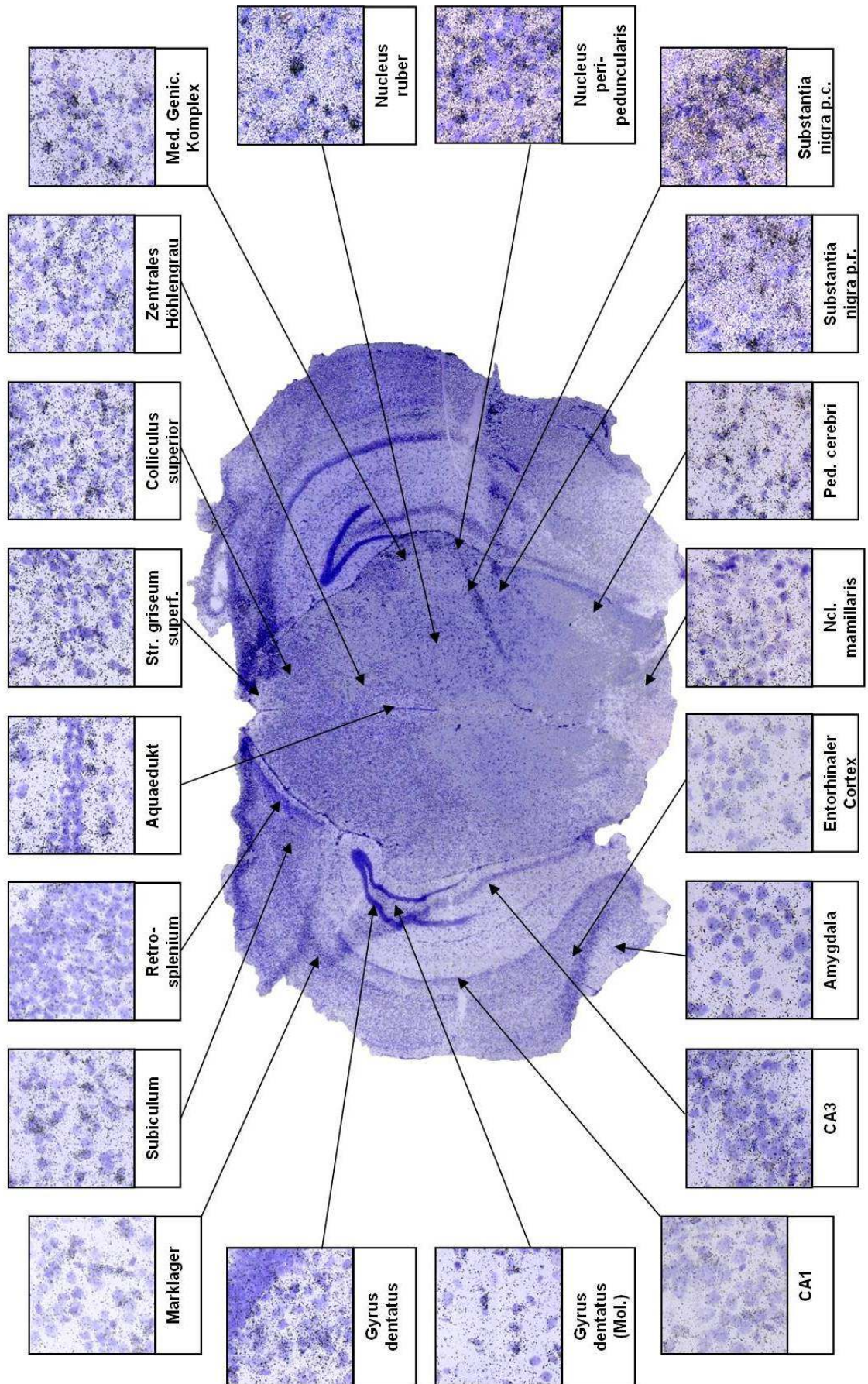
Histologisch zeigen sich mäßig viele, mäßig positive, diffus verteilte positive Zellen.

Pes cerebri:

Es finden sich mäßig viele, diffus verteilt liegende und gering positive Zellen.

Abbildung 10: SePP-In Situ-Hybridisierung Maus-Gehirn antisense (nächste Seite, zentrale Abbildung dient der Orientierung und wurde nachbearbeitet)

# In Situ Hybridisierung SePP Maus-Gehirn



## Ergebnisse

### *Lunge:*

Die Sense-Markierung zeigt einen relativ hohen Hintergrund, jedoch findet sich keine spezifische Anfärbung. In der Antisense-Markierung dagegen finden sich einige, wohl im Bereich der Alveolarwand gelegene Signalanhebungen (Myofibroblasten? Vgl. Abbildung 11). Eine genaue histologische Zuordnung zu einem bestimmten Zelltyp gelingt nicht eindeutig. Das Alveolarepithel zeigt z.T. eine geringe Positivität. Das Bronchialepithel scheint allenfalls gering positiv. Das Gefäßendothel erscheint fokal positiv.

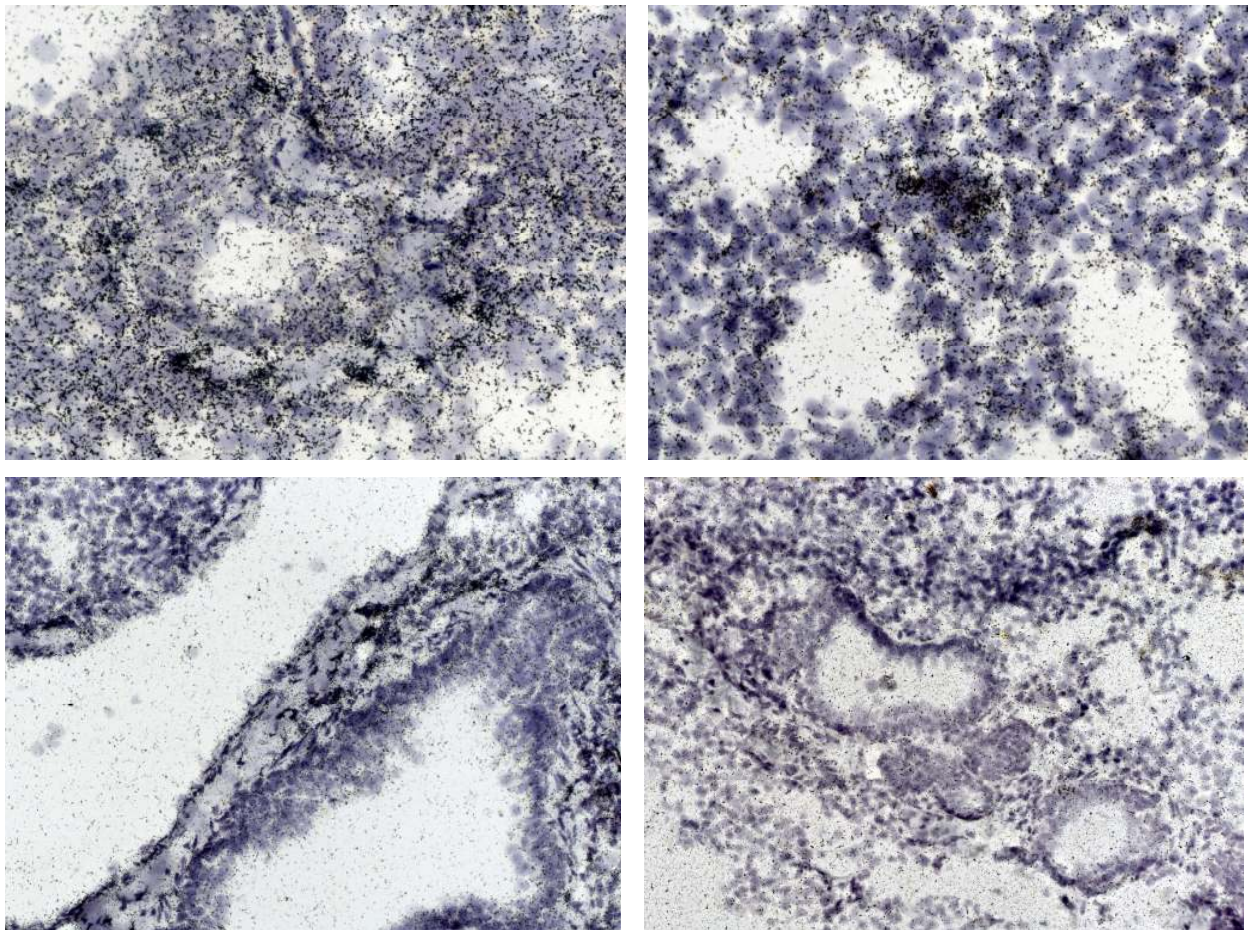


Abbildung 11: ISH Lunge SePP

- links oben: Lunge antisense mit positiver Färbung in der Alveolarwand (400x, HA, lange Belichtung)
- rechts oben: Lunge antisense (400x, HA, lange Belichtung)
- links unten: Bronchus (rechts) und Vene (links) antisense (200x, HA, lange Belichtung)
- rechts unten: Lunge sense (ca. 100x, HA, lange Belichtung)

## Ergebnisse

### *Thymus (Abbildung 12):*

Die Sense-Markierung zeigt einen relativ hohen Hintergrund, jedoch findet sich keine spezifische Anfärbung von SePP-mRNA. In der Antisense-Markierung kommen einzelne, diffus über das Organ verstreut liegende Zellen im Mark und der Rinde des Thymus zur Darstellung. Eine genaue histologische Zuordnung zu einem bestimmten Zelltyp gelingt nicht.

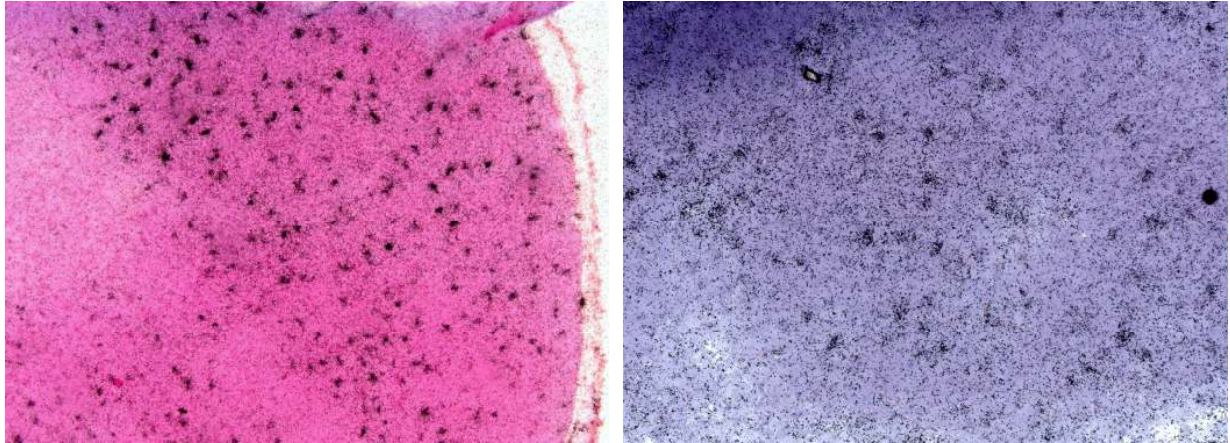


Abbildung 12: ISH Thymus SePP antisense

links: Thymus Rinde (100x, HE, lange Belichtung)

rechts: Thymus Mark (200x, HA, lange Belichtung)

### *Dünndarm:*

Die Sense-Markierung zeigt einen mäßig ausgeprägten, diffusen Hintergrund ohne spezifische Anfärbung. Die Antisense-Markierung färbt vermehrt Epithelzellen im Bereich des Isthmus/Zervix-Bereichs sowie das Oberflächenepithel.

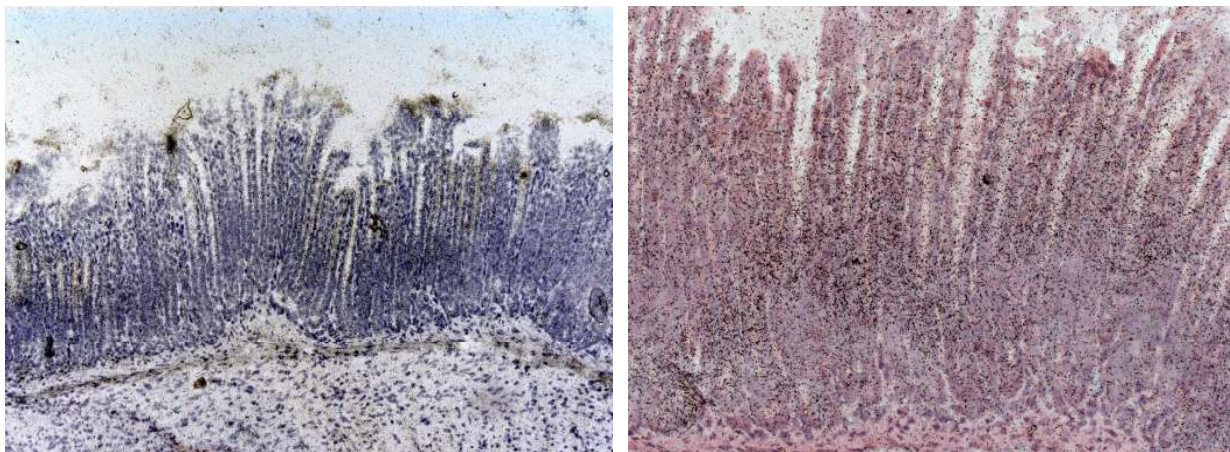


Abbildung 13: ISH Dünndarm SePP antisense

links: Dünndarm, positives Signal im Bereich des Isthmus/ der Zervix (100x, HA, lange Belichtung)

rechts: Dünndarm (200x, HE, lange Belichtung)

## Ergebnisse

### *Leber:*

Die Sense-Markierung zeigt einen geringen Hintergrund ohne spezifische Anfärbung. Auf Grund der zu erwartenden hohen Expression von SePP in der Leber wurde zusätzlich zu den üblichen zwei Expositionszeiten eine kurze Exposition über 2 Tage durchgeführt. In dieser Färbung ist das SePP-Transkript betont peripher im Leberzell-Läppchen zu erkennen, also in der Zone I des Rappaport-Leberazinus. Diese Verteilung zeigt sich prinzipiell auch bei den langen Expositionszeiten, jedoch scheinen wohl nahezu alle Leberzellen SePP zu exprimieren. In der langen Expositionszeit zeigt sich das Epithel der miterfassten Gallenblase positiv.

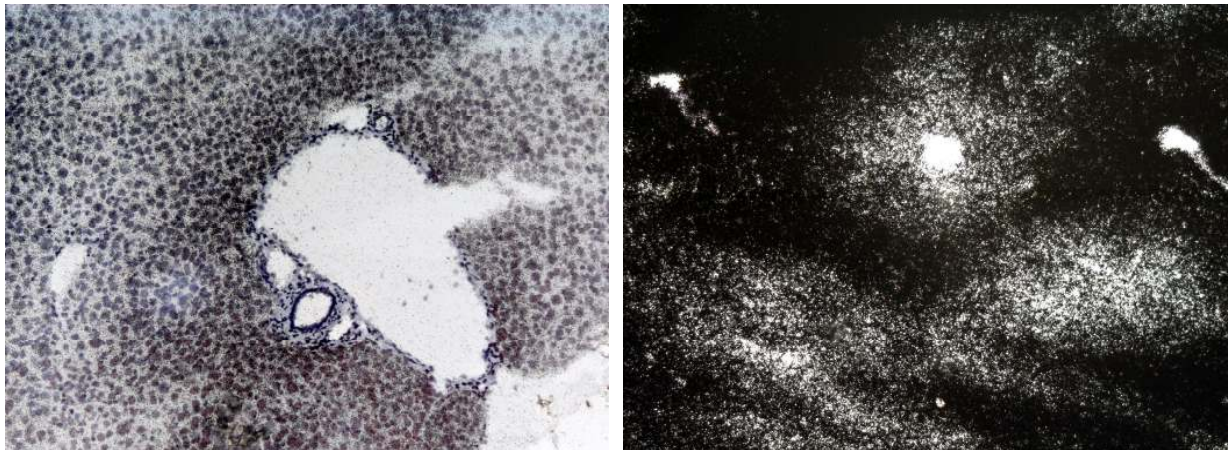


Abbildung 14: ISH Leber SePP antisense

links: Leber mit positiver Färbung in der Zone I n. Rappaport (100x, 2d Belichtung)

rechts: Leber (100x, 2 Wo Exposition)

### *Milz:*

Die Sense-Markierung zeigt einen relativ hohen, diffusen Hintergrund. In der Antisense-Färbung finden sich wenige, vereinzelte positive Zellen. Das Signal läßt sich aber keinem bestimmten Zelltyp zuordnen (vgl. Abbildung 15).

## Ergebnisse

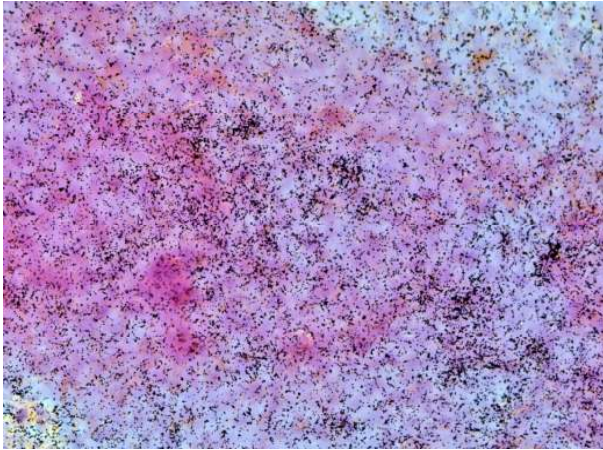


Abbildung 15: ISH Milz SePP antisense (200x, HE, lange Belichtung)

### *Harnblase:*

Die Sense-Markierung zeigt einen mäßig ausgeprägten, diffusen Hintergrund ohne spezifische Anfärbung. In der Antisense-Färbung ist das Urothel allenfalls gering positiv. In der Harnblasenwandung sind vereinzelt positive Zellen identifizierbar. Diese sind jedoch nicht eindeutig einem Zelltypus zuordenbar (evtl. Endothel?).

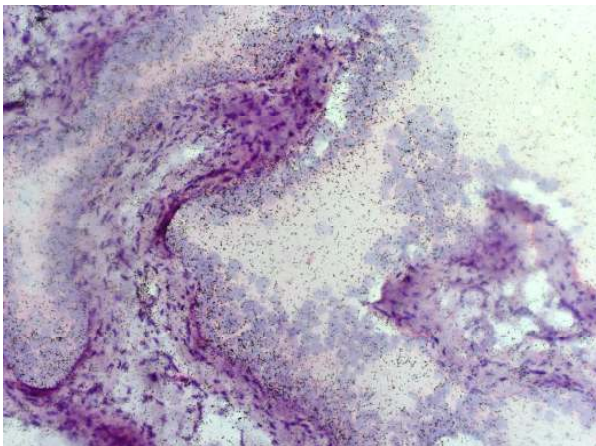


Abbildung 16: ISH Harnblase SePP antisense (200x, HE, lange Exposition)

### *Skelettmuskulatur:*

Die Sense-Markierung zeigt einen relativ hohen Hintergrund, jedoch findet sich keine spezifische Anfärbung von SePP-mRNA. In der Antisense-Färbung sind im Endomysium vereinzelt deutlich positive Zellen zu finden, bei denen es sich evtl. um Perizyten handelt. Vereinzelt scheinen Endothelzellen positiv für SePP-mRNA zu sein (vgl. Abbildung 17).



## Ergebnisse

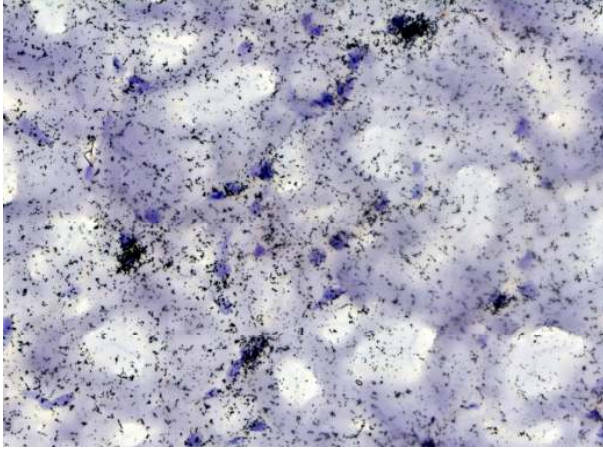


Abbildung 17: ISH SePP Skelettmuskulatur antisense mit positiver Färbung von Zellen im Endomysium (200x, HA, lange Exposition)

### *Niere:*

In der Sense-Markierung findet sich stellenweise ein deutlicher Hintergrund ohne spezifische Anfärbung. Die kurze Exposition zeigt nahezu keinen Hintergrund.

In der Antisense-Markierung werden die Glomerula deutlich ausgespart (vgl. Abbildung 18).

Umgebende Tubuli (proximale Tubuli) sind deutlich positiv für SePP-mRNA. Die Sammelrohre hingegen sind negativ SePP-mRNA. Am Übergang Nierenmark zur Rinde die Marktubuli deutlich geringer positiv als die Rindentubuli. In der langen Belichtung zeigt sich deutlich, dass nicht alle Tubuli positiv angefärbt sind. Die Glomerula sind auch in der langen Exposition negativ für SePP-mRNA.

## Ergebnisse

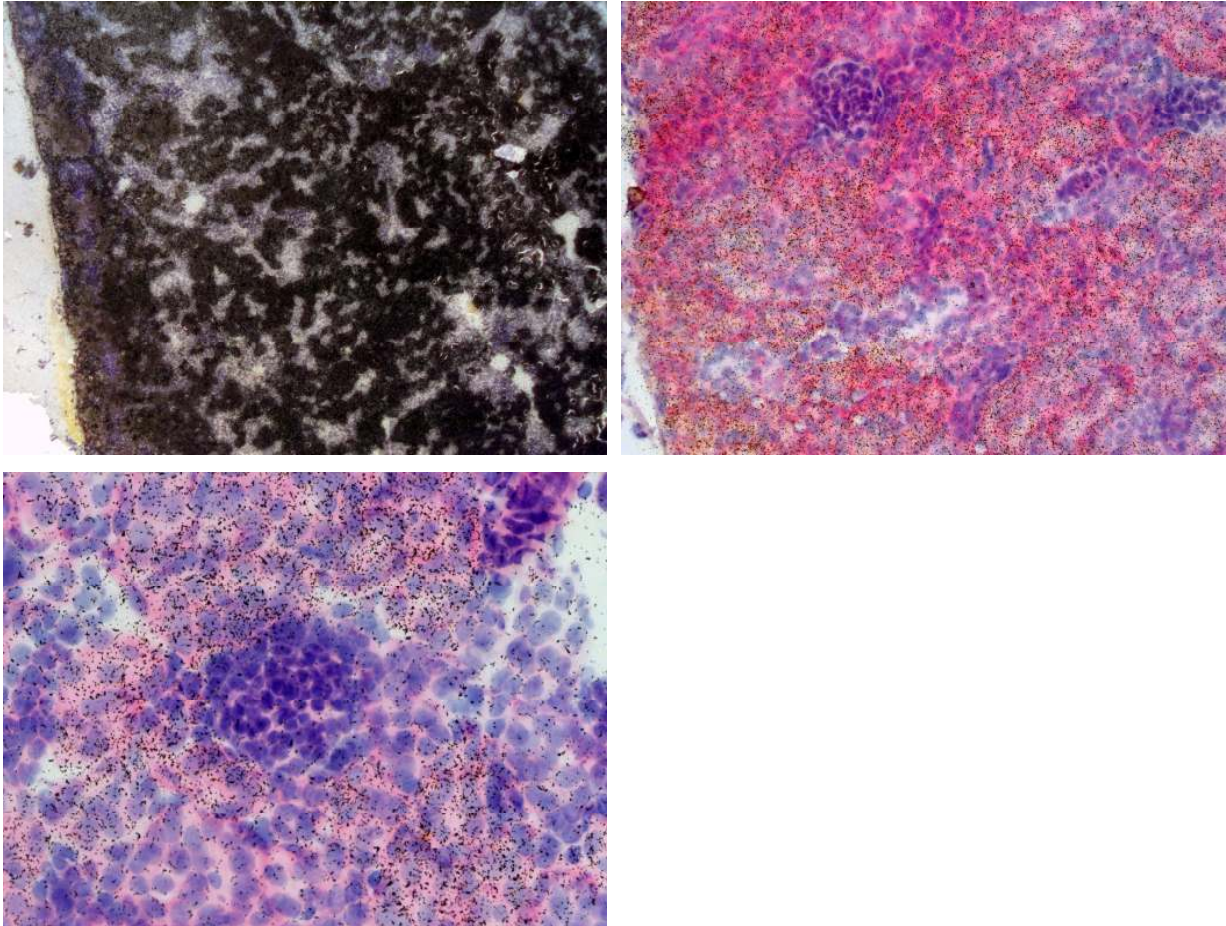


Abbildung 18: ISH Niere SePP antisense

links oben: Niere Übersicht (50x, HA, lange Exposition)

rechts oben: Niere (200x, HE, kurze Exposition)

links unten: Niere mit Glomerulum und Tubuli (200x, HE, kurze Exposition)

### *Herz:*

Die sense-Färbung zeigt einen mäßiggradigen Hintergrund.

In der Antisense-Färbung ist das Endokard fokal deutlich positiv für SePP-mRNA, im Myokard finden sich diffus verstreut einzelne deutlich positive Zellen, evtl. sind auch die intramuralen Gefäße positiv. Im Vorhofmyokard finden sich vor allem in der langen Exposition einzelne deutlich positive Zellen. In der langen Belichtung ist das respiratorische Epithel im miterfassten Bronchus betont basal gering positiv für SePP-mRNA.

## Ergebnisse

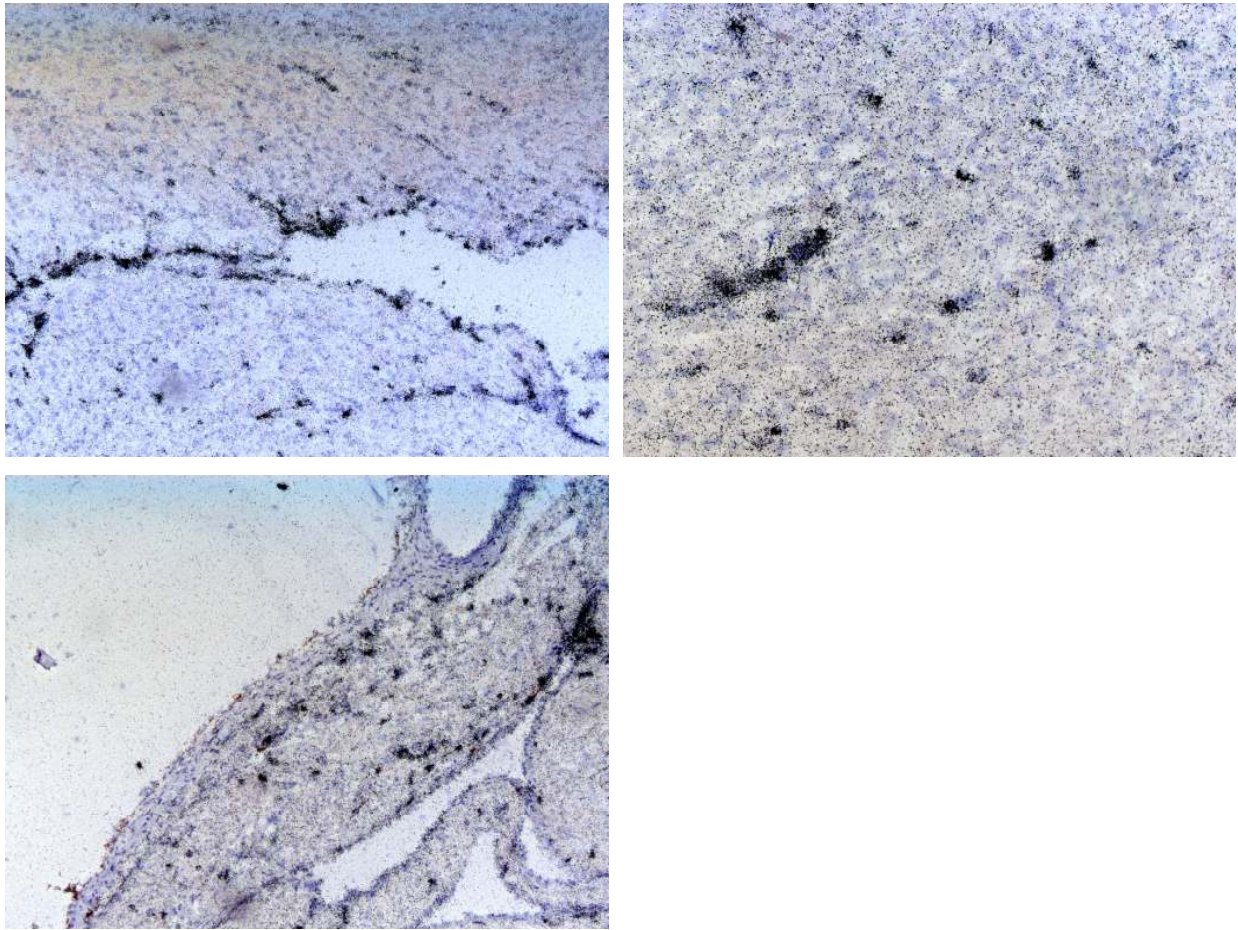


Abbildung 19: ISH Herz SePP antisense

links oben: Kammermyokard und Endokard (100x, HA, lange Exposition)  
rechts oben: Kammermyokard (200x, HA, lange Exposition)  
links unten: Vorhof (100x, HA, lange Exposition)

### *Hoden:*

Die Sense-Färbung zeigt einen mäßigen Hintergrund ohne spezifische Anfärbung, im Speziellen kommen die Leydig'schen Zwischenzellen nicht zur Darstellung. In der Antisense-Färbung sind die Leydig'schen Zwischenzellen deutlich markiert. Das Keimepithel bleibt negativ.

## Ergebnisse

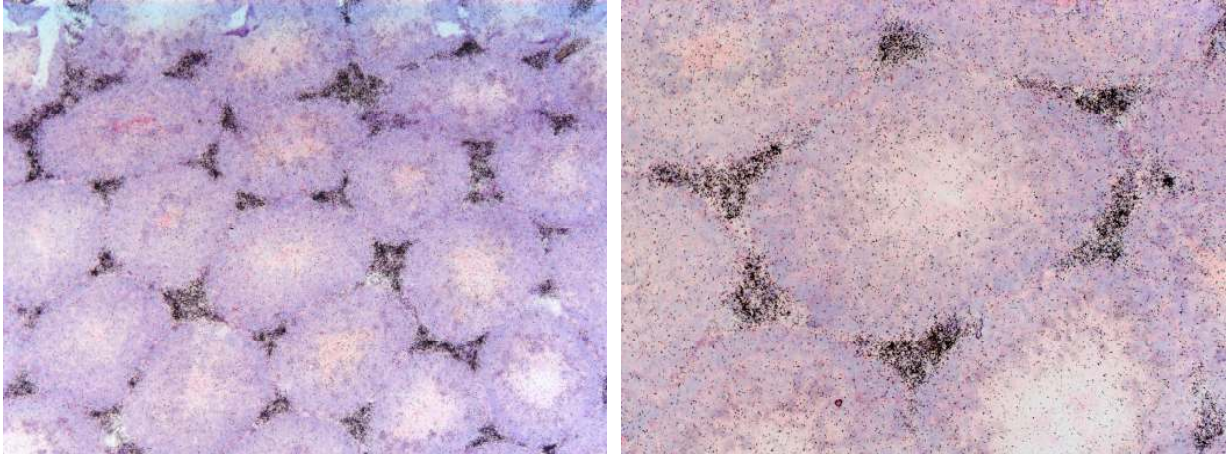


Abbildung 20 ISH Hoden SePP antisense

links: Hoden (100x, HE, lange Exposition)

rechts: Hoden Leydig-Zwischenzellen (200x, HE, lange Exposition)

### 3.1.2 pGPX

*Gehirn (Abbildung 21):*

Eine Sense-Färbung wurde nicht durchgeführt.

Nucleus ruber:

Es finden sich zentral keine pGPX-positiven Zellen. Im Randbereich des Nucleus hingegen zeigen sich positive Zellen.

Nucleus oculomotorius:

Es sind mäßig viele, teils deutlich pGPX-positive Zellen identifizierbar.

Zentrales Höhlengrau:

Histologisch finden sich mäßig viele, mäßig pGPX-positive Zellen

Gyrus dentatus Körnerzellschicht:

Es stellen sich keine auffallend positiven Zellen dar, eine geringe Positivität ist nicht auszuschließen.

Gyrus dentatus Molekularzellschicht:

Es finden sich keine positiven Zellen.

## Ergebnisse

CA1:

Die Zellen stellen sich negativ/gering positiv dar.

CA3:

Die Zellen stellen sich negativ/gering positiv dar.

Medialer Geniculatum Komplex:

Es finden sich keine positiven Zellen.

Stratum griseum superficiale:

Es finden sich keine positiven Zellen.

Retrosplenium:

Es finden sich keine positiven Zellen.

Subiculum:

Es finden sich keine positiven Zellen.

Colliculus superior:

Es zeigen sich einzelne gering-bis mäßig positive Zellen

Nucleus peripenduncularis:

Histologisch sind viele unterschiedliche Zellen positiv.

Substantia nigra, pars compacta:

Es zeigen sich viele deutlich positive Zellen, evtl. auch Zellen des Ncl. intralaminaris thalami posterior positiv.

Substantia nigra, pars reticularis:

Die Zellen sind negativ, evtl. einzelne Zellen gering positiv

Entorhinaler Kortex:

Es finden sich keine positiven Zellen.

## Ergebnisse

Pedunculus cerebri:

Es finden sich keine positiven Zellen.

Nucleus interpeduncularis:

Mäßig viele Zellen stellen sich gering positiv dar.

Marklager:

Allenfalls einzelne Zellen stellen sich gering positiv dar.

Amygdala:

Es finden sich keine positiven Zellen.

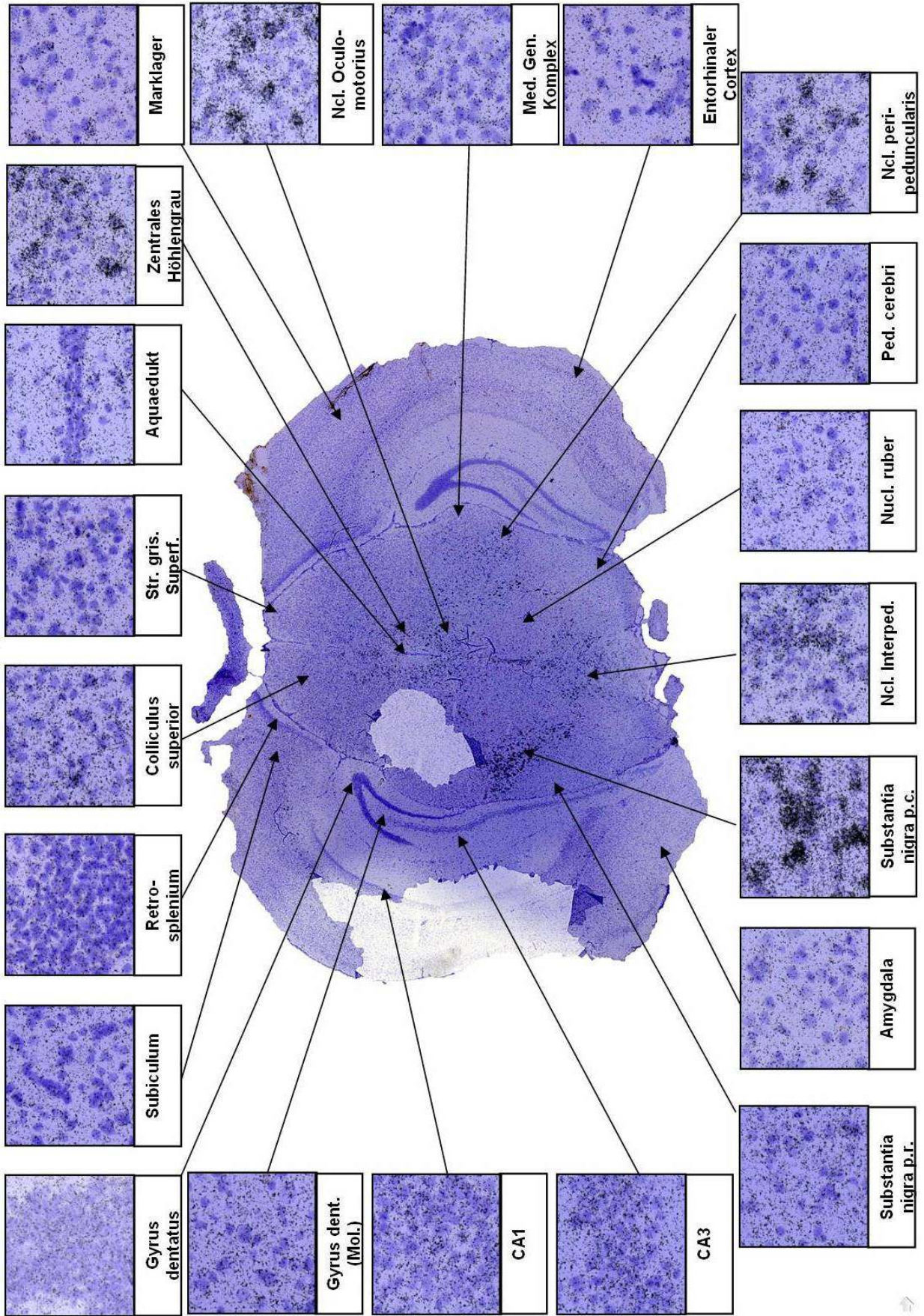
Tabelle 1: Zusammenfassende & vergleichende Ergebnisse der SePP- und pGPX-ISH im murinen Gehirn  
Abk.:

- = negativ, -(+) = einzelne schwach positive Zellen, -/+ = einzelne positive Zellen  
+ = gering positive Zellen, ++ = mäßig positive Zellen, +++ = stark positive Zellen  
n.e. = im Schnittpräparat nicht erfasst, p.c. = pars compacta, p.r. = pars reticularis

Lokalisation	SePP	pGPX
Nucleus ruber	++	-
Ncl. Oculomotorius	n.e.	+++
Zentrales Höhlengrau	++	++
Gyrus dent. (Körner)	-	-(+)
Gyrus dent. (Mol.)	(+)	-
CA1	(+)	-(+)
CA3	-(+)	-(+)
Med. Gen. Komplex	-/+	-
Retrosplenium	-(+)	-
Subiculum	++	-
Colliculus superior	++	-(+)
Nucl. peripeduncularis	++	++
Substantia nigra, p.c.	++	+++
Substantia nigra, p.r.	++	-(+)
Entorhinaler Cortex	-(+)	-
Ped. Cerebri	+	-
Ncl. Interped.	-	+
Marklager	-(+)	-(+)
Amygdala	-	-

Abbildung 21: pGPX-In Situ-Hybridisierung Maus-Gehirn antisense (nächste Seite)

**In Situ Hybridisierung pGPX Maus-Gehirn**



## Ergebnisse

### *Lunge:*

Die Sense-Markierung zeigt einen mäßig ausgeprägten, diffusen Hintergrund ohne spezifische Anfärbung.

In der Antisense-Färbung ist das Epithel der Bronchien negativ. Das Lungenparenchym ist mit vielen positiven, im Bereich der Alveolarwandung/Alveolarepithel gelegenen Zellen ausgestattet. Die Gefäßwände erscheinen pGPX-mRNA-positiv angefärbt.

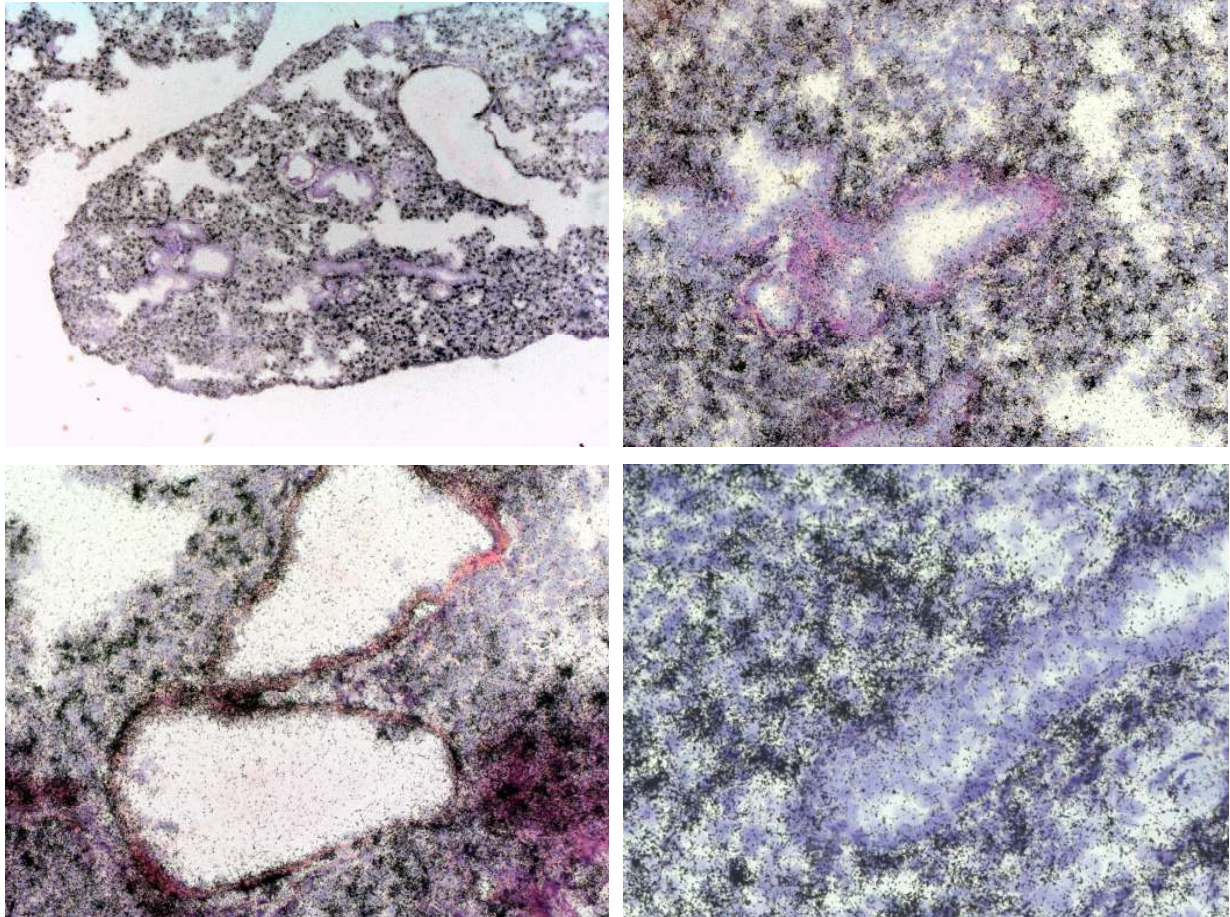


Abbildung 22: ISH Lunge pGPX antisense  
links oben: Lunge Übersicht (50x, HE, lange Belichtung)  
rechts oben: Lunge (200x, HE, lange Belichtung)  
links unten: Lunge (200x, HE, lange Belichtung)  
rechts unten: Lunge (400x, HA, lange Belichtung)

### *Thymus:*

Die Sense-Markierung zeigt einen mäßig ausgeprägten, diffusen Hintergrund ohne spezifische Anfärbung. In der Antisense-Markierung kommen im Thymus-Mark viele Zellen positiv zur Darstellung. Der genaue Zelltyp lässt sich nicht zuordnen. Die Thymus-Rinde ist negativ für



## Ergebnisse

pGPX-mRNA. In den Gefäßen erscheint die Media positiv. An den Thymus angrenzend ist deutlich positiv gefärbtes Gewebe identifizierbar, wahrscheinlich der Schilddrüse entsprechend.

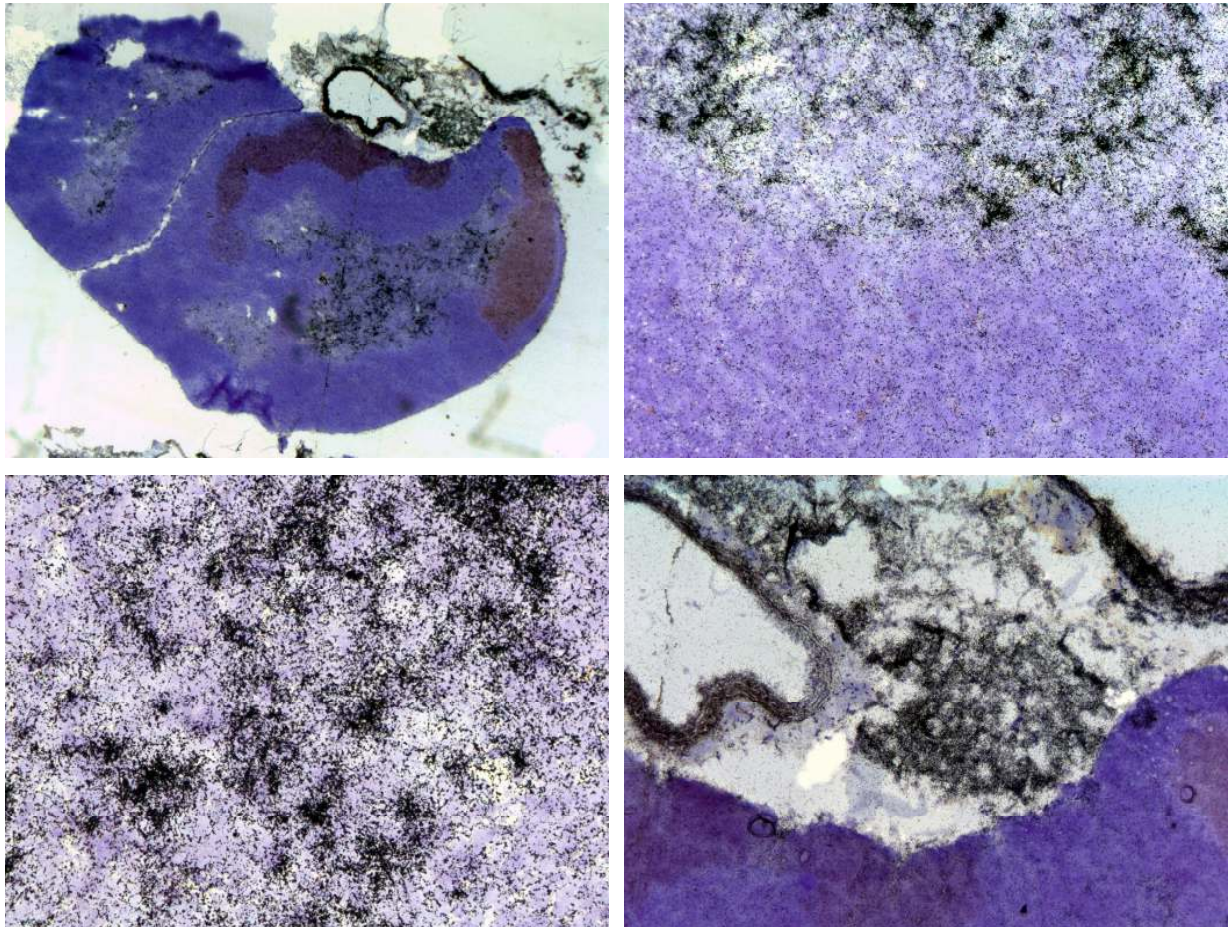


Abbildung 23: ISH Thymus pGPX antisense

- links oben: Thymus (25x, HE, lange Exposition)
- rechts oben: Thymus Mark-Rindenübergang (200x, HE, lange Exposition)
- links unten: Thymus Mark (400x, HE, lange Exposition)
- rechts unten: Thymus und Schilddrüse (100x, HE, lange Exposition)

### *Dünndarm*

Die Sense-Markierung zeigt einen mäßig ausgeprägten, diffusen Hintergrund ohne spezifische Anfärbung von pGPX-mRNA.

In der Antisense-Markierung ist eine deutliche pGPX-mRNA-Färbung im Übergangsbereich der Foveola zur Isthmusregion zu erkennen. In der Muscularis propria sind vereinzelt positive Zellen. Strangartig positive Zellverbände ziehen von außen durch die Muscularis nach innen, wahrscheinlichen Gefäßen entsprechend.

## Ergebnisse

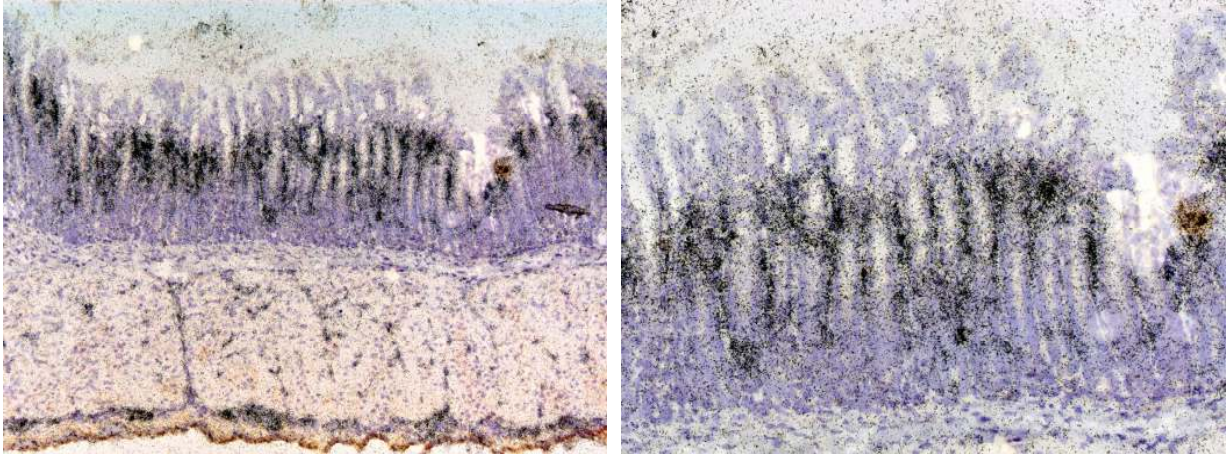


Abbildung 24: ISH Dünndarm pGPX antisense

links: 100x, HE, lange Exposition

rechts: 200x, HA, lange Exposition

### *Leber:*

Die Sense-Markierung zeigt einen mäßig ausgeprägten, diffusen Hintergrund ohne spezifische Anfärbung von pGPX-mRNA.

In der Antisense-Markierung ist das Leberparenchym negativ für pGPX-mRNA. In der Gefäßwand intrahepatischer Gefäße finden sich positive Zellen. In der Gallenblasenwand sind nur in den äußeren Wandschichten einzelne positive Zellen zu erkennen.

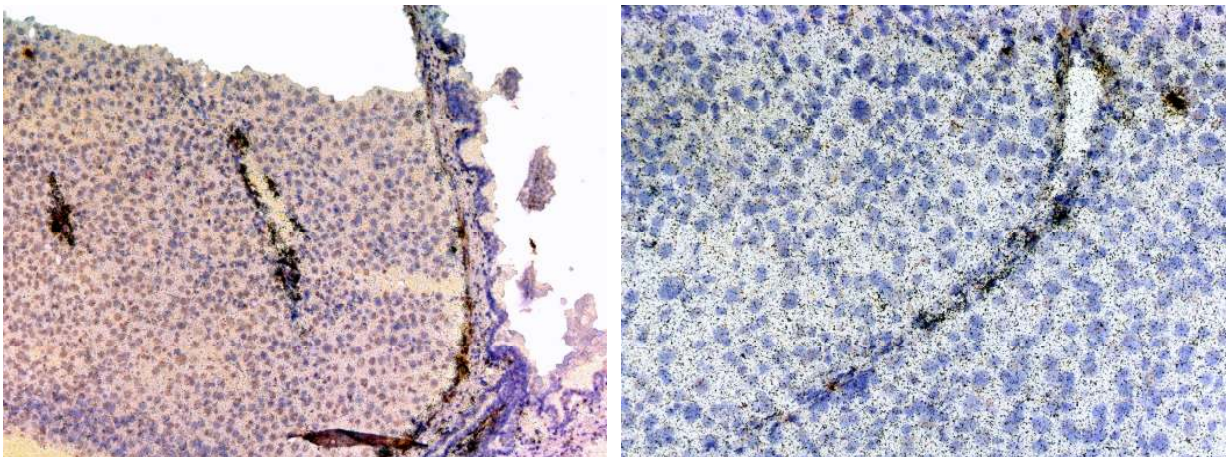


Abbildung 25: ISH Leber pGPX antisense

links: Leber (links), Gallenblase (rechts) (100x, HA-HE, lange Exposition)

rechts: Leber (200x, HA, lange Exposition)

### *Milz:*

In der Sense-Markierung ist deutlicher Hintergrund ohne spezifische Anfärbung erkennbar. Die Photoemulsion des Detektionssystems ist großflächig abgeblättert. Die Gefäßstrukturen sind

## Ergebnisse

positiv. Im Parenchym sind um die Gefäße herum einzelne Zellen positiv angefärbt für pGPX-mRNA (periarterioläre lymphatische Scheide?).

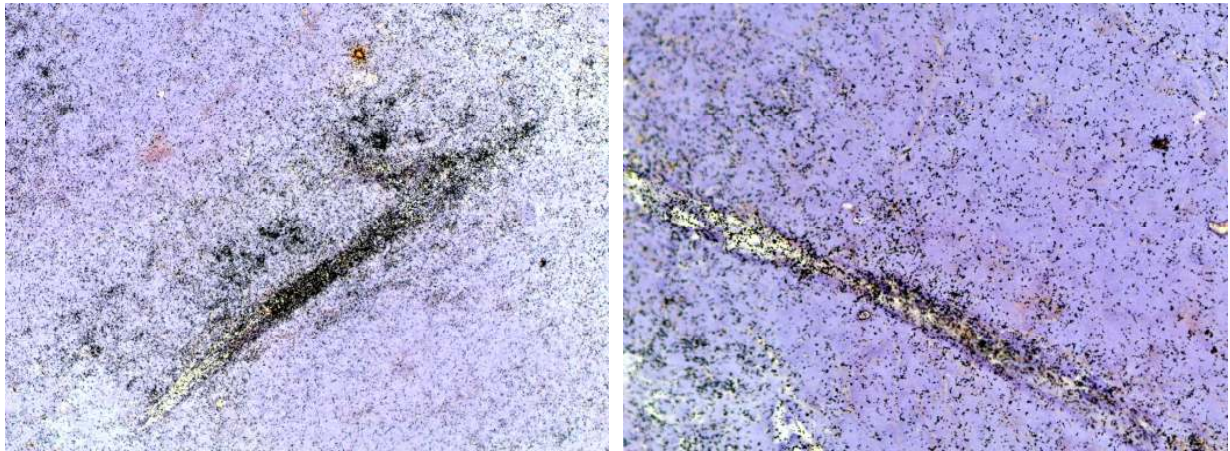


Abbildung 26: ISH Milz pGPX antisense  
links: Milz (200x, HA, lange Exposition)  
rechts: Milz (400x, HA, lange Exposition)

### *Harnblase (Abbildung 27):*

In der Sense-Markierung fokal ein deutlicher Hintergrund. Der Hintergrund des Urothels eher geringer ausgeprägt. Auch in der Antisense-Färbung findet sich ein hoher Hintergrund. Das Urothel bleibt negativ. Einzelne positive Zellen in der Harnblasenwandung.

### *Skelettmuskulatur (Abbildung 28):*

Die Sense-Markierung zeigt einen mäßig ausgeprägten, diffusen Hintergrund ohne spezifische Anfärbung, während in der Antisense-Färbung positiv-gefärbte Gefäße für pGPX-mRNA zu erkennen sind. Einzelne Zellen um die Muskelfaserbündel sind positiv (z.B. Perizyten).

## Ergebnisse

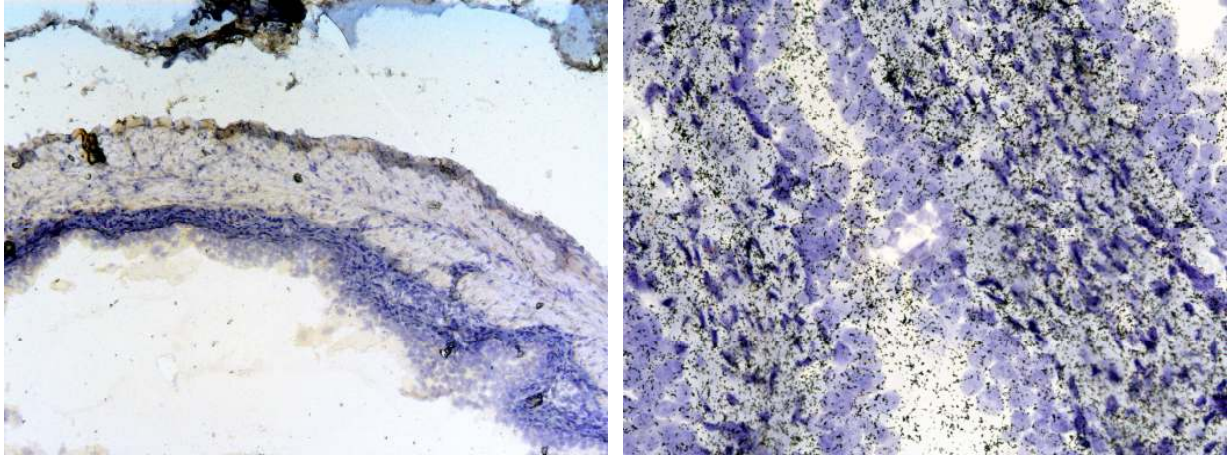


Abbildung 27: ISH Harnblase pGPX antisense  
links: Harnblase (100x, HA, kurze Exposition)  
rechts: Harnblase (400x, HA, lange Exposition)

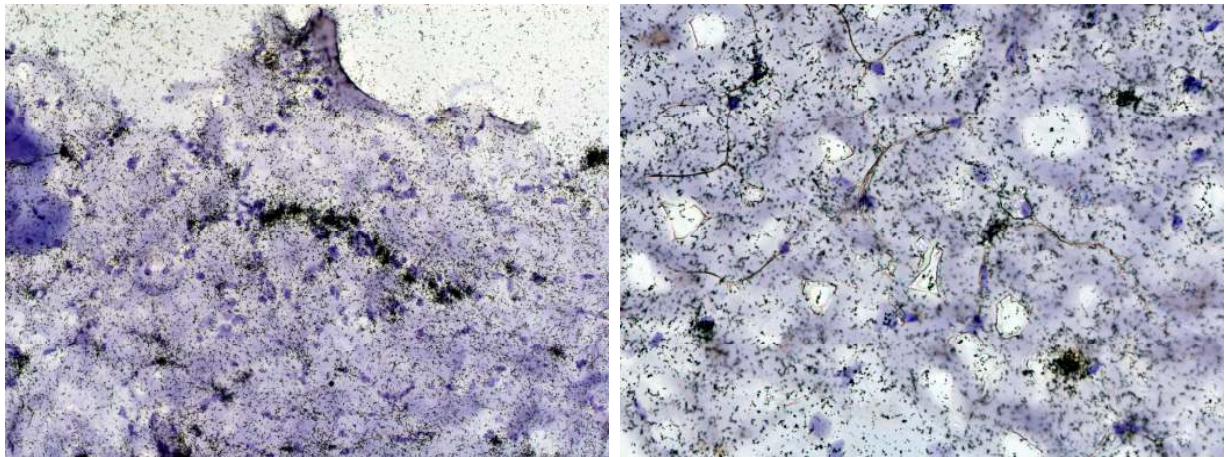


Abbildung 28: ISH Skelettmuskulatur pGPX antisense  
links: Skelettmuskulatur (200x, HA, lange Exposition)  
rechts: Skelettmuskulatur (400x, HA, lange Exposition)

### *Niere:*

Die Sense-Markierung zeigt einen mäßig ausgeprägten, diffusen Hintergrund ohne spezifische Anfärbung. Fokal sind Glomerula mit geringerem Hintergrund erkennbar.

In der Antisense-Färbung sind die Glomerula negativ, während die proximalen Tubuli hingegen deutlich positiv sind. Im Nierenmark zeigt sich wiederum etwa die Hälfte der Tubuli mäßig positiv (vgl. Abbildung 29).

## Ergebnisse

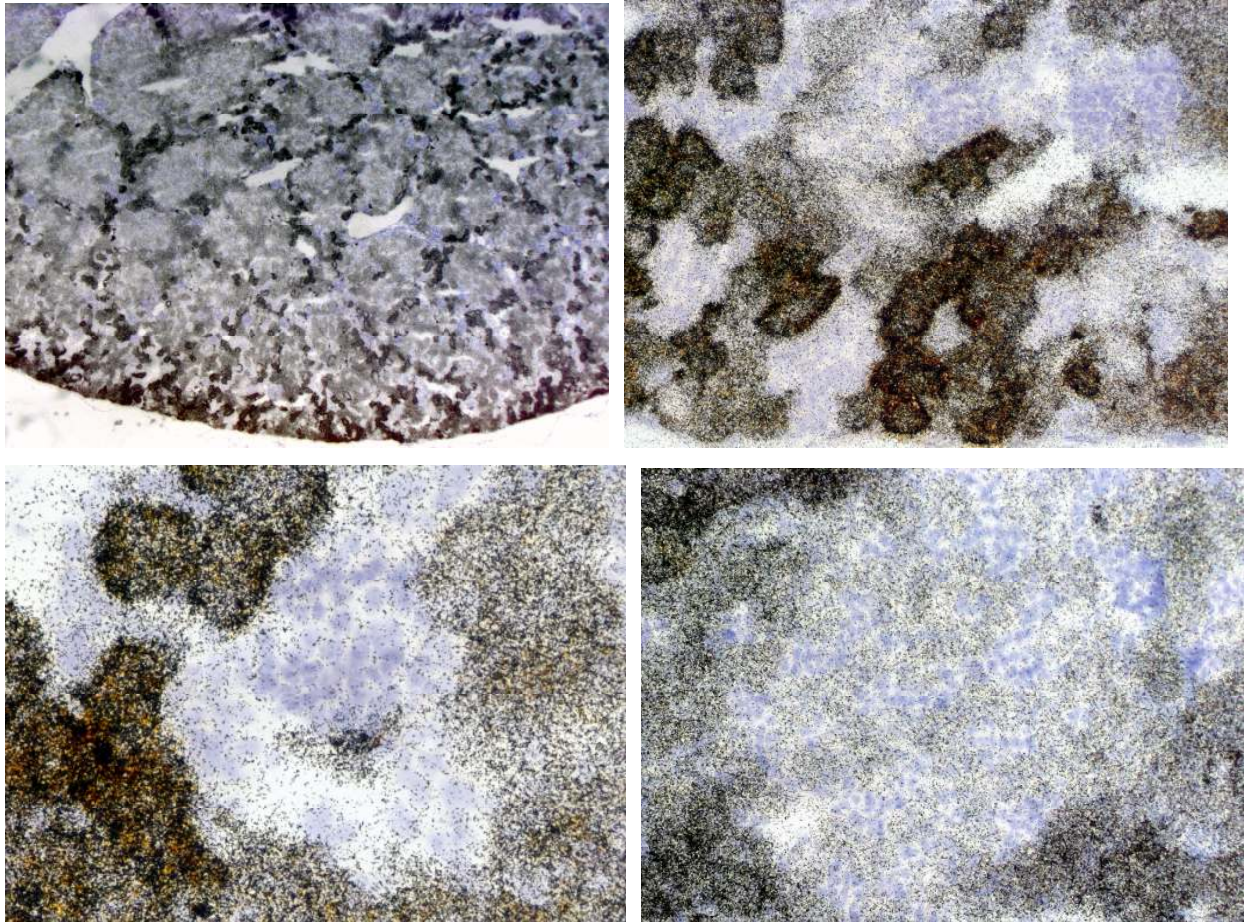


Abbildung 29: ISH Niere pGPX antisense  
links oben: Niere Übersicht (25x, HA, lange Exposition)  
rechts oben: Nierenrinde (200x, HA, lange Exposition)  
links unten: Nierenrinde (400x, HA, lange Exposition)  
rechts unten: Nierenmark (200x, HA, lange Exposition)

### Herz:

In der Sense-Markierung zeigt sich insgesamt nur ein geringer Hintergrund. Stellenweise sind streifenförmige Signale im Myokard erkennbar, die am ehesten Gefäßen entsprechen.

In der Antisense-Färbung ist eine deutliche Anfärbung von pGPX-mRNA im Vorhofmyokard identifizierbar. Im normalen Myokard liegen verstreut, in der langen Belichtung deutlich hervortretende Zellen. Das streifenförmige Muster zieht vom Vorhof in Richtung Spitze (Reizleitungssystem, Gefäße?). Das Endokard ist negativ. Das Perikard zeigt sich in der langen Exposition mäßig positiv. Im miterfassten Bronchus ist das Epithel eher negativ, jedoch kommen subepithelial Zellen angedeutet positiv zur Darstellung (z.B. Myofibroblasten).

## Ergebnisse

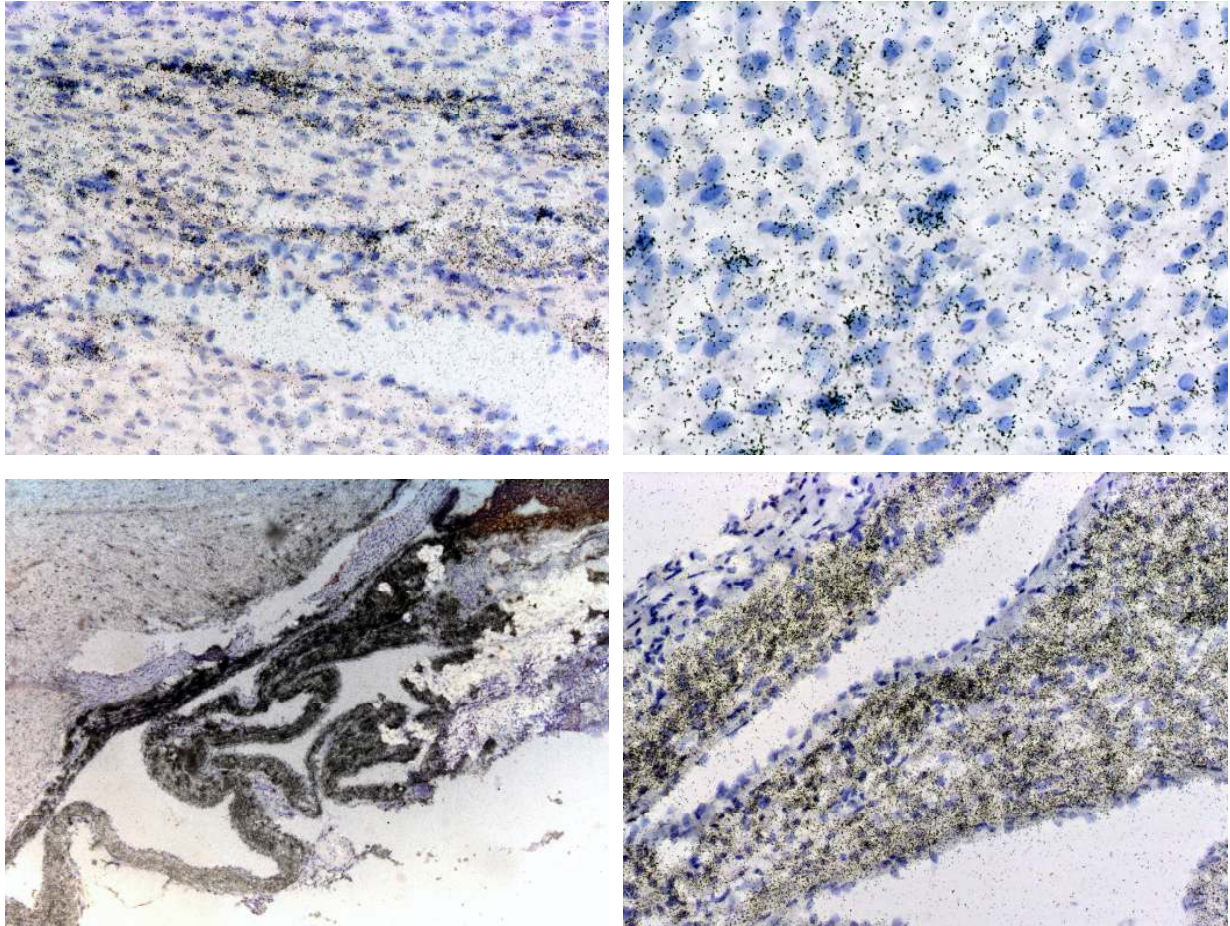


Abbildung 30: ISH Herz pGPX antisense

- links oben: Kammermyokard (200x, HA, lange Exposition)
- rechts oben: Kammermyokard (400x, HA, lange Exposition)
- links unten: Vorhof & Vorhofmyokard (50x, HA, lange Exposition)
- rechts unten: Vorhofmyokard (200x)

### 3.2 Multiple Tissue Expression (MTE) Array

Die Leber zeigt die höchste Expressionsrate der SePP mRNA von allen auf dem Array enthaltenen Gewebeprobe. Die Expressionsrate der Leber wird als 100% definiert und die übrigen Gewebeprobe werden als Prozent der adulten Leberexpression (ALE) aufgetragen. Die Negativkontrollen des MTE-Arrays (Yeast Total RNA, Yeast-tRNA, E.coli-rRNA, E.coli-DNA, Poly-r(A), C<sub>0</sub>t-1-DNA, genomische DNA Kontrollen (100/500 ng)) zeigen alle deutlich Werte unter 1% (maximal 0,6% bei humaner genomischer DNA 500ng).

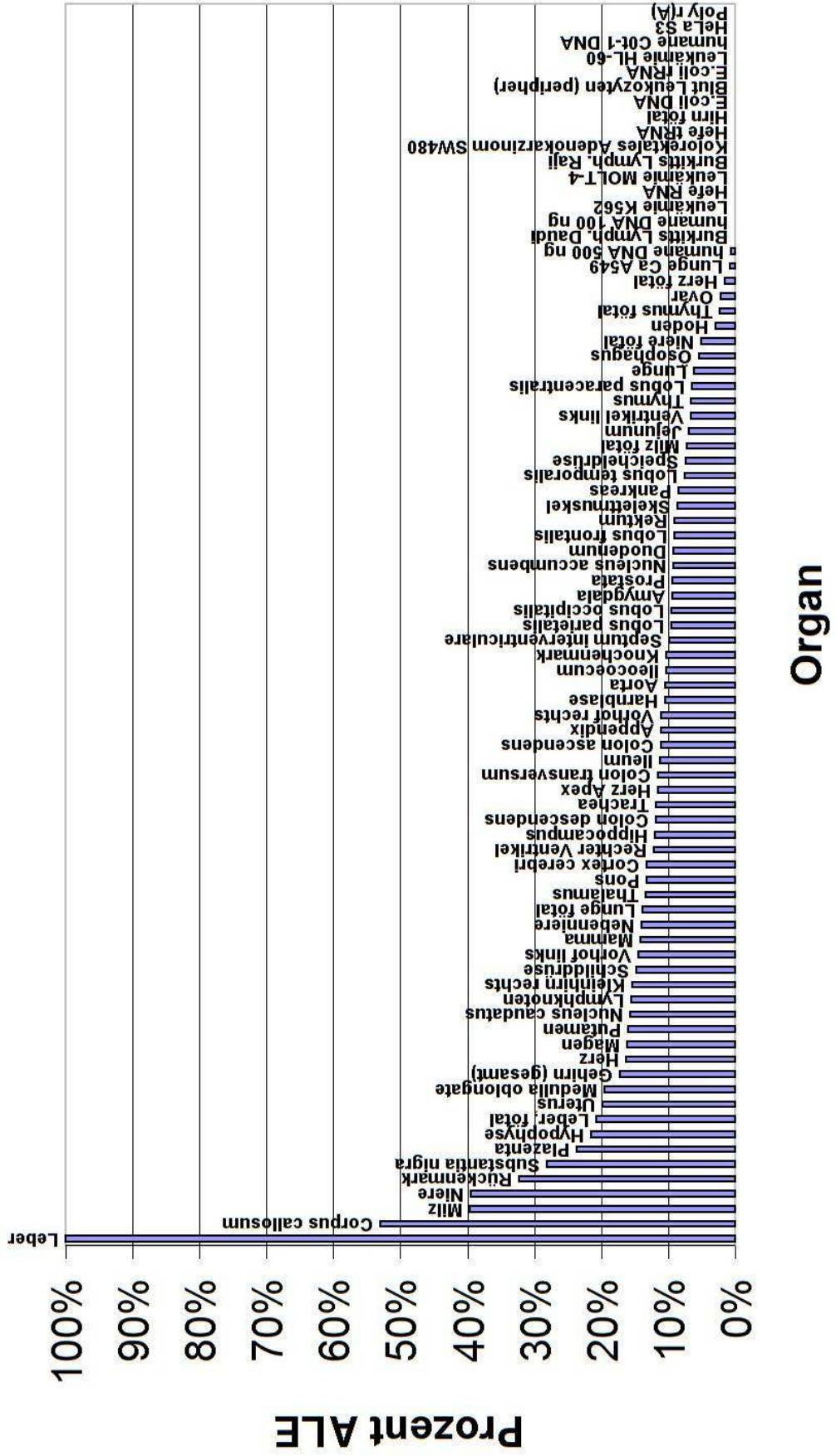
## Ergebnisse

Insgesamt lassen sich 4 Kategorien der Expression unterscheiden (vgl. Abbildung 31):

- Gewebe mit hoher Expression (50-100%):  
In dieser Gruppe findet sich die adulte Leber und das Corpus callosum
- Gewebe mit mittlerer Expression (20-50%), z.B. Niere, Milz, fetale Leber.
- Gewebe mit geringer Expression (5-20%), z.B. Herz, Blase, Colon.
- Gewebe ohne bzw. mit sehr geringer Expression (<5%):  
z.B. Hoden, fetaler Thymus, Ovar, fetales Gehirn

Abbildung 31: Ergebnisse der SePP-mRNA-Hybridisierung des MTE-Arrays in Prozent der adulten Leberexpression (ALE)

# SePP-mRNA Hybridisierung





## Ergebnisse

### 3.2.1 SePP-Expression Gehirn

Die Expression von SePP unterscheidet sich in den einzelnen Hirnabschnitten deutlich (vgl. Tabelle 2). Die meisten Gewebe befinden bezüglich Ihrer SePP-Expression im Bereich der geringen Expression. Das fetale Gehirn hingegen zeigt keine Expression.

Die Expression in den einzelnen Hirnlappen zeigt lediglich eine geringe Streuung (6-10%). Der Cortex cerebralis läßt eine gering höhere Expression als die einzelnen Hirnlappen erkennen.

Im Corpus callosum, Rückenmark und in der Medulla oblongata ist in der Gruppe der zerebralen Gewebe eine im Vergleich zu den übrigen Hirnregionen eine deutlich erhöhte Expression detektierbar.

Tabelle 2: Messergebnisse MTE-Array SePP-Expression im Zentralen Nervensystem in Prozent der adulten Leberexpression in absteigender Reihenfolge (ALE)

<b>Hirnregion</b>	<b>Prozent</b>	<b>Hirnregion</b>	<b>Prozent</b>
Corpus callosum	53	Cortex cerebralis	13
Rückenmark	32	Hippocampus	12
Substantia nigra	28	Lobus parietalis	10
Hypophyse	22	Lobus occipitalis	9
Medulla oblongata	19	Amygdala	9
Gehirn (gesamt)	17	Nucleus accumbens	9
Putamen	16	Lobus frontalis	9
Nucleus caudatus	16	Lobus temporalis	8
Cerebellum rechts	15	Lobus paracentralis	6
Thalamus	13	Hirn fötal	0
Pons	13		

## Ergebnisse

### 3.2.2 SePP-Expression gastrointestinal

Die Expressionsraten im Gastrointestinaltrakt bewegen sich im Bereich der eher geringen Expression (vgl. Tabelle 3). Nur der Magen läßt eine geringfügig höhere Expression im Vergleich zu den übrigen gastrointestinalen Abschnitten erkennen. Die humane Kolonkarzinom-Zell-Linie SW480 (ATCC-Number CCL-228) zeigt keine Expression von SePP.

Tabelle 3: Messergebnisse MTE-Array SePP-Expression im Gastrointestinaltrakt in Prozent der adulten Leberexpression in absteigender Reihenfolge

<b>Organ</b>	<b>Prozent</b>
Magen	16
Colon descendens	12
Colon transversum	12
Ileum	11
Colon ascendens	11
Appendix	11
Iliocoekal	10
Duodenum	9
Rektum	9
Pankreas	8
Speicheldrüse	7
Jejunum	7
Ösophagus	5
Kolorektales Adenokarzinom SW480	0

### 3.2.3 SePP-Expression urogenital

Die Expression von SePP in Niere und Uterus bewegt sich im mittleren Expressionsbereich. Hoden und Ovar zeigen eine eher geringe Expression. Die Expression in der fetalen Niere ist deutlich geringer als in der adulten Niere.

Tabelle 4: Messergebnisse MTE-Array SePP-Expression im Urogenitaltrakt in Prozent der adulten Leberexpression in absteigender Reihenfolge

<b>Organ</b>	<b>Prozent</b>
Niere	39
Uterus	20
Blase	11
Prostata	9
Hoden	3
Fetale Niere	5
Ovar	2

## Ergebnisse

### 3.2.4 SePP-Expression tracheobronchial

Die Organe des Tracheobronchialsystems zeigen eine geringe Expression von SePP. Die fetale Lunge exprimiert SePP im Vergleich zur adulten Lunge mehr als doppelte so stark. Die humane Lungenkarzinom-Zell-Linie A549 (ATCC-Number CCL-185) zeigt eine sehr geringe Expression von SePP.

Tabelle 5: Messergebnisse MTE-Array SePP-Expression im Tracheobronchialsystem in % der ALE

Organ	Prozent
Lunge fötal	14
Trachea	12
Lunge adult	6
Lungenkarzinom Zell-Linie A549	1

### 3.2.5 SePP Expression Herz

Die Expression von SePP im Herzen zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen fetalem und adultem Herzen. Insgesamt ist aber die Expression beim adulten Menschen als gering einzustufen.

Tabelle 6: Messergebnisse MTE-Array SePP-Expression im Herz in % der ALE

Organ	Prozent
Herz adult	16
Linker Vorhof	14
Rechter Ventrikel	12
Herzspitze	12
Rechter Vorhof	11
Septum	10
Linker Ventrikel	7
Herz fetal	1

### 3.2.6 SePP Expression immunologische/hämatologische Organe/Zell-Linien

Die Ergebnisse der SePP-Hybridisierung zeigen eine deutliche Expression von SePP in der Milz. Die übrigen untersuchten lymphatischen Organe (Lymphknoten, Knochenmark, Thymus) weisen eine mittlere Expressionsrate auf. Die Leukämie- bzw. Lymphom-Zell-Linien sowie periphere Blutleukozyten exprimieren kein SePP.

Tabelle 7: Messergebnisse MTE-Array SePP-Expression immunologische/hämatologische Gewebe/Erkrankungen (% ALE)

Organ	Prozent
Milz	40
Lymphknoten	16
Knochenmark	10
Thymus	7
Burkitt Lymphom <sup>1</sup>	0
Leukämie K562 <sup>2</sup>	0
Leukämie Molt-4 <sup>3</sup>	0
Leukozyt Blut periph.	0
Leukämie HL-60 <sup>4</sup>	0

Zell-Linien ATCC-Nr.:

<sup>1</sup> CCL-213, <sup>2</sup> CCL-243, <sup>3</sup> CRL-1582, <sup>4</sup> CCL-240

### 3.2.7 SePP-Expression fetale Organe

Die Expression von SePP in den fetalen Organen erscheint absolut betrachtet, außer in der Lunge, durchgängig niedriger als in den adulten Organen. Insbesondere auffallend ist die niedrige Expression von SePP in der fetalen Leber im Vergleich zur adulten Leber. Die Plazenta nimmt den Spitzenplatz in der SePP-Expression der fetalen Organe ein.

Tabelle 8: Messergebnisse MTE-Array SePP-Expression in fetalen Organen und Plazenta (% ALE)

Organ	Prozent
Plazenta	24
Leber	21
Lunge	14
Milz	7
Niere	5
Thymus	2
Herz	1

### Vergleich Fötal-Adult absolut

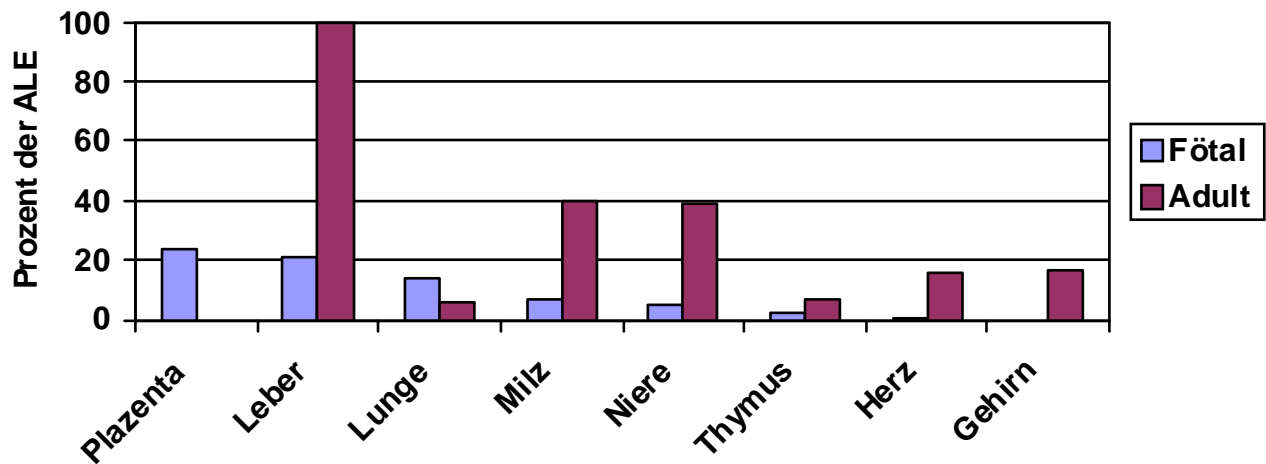


Abbildung 32: Vergleich der Absolutwerte der SePP-Expression fötaler versus adulter Organen auf dem MTE Array.

### Vergleich Fötal-Adult relativ I

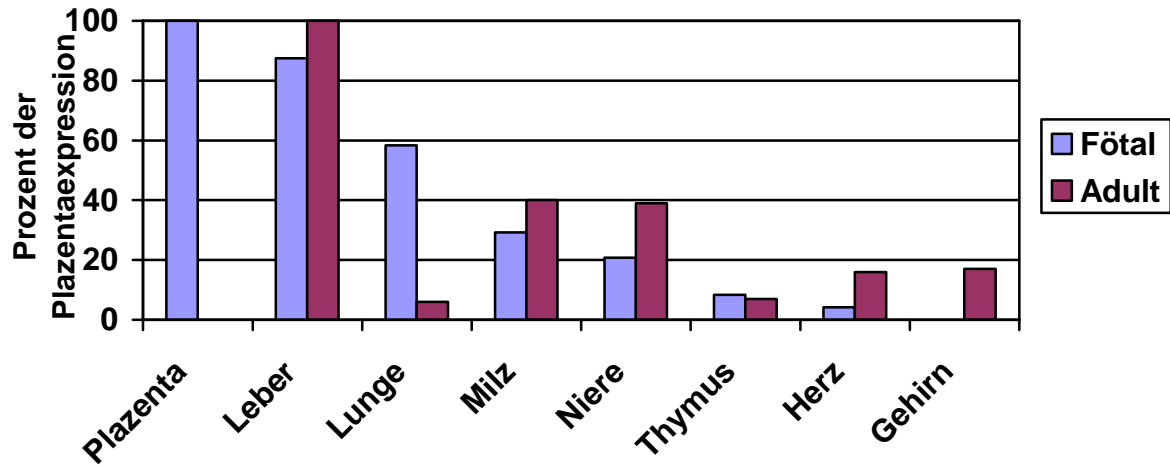


Abbildung 33: Vergleich der SePP mRNA-Expression mit Bezug der fötalen Werte auf die Plazentaexpression

### Vergleich Fötal-Adult relativ II

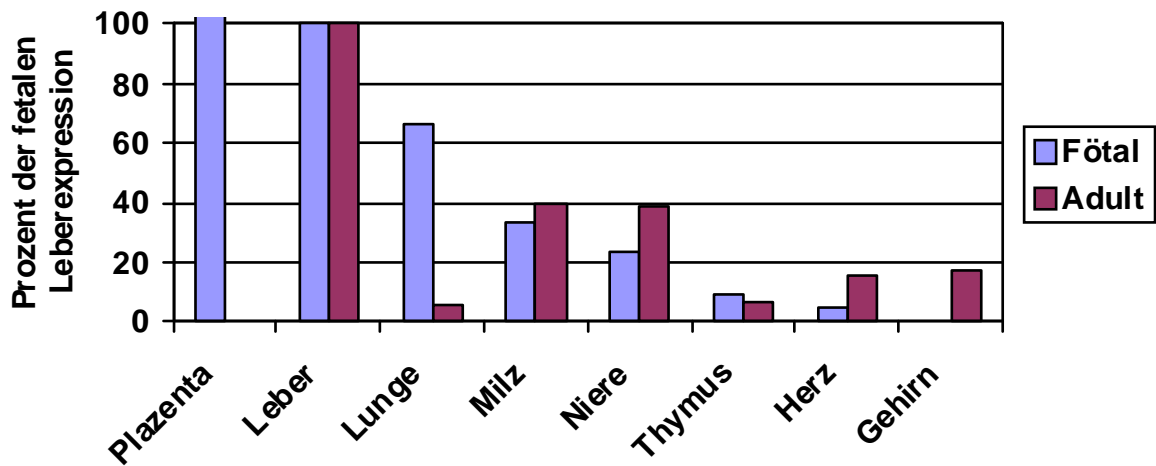


Abbildung 34: Vergleich SePP mRNA-Expression mit Bezug der fötalen Werte auf die fetale Leberexpression

### Vergleich Fötal-Adult relativ III

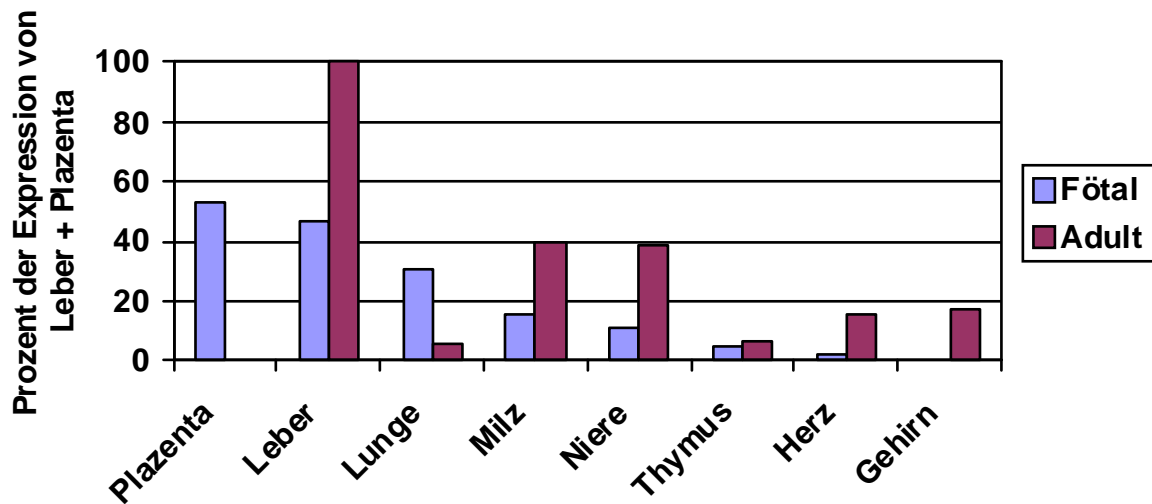


Abbildung 35: Vergleich SePP mRNA-Expression mit Bezug der fötalen Werte auf fetale Expression Leber+Plazenta

In den Abbildungen 32 bis 35 werden unterschiedliche Darstellungen derselben Daten gezeigt, die einen besseren Vergleich der relativen SePP mRNA-Expression in Geweben adulten versus fötalen Ursprungs erlauben. Ungeachtet der relativen Quantifizierung ist hier sehr auffällig, dass besonders die fötale Lunge unverhältnismäßig hohe SePP mRNA Spiegel exprimiert.

#### 3.2.8 SePP-Expression sonstige Organe

Die Schilddrüse zeigt eine mittlere Expression der SePP-mRNA.

Ähnlich hoch wie in der Schilddrüse ist auch die Expression in der Brustdrüse und der Nebenniere.

Die Skelettmuskulatur weist ebenfalls eine mittlere Expression von SePP auf.

Tabelle 9: Messergebnisse MTE-Array SePP-Expression sonstige Organe (% ALE)

Organ	Prozent
Schilddrüse	15
Brustdrüse	14
Nebenniere	14
Skelettmuskel	9

### 3.3 Immunhistochemie

#### 3.3.1 Kontrollen

Zur Austestung der Antikörper-Spezifität und der Spezifität der Färbung selbst wurden unterschiedliche Kontroll-Färbungen durchgeführt.

In den Abbildungen 36a und 36b ist eine Marklamelle des Kleinhirns gezeigt. In Abb. 36a wurde der Antikörper-Verdünnung vor dem Aufbringen auf dem Schnitt 0,1 % humanes Serum hinzugefügt, in 36b wurde dagegen 1% Serum hinzugefügt. Die von der SePP-Serum-Konzentration abhängige Reduktion der Immunfärbung ist deutlich zu erkennen.

Dasselbe gilt für die Abbildung 36 c-e und 36 f/ 37 a-b. In Abbildung 36c/f ist eine normale Färbung mit 0,1 % BSA in der Antikörper-Verdünnung gezeigt. In Abb. 36d/37a wurde wiederum 0,1 % Serum, in der Abb. 36e/37b 1% Serum der Antikörper-Verdünnung hinzugefügt. Auch hier ist deutlich eine Konzentrations-abhängige Reduktion der Immunfärbung zu erkennen.

Abbildung 37c zeigt eine Marklamelle des Kleinhirns mit einer Immunfärbung mit dem Präimmunserum zu Antikörper Ak#207. Die Färbung lässt erkennen, dass keine unspezifische Färbereaktion durch evtl. im Kaninchen-Serum enthaltene Antikörper bzw. Proteine stattgefunden hat. Abbildung 37d zeigt eine Purkinje-Zelle des Kleinhirns mit Immunfärbung mit dem Präimmunserum zu Antikörper Ak#207. Auch hier treten keine unspezifischen Färbungen auf.

In Abbildung 37e zeigt ein Neuron des Nucleus nervi hypoglossi bei Immunfärbung mit dem N-terminalen SePP-Antikörper (SePP2). Die Färbung der Nissl-Schollen bzw. des endoplasmatischen Retikulums ist deutlich zu erkennen. Im Vergleich zeigt Abbildung 37f ein Neuron desselben Kerngebietes in der Nissl-Färbung, welches ebenfalls ein angefärbtes rauhes endoplasmatisches Retikulum aufweist.

Insgesamt wurden 4 Antikörper und 1 Präimmunserum ausgetestet. Das Präimmunserum zeigt in allen Färbungen keine Reaktion. Alle vier Antikörper dagegen weisen, bei jedoch unterschiedlichen Hintergrundfärbungen, prinzipiell dasselbe Färbemuster auf.

## Ergebnisse

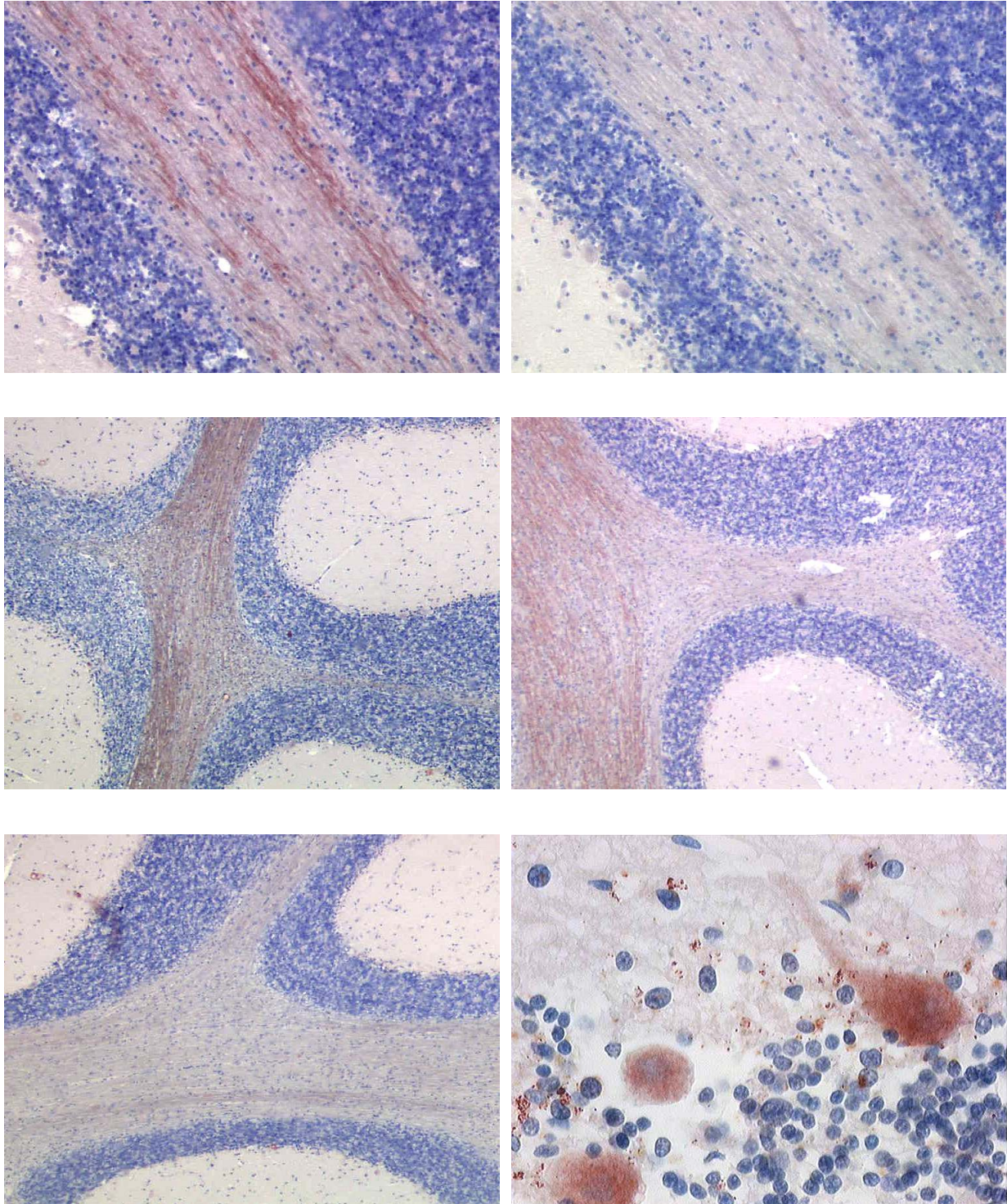


Abbildung 36: Kontroll-Färbungen:

- oben links (a): Marklamelle Kleinhirn (SePP5 + 0,1% Serum)
- oben rechts (b): Marklamelle Kleinhirn (SePP5 + 1% Serum)
- Mitte links (c): Marklamelle Kleinhirn (SePP5)
- Mitte rechts (d): Marklamelle Kleinhirn (SePP5 + 0,1% Serum)
- unten links (e): Marklamelle Kleinhirn (SePP5 + 1% Serum)
- unten rechts (f): Purkinje-Zelle Kleinhirn (SePP5)



## Ergebnisse

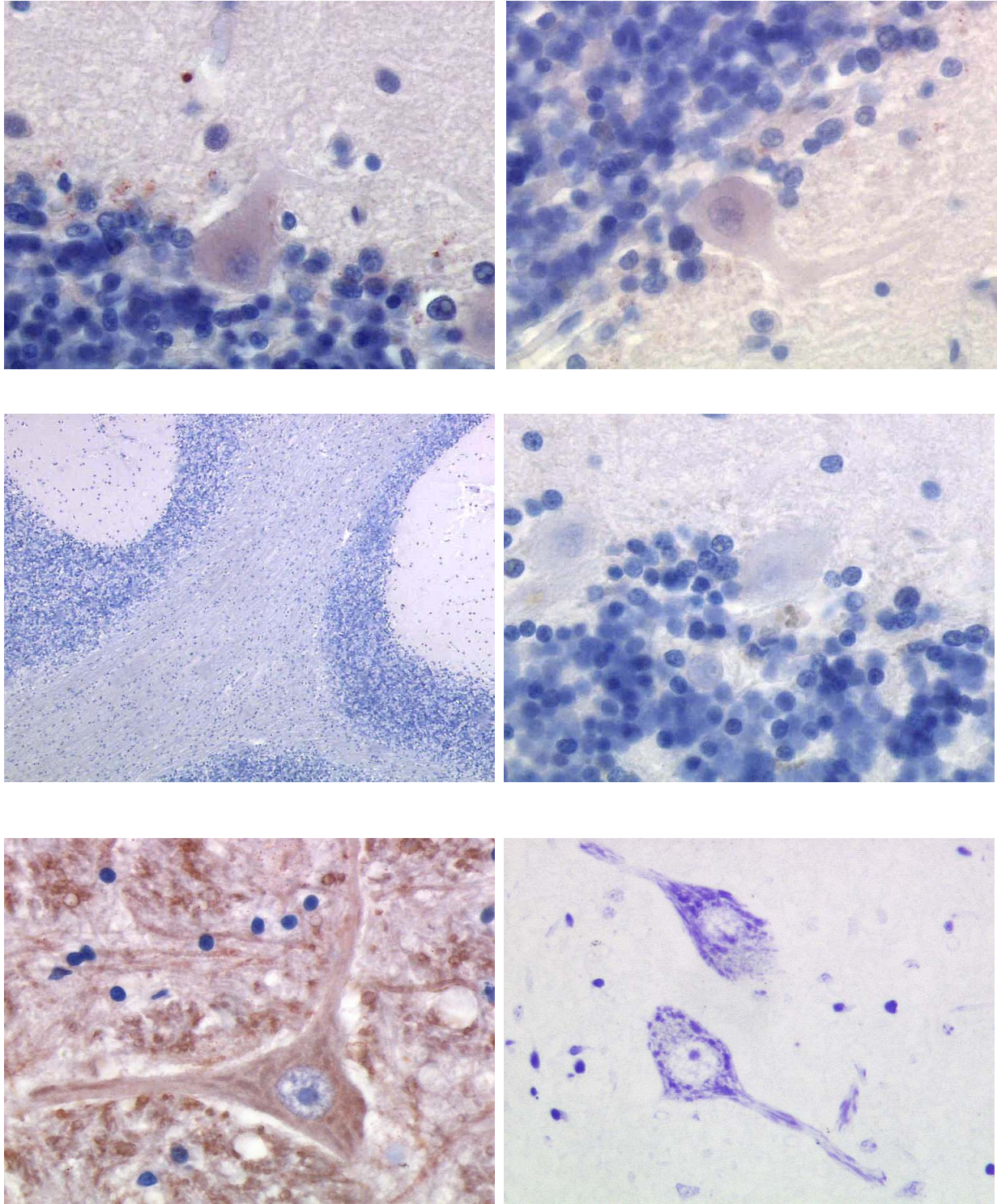


Abbildung 37: Kontroll-Färbungen

- oben links (a): Purkinje-Zelle Kleinhirn (SePP5 + 0,1% Serum)
- oben rechts (b): Purkinje-Zelle Kleinhirn (SePP5 + 1% Serum)
- Mitte links (c): Kleinhirn Marklamelle (Präimmunserum Ak#207)
- Mitte rechts (d): Purkinje-Zelle Kleinhirn (Präimmunserum Ak#207)
- unten links (e): Nucleus Nervi hypoglossi (SePP2)
- unten rechts (f): Nucleus Nervi-hypoglossi (Nissl-Färbung)

### 3.3.2 Immunhistochemie humanes Gehirn (adult)

Die SePP-Immunfärbungen des Gehirns markieren viele, über das gesamte Gehirn und das Rückenmark verteilt liegende, im Folgenden näher beschriebene Neurone positiv. Die Färbung der Neurone stellt sich überwiegend feingranulär zytoplasmatisch dar. Einige Neurone zeigen zur feingranulären Färbung eine grobschollig imponierende, wahrscheinlich perinukleär gelegene Anfärbung. Eine ähnliche grobschollige Anfärbung findet sich auch in einigen Astrozyten. Oligodendrozyten sowie Zellen der Mikroglia zeigen insgesamt keine positive Anfärbung in der SePP-Immunfärbung. Die Ependymzellen der Ventrikelauskleidungen sowie insbesondere die Ependymzellen, die den Plexus choroideus überkleiden, färben sich positiv. Die pialen sowie die intraparenchymatösen kleineren Gefäße zeigen zum Teil eine bandförmige Anfärbung im Bereich der Tunica media. Des Weiteren weisen Nervenbahnen im Bereich der Nervenscheiden zum Teil eine deutliche SePP-Positivität auf. Bei größeren Nervenbahnen sind nicht alle Markscheiden positiv. Insbesondere im Rückenmark zeigen die langen Bahnsysteme eine deutliche Positivität.

#### *Neocortex-Areale*

Untersucht wurden folgende Abschnitte des Cortex cerebri (vgl. Abbildung 38):

- Gyrus frontalis medius
- Gyrus temporalis superior et medius
- Gyrus supramarginalis
- Gyrus cinguli

Die Lamina 1 (Lamina molecularis) stellt sich überwiegend SePP-negativ dar. Vereinzelt, fokal auch vermehrt, finden sich Astrozyten mit dem typischen, zuvor beschriebenen, intrazytoplasmatischen, grobscholligen Färbemuster.

Die Lamina 2 (Lamina granularis externa) zeigt den typischen Besatz an kleinen Neuronen. Die Neuronen weisen überwiegend eine leichte positive, zum Teil auch deutlich positive Anfärbung auf. Vereinzelt zeigen Astrozyten die typische granuläre Anfärbung.

In der Lamina 3 (Lamina pyramidalis externa) läßt sich der typische Besatz an großen Pyramidenzellen sowie kleineren Neuronen identifizieren. Die Pyramidenzellen stellen sich überwiegend deutlich positiv dar. Die kleineren Neurone zeigen zum Teil eine leichte positive Färbung. Vereinzelt weisen die Astrozyten die typische granuläre Anfärbung auf.

Die Lamina 4 (Lamina granularis interna) läßt den typischen Besatz an kleinen Pyramidenzellen erkennen. Diese sind zum Teil deutlich positiv gefärbt. Die Positivität der Neuronen scheint

Ergebnisse

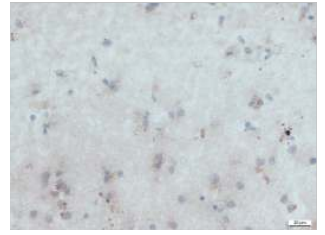
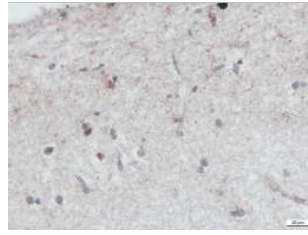
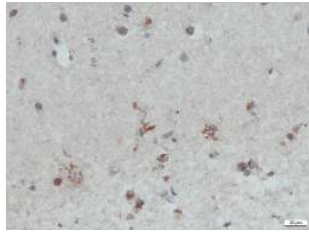
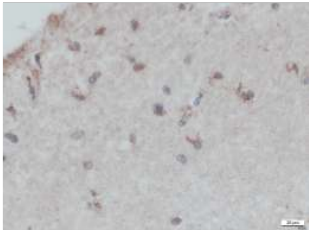
Gyrus frontalis medius

Gyrus temporalis sup.

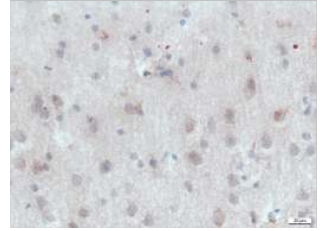
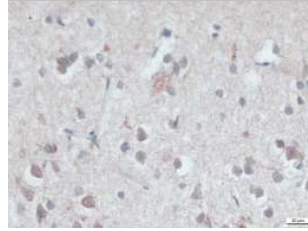
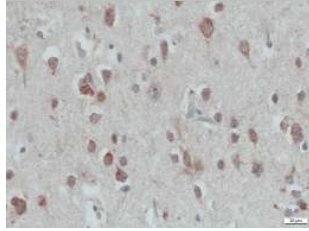
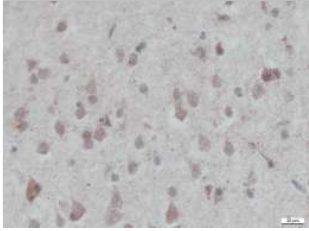
Gyrus supramarginalis

Gyrus cinguli

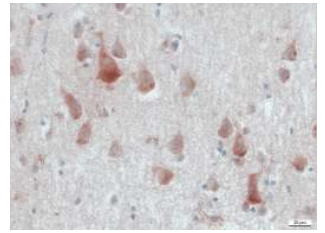
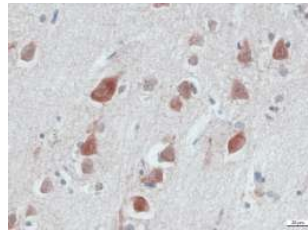
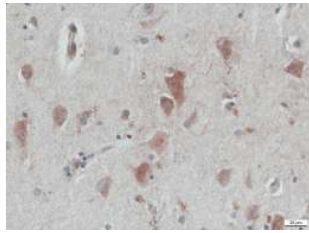
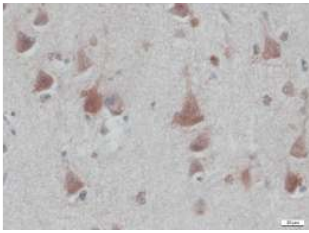
I



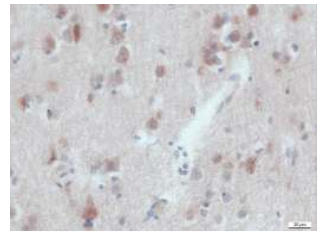
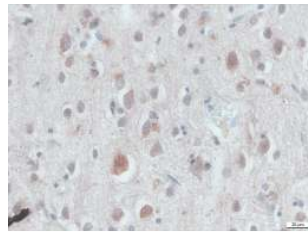
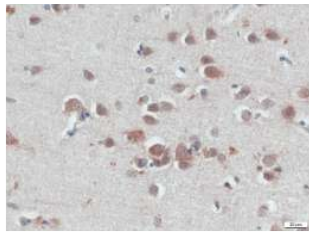
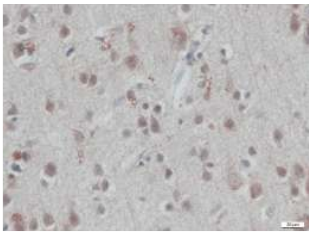
II



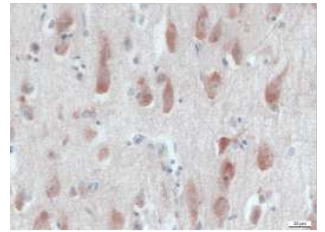
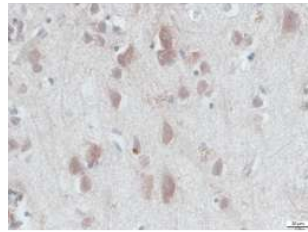
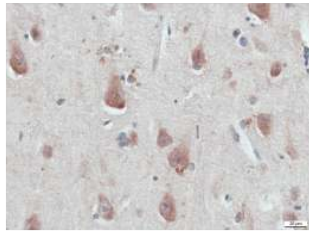
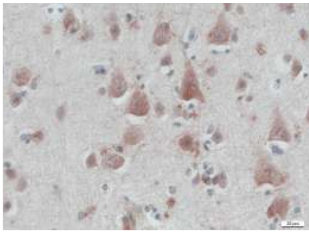
III



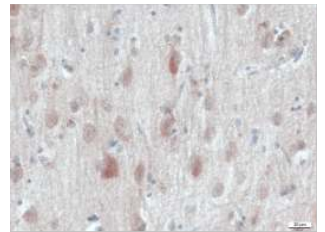
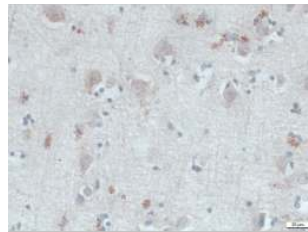
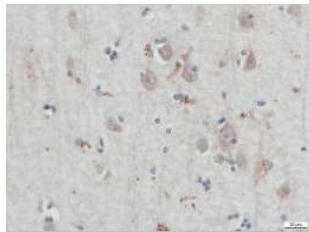
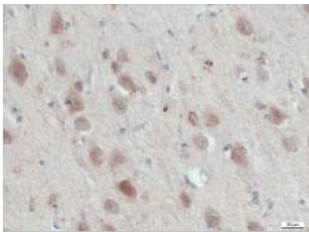
IV



V



VI



M

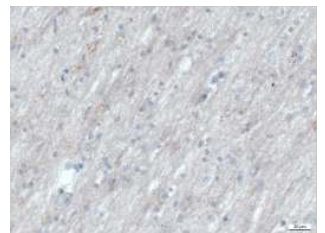
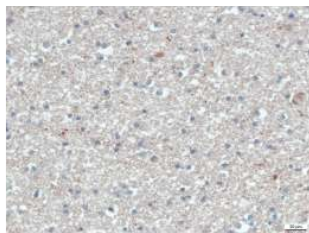
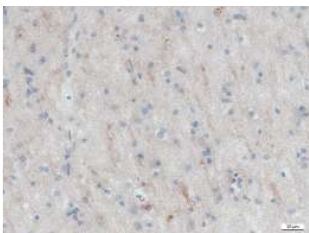


Abbildung 38: Übersicht der untersuchten Kortextareale (I-VI = Cortex Lamina I-VI, M = Marklager, ca. 200x)

## Ergebnisse

zwischen den unterschiedlichen Cortex-Arealen nur mäßig zu schwanken. Vereinzelt zeigen Astrozyten die typische granuläre Anfärbung.

Die Lamina 5 (Lamina pyramidalis externa) enthält den typischen Besatz an unterschiedlich großen Pyramidenzellen. Ein großer Teil der Pyramidenzellen zeigt eine deutlich positive Färbung. Vereinzelt kann bei Astrozyten die typische Anfärbung identifiziert werden.

Die Lamina 6 (Lamina multiformis) läßt einen typischen Besatz an unterschiedlich großen Pyramidenzellen und Nicht-Pyramidenzellen erkennen. Die Pyramidenzellen zeigen eine überwiegend geringe bis mäßiggradige Anfärbung. Kleinere Neuronen stellen sich zum Teil negativ dar. Vereinzelt sind positive Astrozyten zu identifizieren.

Die Nervenscheiden im Marklager zeigen überwiegend eine äußerst geringe Anfärbung. Einzelne Nervenscheiden scheinen jedoch deutlich positiv.

In sämtlichen Laminae kommen in der SePP-Immunfärbung keine tangential verlaufenden Faserplexus (z.B. Exner-Streifen) zur Darstellung. Auch die Radiärfaserbündel treten nicht auffällig hervor.

### *Area striata/parastriata/peristriata*

Die Färbungen aus der Area peri- bzw. parastriata entsprechen den bereits oben beschriebenen Verteilungen der anderen kortikalen Regionen. In der Area striata stellt sich der Gennari-Streifen SePP-negativ dar. Die im Bereich des Gennari-Streifen gelegenen Meynert-Riesenneurone zeigen sich teilweise deutlich positiv. Die Neurone der übrigen Zellschichten erscheinen im Vergleich zu den übrigen Cortexschichten insgesamt geringer positiv. Das Marklager selbst ist gering SePP-positiv.

### *Hippocampus/Subiculum/Area entorhinalis*

Im Hippocampus finden sich keine SePP-positive Neuronen im Bereich der plexiformen und der molekularen Schichten. Die Neurone der Granularzellschicht des CA1- und des CA2-Abschnitts des Hippocampus zeigen insgesamt eine mäßige Positivität (vgl. Abbildung 39). Im CA3-Abschnitt kommen in der Granularzellschicht einzelne mäßig positive Neurone zur Darstellung, überwiegend jedoch erscheinen die Neurone gering positiv. Die Neurone der Granularzellschicht des CA4-Abschnitts erscheinen gering bis mäßig positiv. Die Körnerzellen des Gyrus dentatus weisen eine geringe bis sehr geringe Anfärbung auf. Fasern des Alveus hippocampi sind teils deutlich positiv, teils negativ angefärbt. Die Neurone des Subiculums erscheinen gering bis mäßig positiv.

Die Pyramidenzellen der Area entorhinalis färben sich zu einem großen Teil mäßig bis deutlich positiv. Kleinere Neurone zeigen sich hingegen negativ bis gering SePP-positiv.

## Ergebnisse

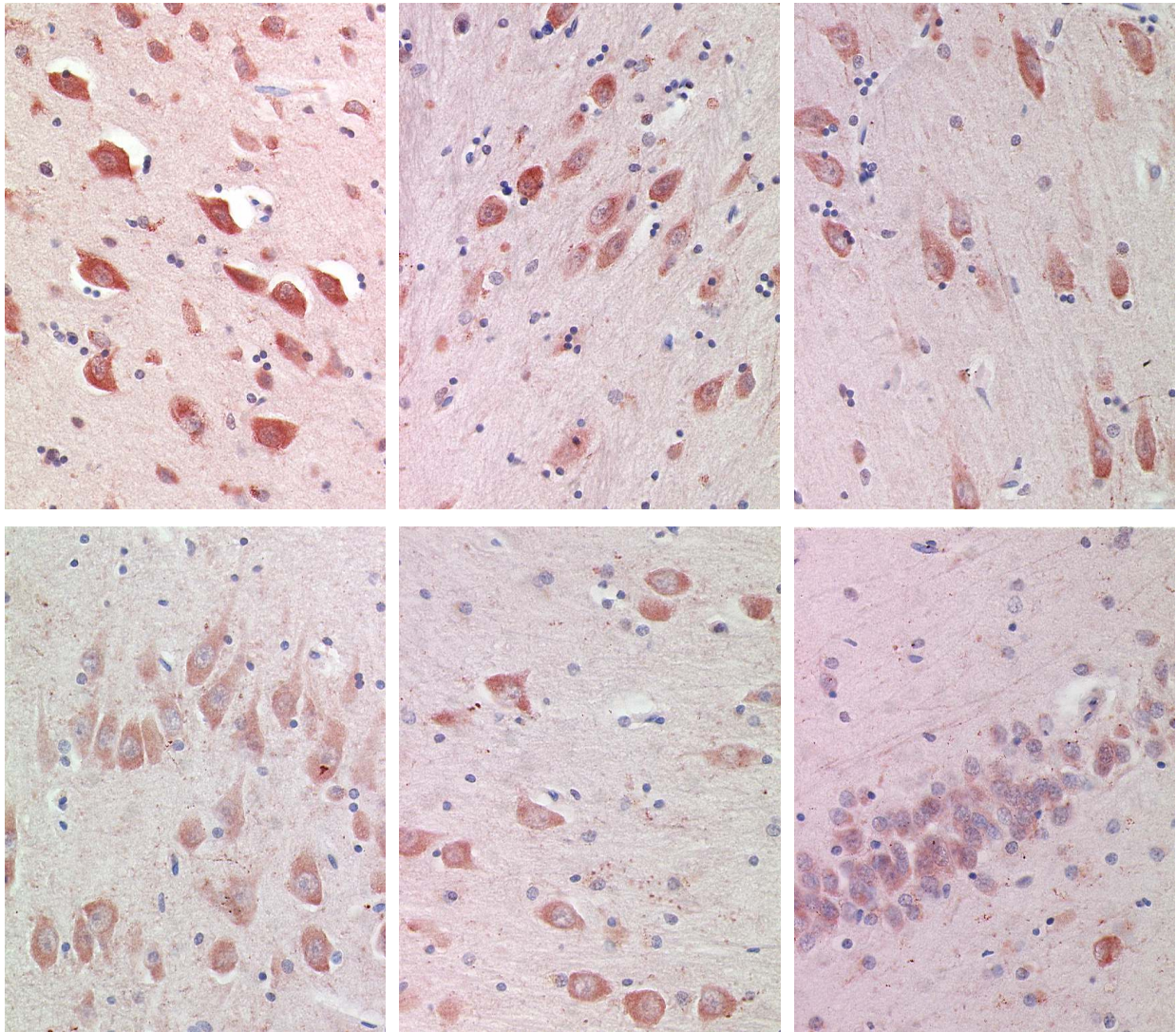


Abbildung 39: Immunhistochemie SePP Hippocampus  
links oben: Area entorhinalis Neuronen (ca. 400x)  
Mitte oben: Subiculum Neuronen (ca. 400x)  
rechts oben: CA1 Neuronen (ca. 400x)  
links unten: CA2 Neuronen (ca. 400x)  
Mitte unten: CA4 Neuronen (ca. 400x)  
rechts unten: Nucleus dentatus Körnerzellen (ca. 400x)

### *Amygdala*

Die Neurone in den einzelnen Kerngebieten der Amygdala zeigen überwiegend eine mäßiggradige Färbeintensität.

### *Basalganglien*

Die Neurone des Nucleus caudatus zeigen teils keine, teils eine geringe bis mäßiggradige SePP-Anfärbung. Die Neurone des Putamens und des Globus pallidus weisen überwiegend keine bis

## Ergebnisse

sehr geringe Anfärbung auf. Die Neurone der Substantia nigra (Pars compacta et reticularis) und des Nucleus subthalamicus zeigen eine sehr geringe bis geringe SePP-Positivität.

### *Nucleus ruber*

Die Neuronen des Nucleus ruber zeigen überwiegend keine, bis allenfalls geringe Anfärbung.

### *Thalamus*

Die Neuronen der einzelnen Kerngebiete des Thalamus färben sich in den einzelnen Kernen zum Teil deutlich positiv, zum Teil gering und zum Teil negativ.

### *Hirnstamm*

Der Locus coeruleus zeigt Neurone mit einer Färbeintensität von negativ bis mäßiggradig.

Die Neurone des Nucleus olivaris inferior/olivaris accessorius medialis et dorsalis zeigen eine deutliche SePP-Anfärbung. Kleinere Neurone erscheinen nur gering gefärbt. Der Nucleus nervi hypoglossi zeigt eine deutliche bis sehr deutliche Immunfärbung.

Eine mäßiggradige Färbung weisen folgende Kerne auf:

Nucleus solitarius, Nucleus dorsalis nervi vagi, Nucleus vestibularis inferior, Nucleus lateralis, Nucleus reticularis tegmenti pontis, Nuclei pontis.

Der Nucleus parabrachialis medialis und der Nucleus cuneatus zeigen eine eher geringe Färbeintensität. Der Nucleus mesencephalicus nervi trigemini und der Nucleus gracilis enthalten zum einen negativ-gefärbte, zum anderen mäßig-positiv-gefärbte Neuronenpopulation. Der Nucleus intercalatus zeigt sowohl Neurone mit sehr geringer als auch Neurone mit mäßiger Färbung.

### *Cerebellum*

Im Cerebellum kommen die Purkinje-Zellen mäßig bis deutlich positiv zur Darstellung (vgl. Abbildung 40). In der Molekularzellschicht sind vor allem einzelne positive Astrozyten zu identifizieren. In der Molekularzellschicht kommen keine Neurone zur Darstellung. Auf Höhe der Purkinje-Zellen finden sich am Übergang vom Stratum moleculare zum Stratum granulosum einzelne körnige positive Anfärbungen. Diese könnten der Bergmann-Glia zuzuordnen sein. Die Neurone des Stratum granulosum erscheinen nicht bis sehr gering positiv. Die Faserbahnen im Kleinhirn-Marklager stellen sich überwiegend gering bis mäßig positiv dar. Die Neurone des

## Ergebnisse

Nucleus dentatus sind überwiegend nicht oder nur sehr gering positiv.

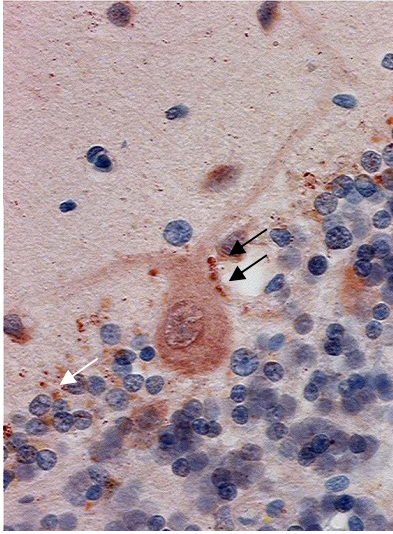


Abbildung 40 Immunhistochemie SePP Kleinhirn mit Stratum moleculare, Purkinje-Zellen und Körnerzellen  
Schwarze Pfeile: Granuläre Positivität am Zellkörper der Purkinje-Zelle  
Weiße Pfeile: Granuläre Positivität der Bergmann-Glia

### *Rückenmark*

Neurone des Nucleus ventrolateralis, des Nucleus proprius und des Nucleus dorsomarginalis färben sich teils mäßig, teils deutlich, teils gering. Eine mäßiggradige Immunfärbung weisen der Nucleus intermediolateralis, der Nucleus ventromedialis und der Nucleus thoracicus auf. Eine mäßiggradige bis negative Färbung ist bei den Neuronen des Nucleus dorsalis detektierbar. Die Neurone der Substantia gelatinosa sind gering bis nicht gefärbt. Fokal zeigen Neurone eine granuläre Positivität im Bereich des Zellkörpers (vgl. Abbildung 41).

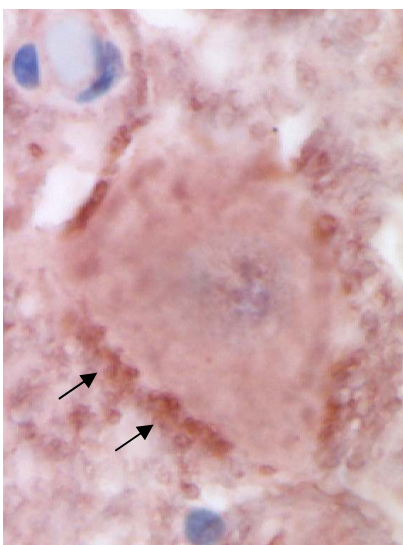


Abbildung 41: Neuron der Substantia intermedia (ca. 800x, schwarze Pfeile zeigen granuläre Positivität)

## Ergebnisse

### *Bahnssysteme*

Die Capsula interna enthält Axone mit Nervenscheiden aller 5 Färbeintensitäten, wobei die Färbeintensität mit der Dicke der Nervenscheide zu korrelieren scheint. Die Capsula externa zeigt Nervenscheiden mit negativer bis geringer Färbung. Das Corpus callosum weist überwiegend eine geringe bis mäßiggradige Färbeintensität auf. Die Nervenscheiden der Commissura alba stellen sich überwiegend positiv bzw. deutlich positiv dar. Der Tractus opticus enthält teils negative, teils mäßig positive Nervenscheiden.

Die Lemnisci laterales et mediales und die Pedunculi cerebellares zeigen Nervenscheiden mit allen 5 Färbeintensitäten. Anschnitte des Nervus hypoglossus im Verlauf durch den Hirnstamm zeigen eine deutlich positive Anfärbung. Anschnitte des Tractus mesencephalicus nervi trigemini lassen teils (deutlich) positive, teils mäßig positive, teils negative Nervenscheiden erkennen. Eine gemischte (negativ, mäßiggradig und deutlich) Anfärbung zeigen folgende Bahnssysteme: Fasciculus cuneatus, Fasciculus gracilis, Fasciculus longitudinalis medialis, Fasciculus anterolateralis, Tractus pyramidalis und Tractus spinocerebellaris anterior et posterior. Spinalnerven (Radix anterior et posterior) weisen teils keine, teils eine mäßiggradige Anfärbung auf.

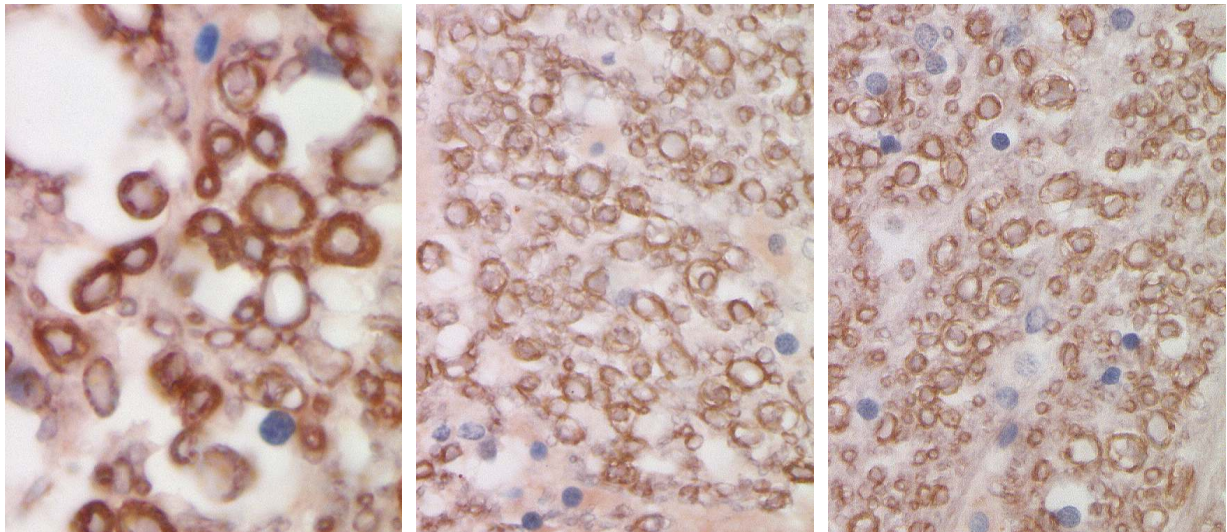


Abbildung 42: Leitungsbahnen Rückenmark

links: Tractus spinocerebellaris anterior (ca. 800x)

Mitte: Tractus pyramidalis anterior (ca. 400x)

rechts: Fasciculus longitudinalis medialis (ca. 400x)



## Ergebnisse

### 3.3.3 Immunhistochemie humanes Gehirn (Frühgeborenes)

Prinzipiell zeigt das Immunfärbemuster eine ähnliche Verteilung wie im adulten Gehirn. Insgesamt scheinen die Neurone deutlich positiver gefärbt, während die Markscheiden eher geringer positiv sind. In den neokortikalen Arealen finden sich im Neuropil teils strangartige granuläre Signale, ohne die Möglichkeit diese Positivität bestimmten Neuronen oder anderen Zellen zuordnen zu können. Ähnliche granuläre, jedoch längerstreckige Anfärbungen sind in der Area entorhinalis zu erkennen. Im Vergleich zu den übrigen Kortex-Arealen erscheinen diese Strukturen jedoch länger und verlaufen vor allem im Marklager mit Orientierung in Richtung Hirnoberfläche. Ähnliche Anfärbemuster finden sich im Kleinhirn im Bereich des Stratum moleculare. Hier scheinen diese Formationen eher kurzstreckig, jedoch könnte ein gewisser Bezug zum Dendritenbaum der Purkinje-Zellen bestehen. Um zufällige Artefakte auszuschließen, wurden Schnittpräparate erneut gefärbt. Auch hier finden sich die vorbeschriebenen Formationen.

Die Bahnsysteme sind ähnlich wie beim adulten Gehirn gefärbt, jedoch scheinen bei großer Vergrößerung eher (noch) wenige Nervenscheiden deutlich SePP-positiv. Auch die Capsula interna kann eher als noch gering positiv gefärbt eingeordnet werden.

Insgesamt ist die Auswertung der einzelnen Hirnareale schwieriger als beim adulten Gehirn, da die Kerngebiete auf den Schnittpräparaten weniger definiert erscheinen, so dass die Lokalisation kleinerer und auch mancher größerer Kerngebiete v.a. im Bereich des Hirnstammes, aber auch im Bereich der Basalganglien, nicht sicher gelingt.

#### *Neocortex-Areale (Frühgeborenes)*

Untersucht wurden folgende Abschnitte des Cortex cerebri:

Gyri frontales, Temporallappen, Parietallappen.

Die Färbungen der einzelnen Regionen unterscheiden sich nur gering.

Die Lamina 1 (Lamina molecularis) stellt sich überwiegend SePP-negativ dar. Vereinzelt, fokal auch vermehrt, finden sich Astrozyten mit dem typischen, zuvor beschriebenen, intrazytoplasmatischen, grobscholligen Färbemuster.

Die Lamina 2 (Lamina granularis externa) zeigt den typischen Besatz an kleinen Neuronen. Die Neurone weisen überwiegend eine negative bis leicht positive SePP-Anfärbung auf. Vereinzelt zeigen Astrozyten die typische Positivität.

Die Lamina 3 (Lamina pyramidalis externa) lässt den typischen Besatz an großen Pyramidenzellen sowie kleineren Neuronen erkennen. Die Pyramidenzellen stellen sich überwiegend deutlich positiv dar. Die kleineren Neurone zeigen zum Teil eine leichte positive Färbung. Vereinzelt weisen Astrozyten die typische Anfärbung auf.

## Ergebnisse

Die Lamina 4 (Lamina granularis interna) läßt den typischen Besatz aus kleinen Pyramidenzellen erkennen. Diese sind überwiegend gering, wenige auch mäßiggradig SePP-positiv gefärbt.

Die Lamina 5 (Lamina pyramidalis externa) enthält mäßig bis deutlich positiv gefärbte Pyramidenzellen.

Die Lamina 6 (Lamina multiformis) läßt einen typischen Besatz aus unterschiedlich großen Pyramidenzellen und Nicht-Pyramidenzellen erkennen. Die Pyramidenzellen zeigen z.T. eine deutliche Anfärbung. Kleinere Neurone sind zum Teil negativ.

Die Nervenscheiden im Marklager zeigen überwiegend eine äußerst geringe Anfärbung.

In sämtlichen Laminae kommen in der SePP-Immunfärbung keine tangential verlaufenden Faserplexus (z.B. Exner-Streifen) zur Darstellung. Auch die Radiärfaserbündel treten nicht auffällig hervor.

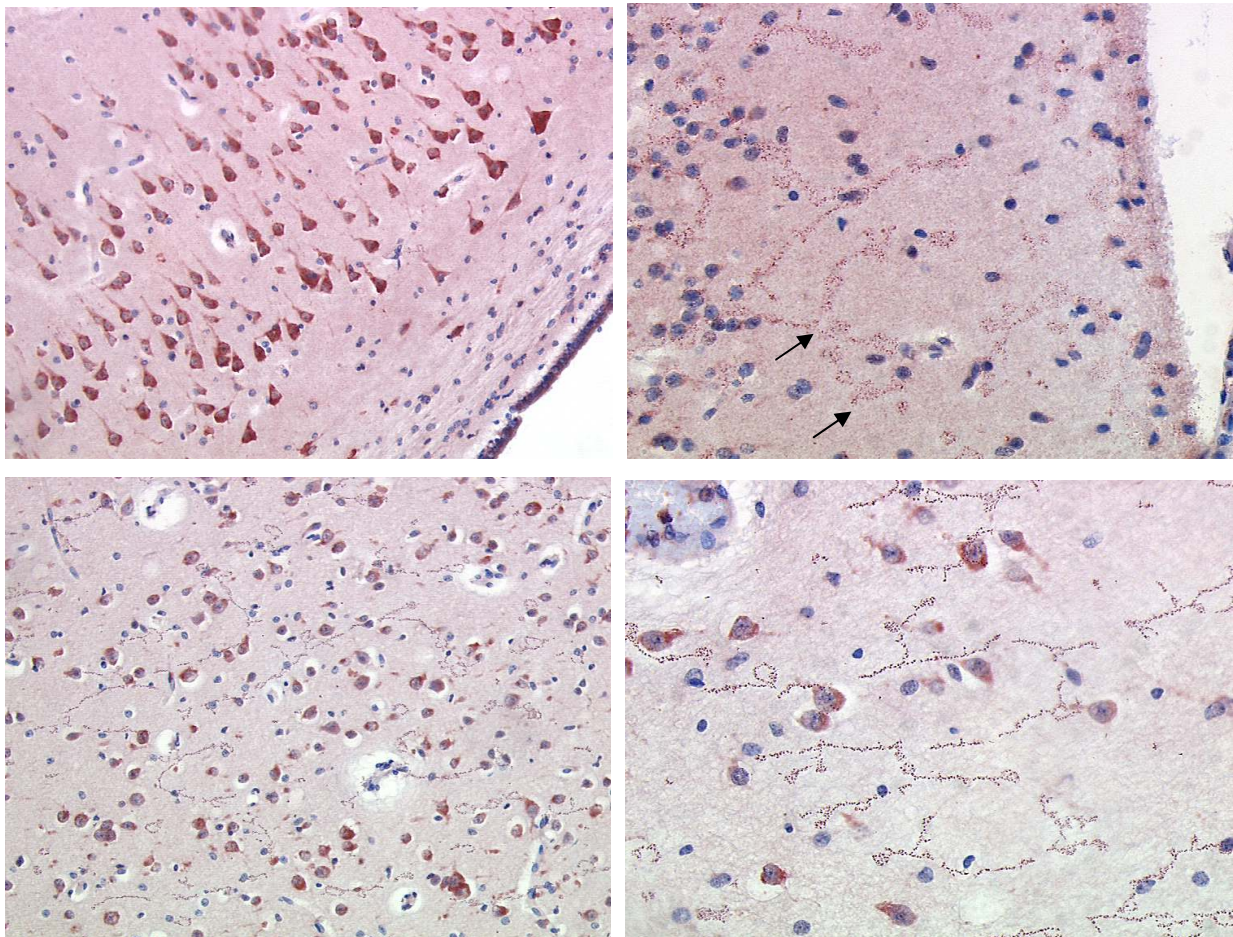


Abbildung 43: Immunhistochemie SePP Cortex (Frühgeborenes)

links oben: Area entorhinalis, Ependym (r.u.) (200x)

rechts oben: Cortex Molekularzellschicht, Pfeilen zeigen ein Dendriten-artiges granuläres Signal (400x)

links unten: Cortex Pyramidenzellen (200x)

rechts unten: Cortex Pyramidenzellen (400x)

## Ergebnisse

### *Area striata:*

Die Lamina 1 erscheint überwiegend SePP-negativ. Die Lamina 2 enthält teils positive, teils negative Körnerzellen. Die Pyramidenzellen der Lamina 3 kommen deutlich positiv zur Darstellung, während kleinere Neurone nur z.T. positiv sind. Die Lamina 4a und die Lamina 4b enthalten teils deutlich positive Neurone. Der Gennari-Streifen kommt nicht positiv zur Darstellung. Die Lamina 4c zeigt teils positive, teils mäßiggradig positive Neurone. Die Lamina 5 weist zum Teil deutlich positive Pyramidenzellen auf. In der Lamina 6 sind teils positive, teils negative Neurone identifizierbar. Das Marklager erscheint überwiegend negativ.

### *Hippocampus/Subiculum/Area entorhinalis*

Das Ependym des Plexus choroideus erscheint im Bereich der Seitenventrikel deutlich SePP-positiv, während Neurone der plexiformen und der molekularen Schichten des Hippocampus negativ sind. Die Neurone der Hippocampus-Formationen CA1-4 kommen deutlich positiv zur Darstellung. Auch die Körnerzellen des Gyrus dentatus sind, im Gegensatz zum adulten Gehirn, deutlich positiv. Die Neurone des Subiculums kommen sehr positiv zur Darstellung. In der Regio entorhinalis erscheint die Lamina 1 überwiegend negativ. Die Pyramidenzellen der Laminae 2 und 5 zeigen eine sehr deutliche SePP-Positivität. Eine deutliche Positivität ist zum Teil auch in der Lamina 2 in den Körnerzellen und in der Lamina 6 in den Pyramidenzellen zu identifizieren. Eine Lamina 4 ist in diesem Areal regelhaft nicht zu erkennen (sog. agranulärer Kortex). Das Marklager erscheint überwiegend negativ. Jedoch finden sich, wie bereits einleitend erwähnt, körnige strangförmige längliche Anfärbungen, welche sich keinem Zelltyp eindeutig zuordnen lassen.

### *Thalamus*

Die Neurone der einzelnen Kerngebiete des Thalamus färben sich in den einzelnen Kernen zum Teil deutlich SePP-positiv, zum Teil gering und zum Teil nicht an.

### *Hirnstamm*

Die Neurone der Nuclei pontes kommen sehr deutlich zur Darstellung. Die Neurone der Oliva inferior (incl. der Nuclei accessorii medialis et dorsalis) zeigen sich teils deutlich positiv. Weitere, hier nicht näher bezeichnete Hirnstammkerne sind teils sehr deutlich angefärbt. Der Tractus pyramidalis erscheint nahezu komplett ungefärbt.

## Ergebnisse

### *Cerebellum*

Die Purkinje-Zellen kommen deutlich SePP-positiv zur Darstellung (vgl. Abbildung 44). Das Stratum moleculare stellt sich überwiegend negativ dar, vereinzelt finden sich positive Astrozyten. Die Neurone des Stratum granulosum externum sind negativ. Einzelne Neurone des Stratum granulosum internum stellen sich positiv dar, der Großteil der Neurone bleibt jedoch negativ. Die Marklamellen erscheinen allenfalls gering positiv. Gefäße in der Pia mater zeigen teils eine deutliche SePP-Positivität.

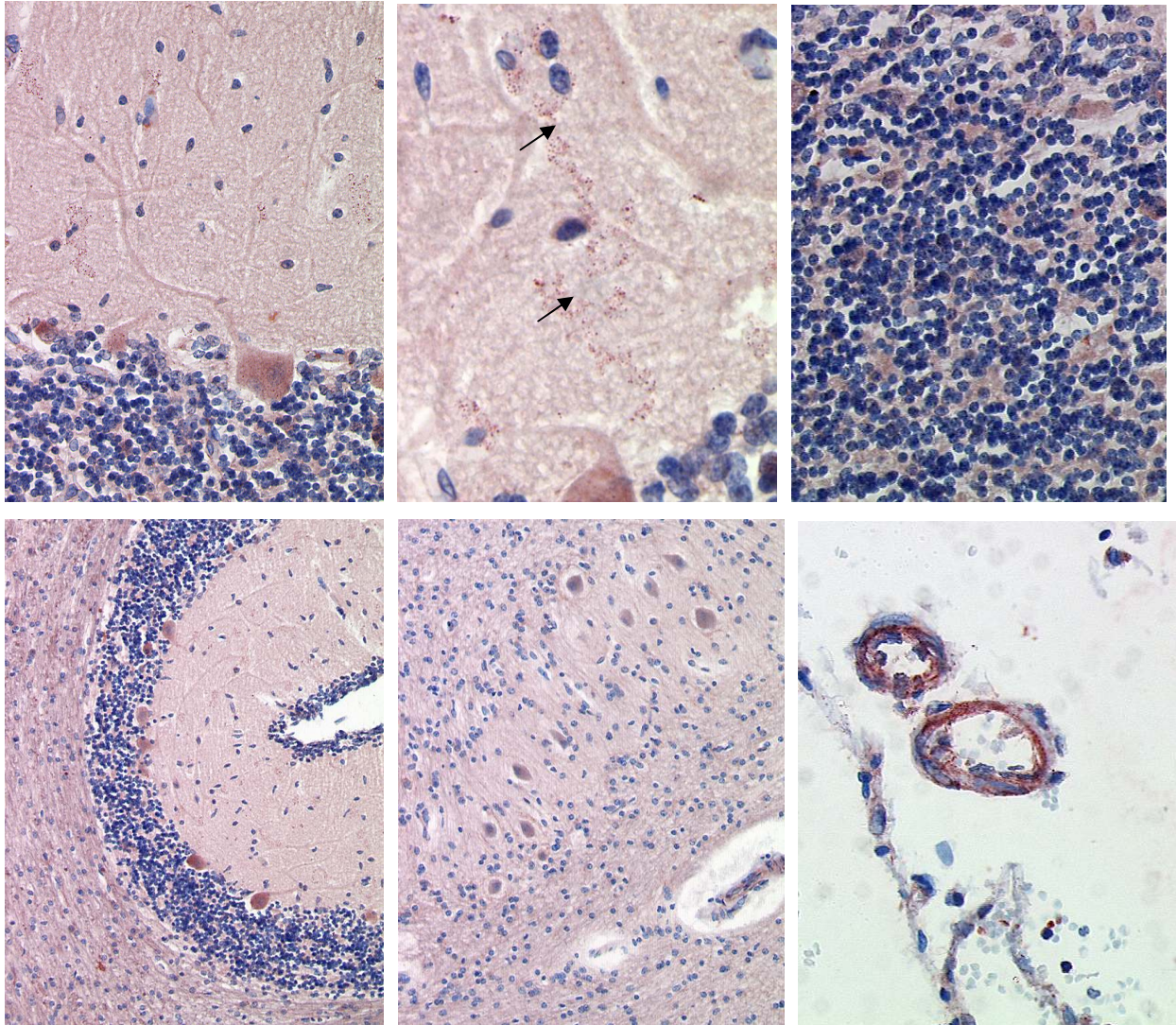


Abbildung 44: Immunhistochemie SePP im Kleinhirn (Frühgeborenes)

- oben links: Purkinje-Zelle mit Dendritenbaum (ca. 400x)
- oben Mitte: Dendritenbaum vergrößert, Pfeile zeigen granuläres Signal entlang des Dendritenbaums (ca. 600x)
- oben rechts: Stratum granulosum internum (ca. 400x)
- unten links: Marklager, Stratum granulosum internum/externum, Purkinje-Zellen (ca. 200x)
- unten Mitte: Nucleus dentatus Neuronen (ca. 200x)
- unten rechts: Piale Gefäße (ca. 600x)

## Ergebnisse

### *Rückenmark*

Die Nervenzellen des Nucleus ventromedialis, des Nucleus ventrolateralis, des Nucleus dorsomedialis und des Nucleus dorsolateralis zeigen ein intrazytoplasmatisches grobscholliges SePP-positives Signal. Einzelne Neurone des Nucleus dorsomarginalis kommen deutlich zur Darstellung. In der Substantia gelatinosa finden sich deutlich positive Neurone neben negativen Neuronen. Miterfasste Spinalnerven zeigen Axone mit Markscheiden unterschiedlicher Dicke. Betont dicke Markscheiden erscheinen dabei deutlich positiv.

### *Bahnssysteme*

Die Capsula interna zeigt im Vergleich zum adulten Gehirn eine deutlich geringere SePP-Immunfärbung. Der Tractus pyramidalis erscheint überwiegend negativ. Der Fasciculus gracilis, der Fasciculus cuneatus, und der Tractus spinocerebellaris posterior et anterior weisen Axone bzw. Markscheiden mit unterschiedlicher bis zu deutlicher Färbeintensität auf. Der Tractus pyramidalis lateralis zeigt insgesamt eher eine geringe Färbung. Im Tractus pyramidalis anterior sind im Vergleich zum Tractus pyramidalis lateralis mehr positive Markscheiden zu identifizieren. Der Fasciculus longitudinalis medialis und der Fasciculus anterolateralis zeigen zum Teil deutlich positive Nervenscheiden.

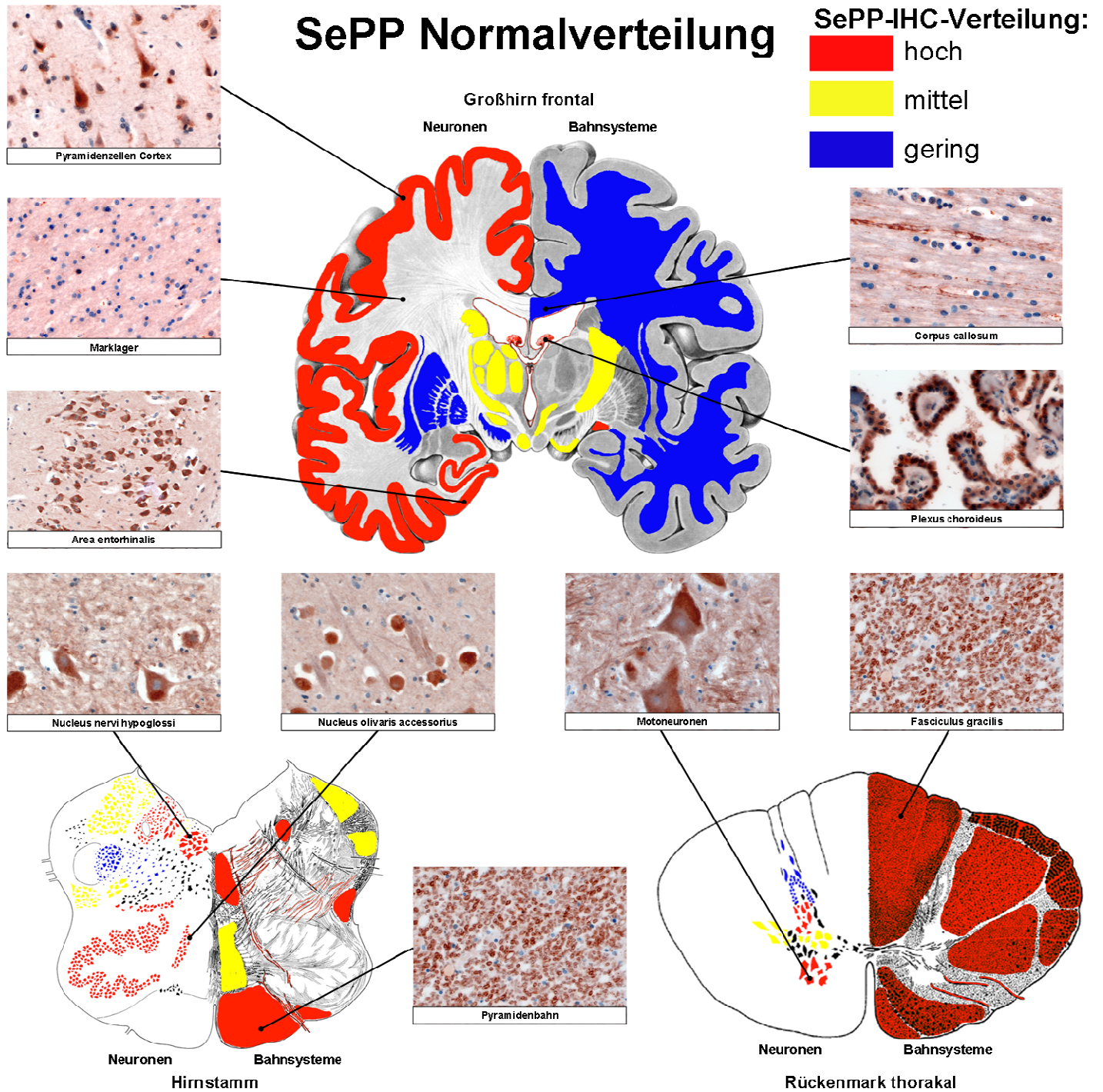


Abbildung 45: Zusammenfassende beispielhafte Darstellung der Verteilung von SePP im humanen Gehirn und Rückenmark [Anatomische Zeichnungen von R. Nieuwenhuys aus InterBrain<sup>79</sup>, mit freundlicher Genehmigung des Autors und des Verlages].

## Ergebnisse

### 3.3.4 Vergleich der Färbeergebnisse mit der Neurotransmitterverteilung

Der Vergleich der immunhistochemischen SePP-Färbeintensität erfolgte nur beispielhaft, da nur von wenigen dezidierten Kerngebieten die genaue Neurotransmitter-Verteilung vorlag.

Diese Verteilung ist Abbildung 46 in Tabellenform dargestellt. Die Farbkodierung auf der linken Seite entspricht der SePP-Färbeintensität. Eine Korrelation lässt sich hier nicht dokumentieren.

Regionen	Acetylcholin	Dopamin	Noradrenalin	Adrenalin	Serotonin	Histamin	GABA	Glutamat-Aspartat	Glyzin	Substanz P	VIP	Cholezystikinin	Neurotensin	CRH	LH	Somatostatin	TRH	Vasopressin+Oxytocin	Corticotropin+alpha-MSH	Beta-Lipotropin	alpha-MSH	beta-MSH	gamma-MSH	beta-Endorphin	Enkephalin	Dynorphin	Angiotensin II	
Nucleus solitarius	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X		X	X	X							X	X		
Thalamus			X	X	X		X	X											X	X								
Nucleus basalis amygdalae	X	X	X																									
Cortex entorhinalis	X						X																					
Pons								X																				
Hippocampus	X													X						X								
Nucleus basalis Meynert	X																											
Nucleus centralis superior			X		X					X										X								
Nucleus dorsalis nervi vagi		X	X	X	X	X								X					X						X	X		
Nucleus medialis amygdalae						X									X												X	
Gyrus cinguli			X		X						X	X		X	X	X									X	X		
Nucleus intermediolateralis		X	X	X	X														X								X	
Nucleus lemnisci lateralis dorsalis																	X											
Cortex frontalis		X								X																		
Nucleus subthalamicus							X																					
Nuclei laterales thalami	X																											
Nucleus ventromedialis					X	X		X		X	X	X					X	X									X	
Subiculum			X		X		X	X			X	X					X									X		
Nucleus corticalis amygdalae												X																
Griseum centrale mesencephali			X	X	X	X				X	X	X	X	X	X	X			X	X					X	X	X	
Nucleus reticularis thalami							X	X																				
Cortex frontalis		X								X																		
Nucleus cuneatus medialis								X				X															X	
Nucleus caudatus	X				X	X	X	X	X	X	X	X	X				X			X					X			
Nucleus anterior thalami			X																	X						X		
Nucleus dorsomedialis			X	X	X	X					X	X						X	X	X						X	X	
Substantia innominata														X											X	X		
Locus coeruleus		X	X	X	X									X					X	X							X	
Globus pallidus, pars lateralis							X			X															X			
Putamen	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X					X		X						X			
Nucleus parabrachialis medialis																	X											
Substantia gelatinosa spinalis											X						X								X			
Nuclei pontis			X			X																						
Gyrus dentatus			X		X						X																	
Nucleus ruber								X																				
Globus pallidus, pars medialis								X		X															X	X		
Substantia nigra					X		X	X	X																			

Abbildung 46: Vergleich Färbeintensität (linke Spalte: orange hoch, gelb mittel, türkis gering) mit Neurotransmitterverteilung im entsprechenden Hirnareal (nach <sup>86</sup>)

## Ergebnisse

### 3.3.5 Pathologische Veränderungen

#### *Multiple Sklerose:*

In den Hirnschnitten eines Patienten mit multipler Sklerose zeigen sich im Bereich des Marklagers frontal rechts sowie in den lumbalen Abschnitten des Rückenmarks ältere Entmarkungsherde bei weitgehend erhaltenen Axonen (lt. neuropathologischem Befund).

Die Morphologie der unterschiedlichen Entmarkungsherde in der SePP-Immunhistochemie erscheinen identisch (vgl. Abbildung 47). Die typische positive Färbung der Markscheiden fehlt bei der multiplen Sklerose im Entmarkungsherd komplett. Im Herd selbst finden sich fokale granuläre, im Interstitium lokalisierte, positive Ablagerungen. Speziell der Herd frontal zeigt um die Läsion herum eine ringförmige Signalanhebung der Markscheiden.

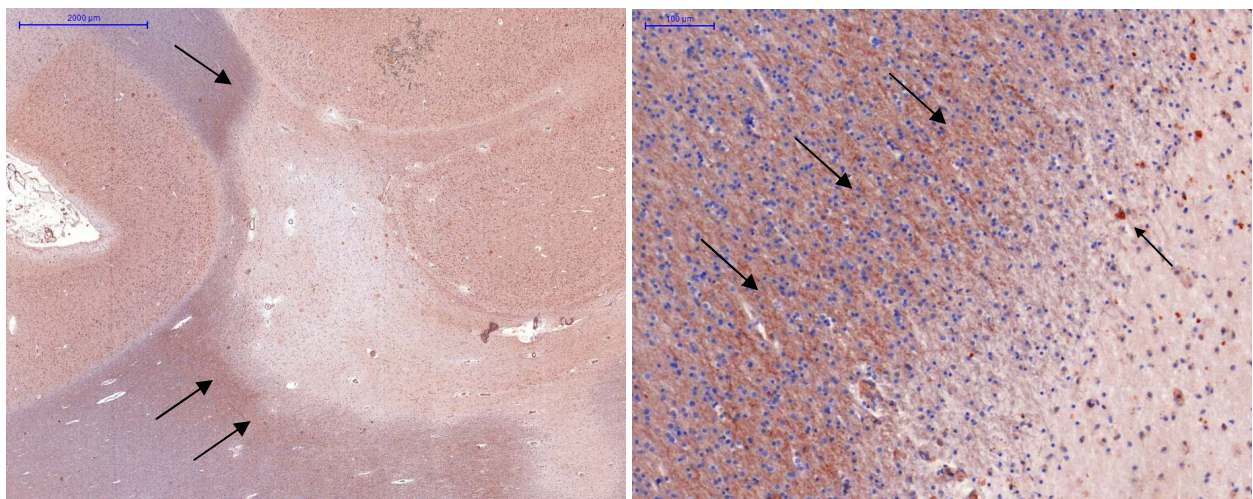


Abbildung 47: Histologie einer älteren MS-Läsion im Marklager frontal  
oben links: Übersicht mit Bezug zum Cortex mit Darstellung der ringförmigen Signalanhebung periläsional (Pfeile)  
oben rechts: Übergang Entmarkungsherd (rechts unten) auf das intakte Marklager mit Signalanhebung periläsional (Pfeil) und intraläsionalen granulären Ablagerungen (dünner Pfeil)

#### *Morbus Alzheimer*

Bei der Untersuchung der unterschiedlichen Hirnareale finden sich in folgenden Hirnregionen Veränderungen im Sinne von Alzheimer-Plaques, Neurofibrillary Tangles und ein auffallendes perinukleär betontes SePP-Färbemuster (vgl. Abbildung 48):

- Gyrus frontalis superior
- Gyrus frontalis medius
- Okzipitaler Cortex
- Hippocampus CA2/3/4



## Ergebnisse

- Praesubiculum
- Insula
- Putamen

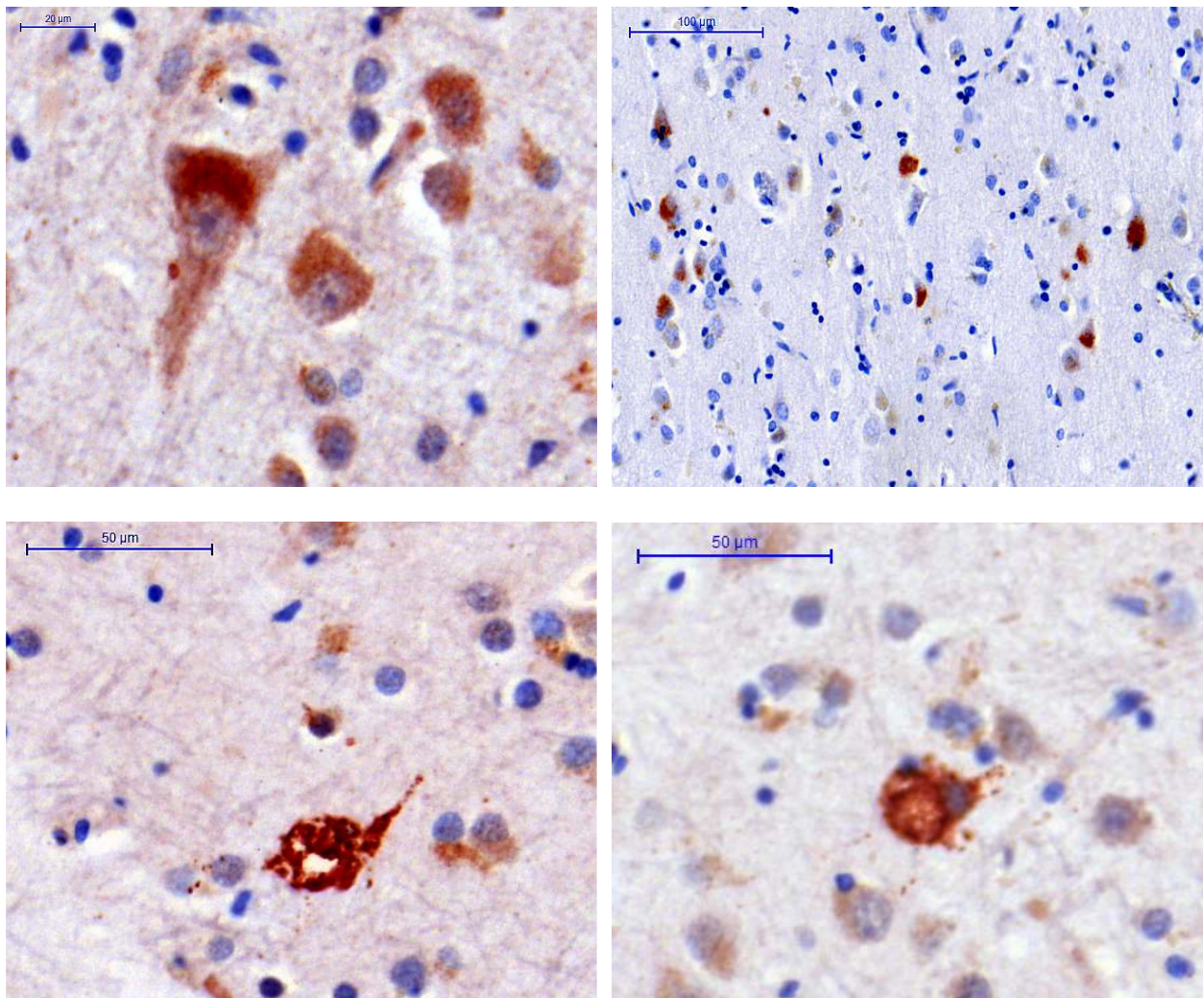


Abbildung 48: Histologie der Alzheimer-Veränderungen

links oben: Neuron Gyrus frontalis superior mit perinukleärer SePP-Immunreaktivität/dystrophem Neuriten

rechts oben: Neuronen entorhinaler Cortex mit perinukleärer SePP-Immunreaktivität

links/rechts unten: Alzheimer-Plaques Gyrus frontalis superior

### *Amyotrophe Lateralsklerose*

Die Färbungen der Schnittpräparate sind sehr unterschiedlich, zum Teil mit deutlicher Überfärbung und Hintergrund.

Die untersuchten Schnitte durch das Rückenmark zeigen alle eine Reduktion der Anzahl und Größe der Motoneuronen des Vorderhorns. Die Tractus pyramidales anteriores et laterales weisen einen Verlust von Axonen und Nervenscheiden auf.

## Ergebnisse

Die Motoneuronen zeigen in der SePP-Immunfärbung eine gegenüber dem Normalbefund verringerte Anfärbung des Zytoplasmas. Das Zytoplasma ist durch vermehrte kleinvesikuläre/-granuläre, SePP-negative Inklusionen aufgeweitet. Diese Veränderungen sind nicht auf die Motoneuronen des Vorderhorns begrenzt, vielmehr scheinen nur betont die ventralen Neuronengruppen dieses Färbemuster zu zeigen. Im Hirnstamm zeigen sich Neuronen mit typischem grobgranulärem SePP-Signal, neben Neuronen mit allenfalls flau gefärbtem Zytoplasma, wobei einzelne Neuronen versprengt feingranuläre Signale intrazytoplasmatisch erkennen lassen. Auffallend in den Präparaten sind viele aktivierte Astrozyten mit grobgranulärem zytoplasmatischem SePP-Signal.

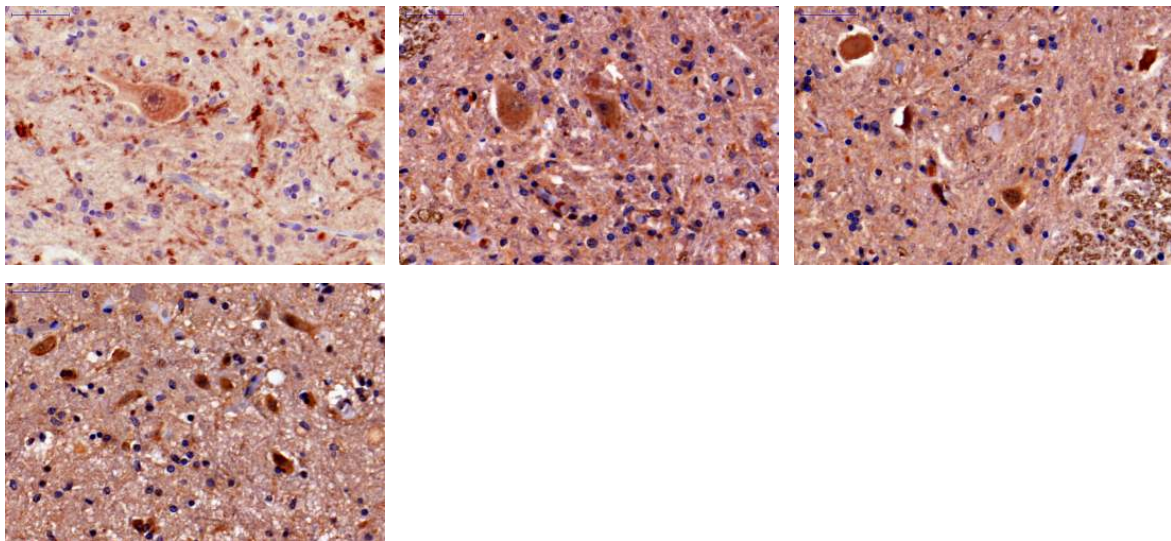


Abbildung 49: Motoneurone ALS-Patient I:

links oben: zervikal  
mittig oben: thorakal  
mittig rechts: thorakal  
links unten: lumbal

## Ergebnisse

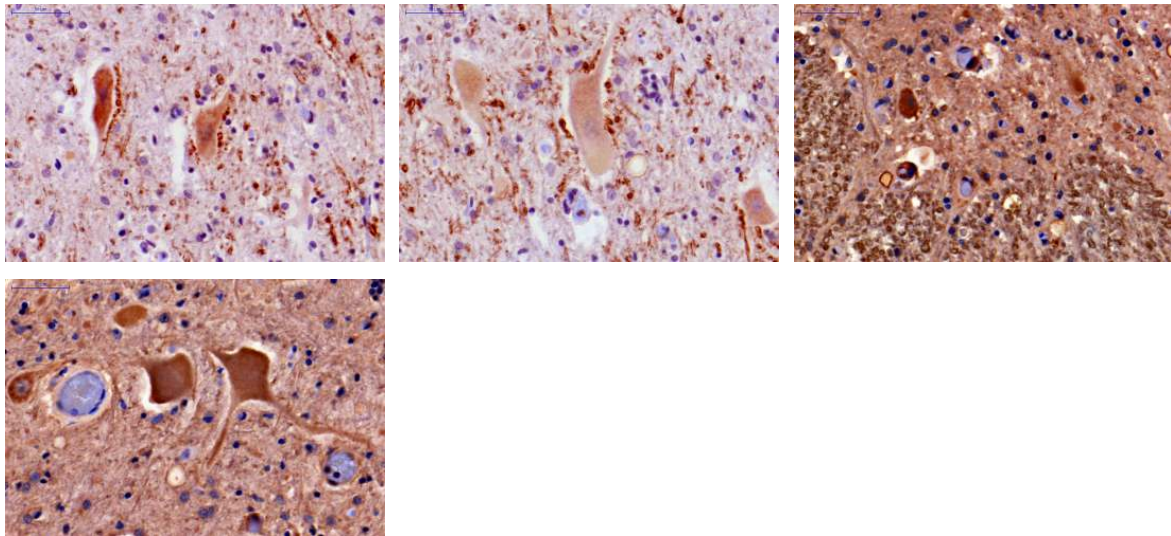


Abbildung 50: Motoneurone ALS-Patient II:

links oben: zervikal  
mittig oben: zervikal  
mittig rechts: thorakal  
links unten: lumbal

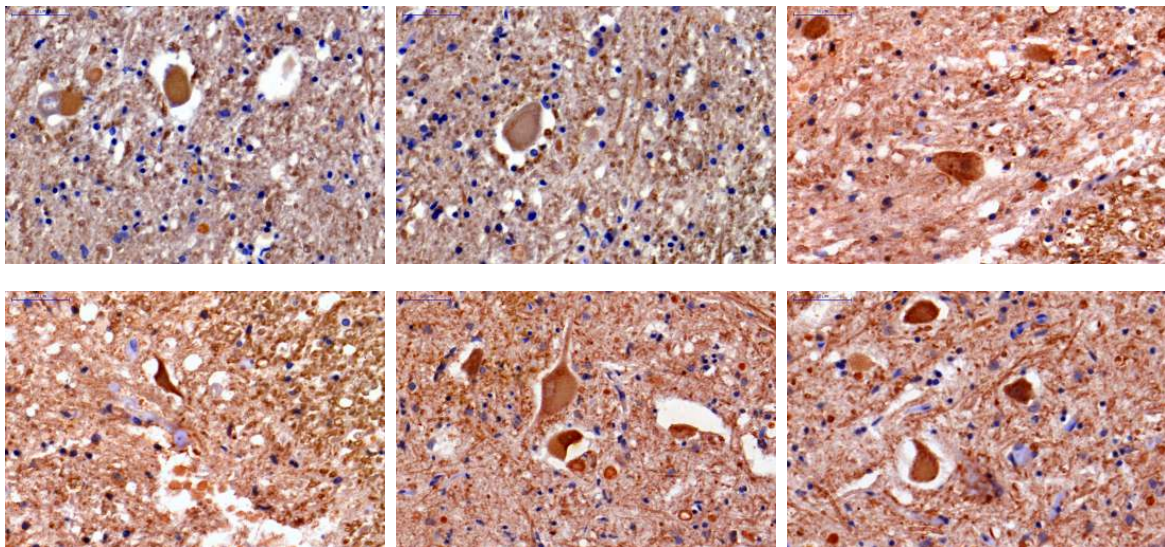


Abbildung 51: Motoneurone ALS-Patient III:

links oben: zervikal  
mittig oben: zervikal  
rechts oben: thorakal  
links unten: thorakal  
mittig unten: lumbal  
rechts unten: lumbal

## Ergebnisse

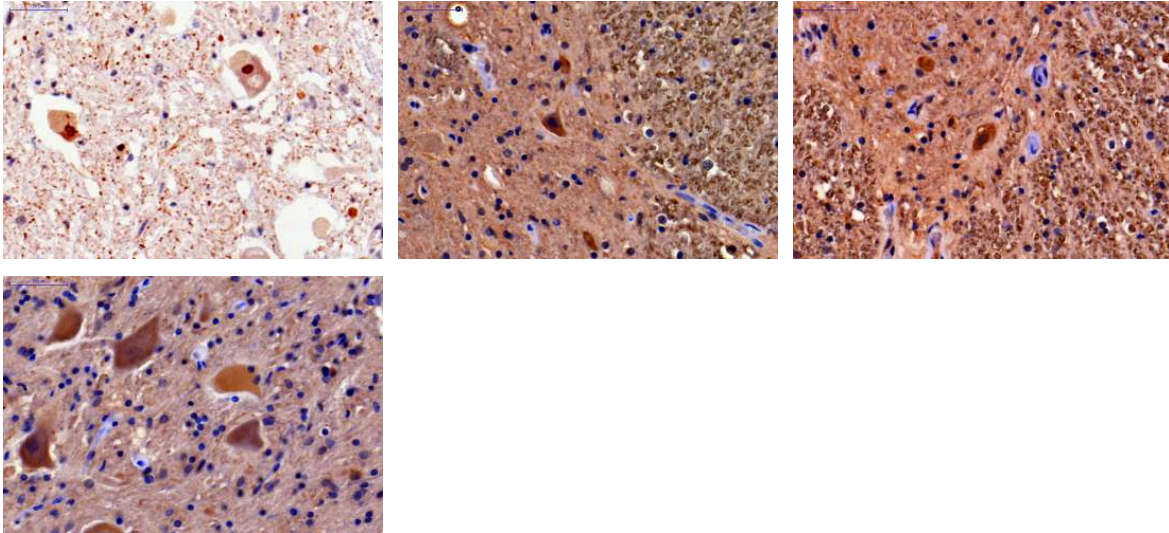


Abbildung 52: Motoneurone ALS-Patient IV:

links oben: Ubiquitin-Immunhistochemie mit ALS-typischen Einschlüssen  
mittig oben: hoch thorakal  
rechts oben: thorakal Mitte  
links unten: lumbal

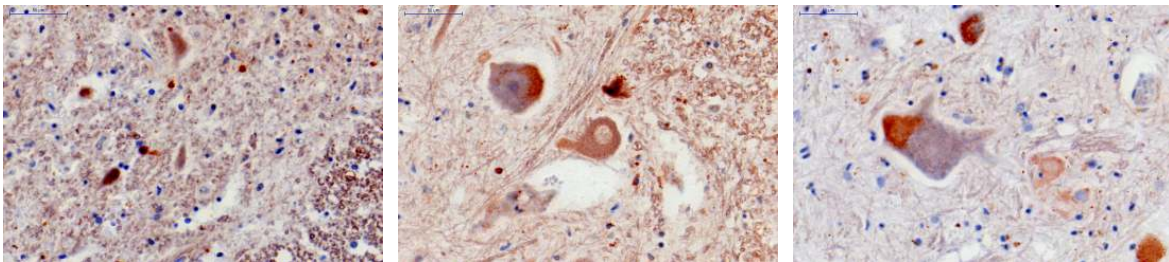


Abbildung 53: ALS-Patient V:

links: thorakal  
mittig: lumbal  
rechts: lumbal

### *M. Parkinson*

Die Färbungen der Präparate sind insgesamt gut und homogen. Es finden sich gegenüber der Normalverteilung keine auffallenden Veränderungen. Die pigmentierten Neuronen der S.n. zeigen eine gering bis mäßiggradige positive SePP-Immunfärbung (vgl. Abbildung 54).

## Ergebnisse

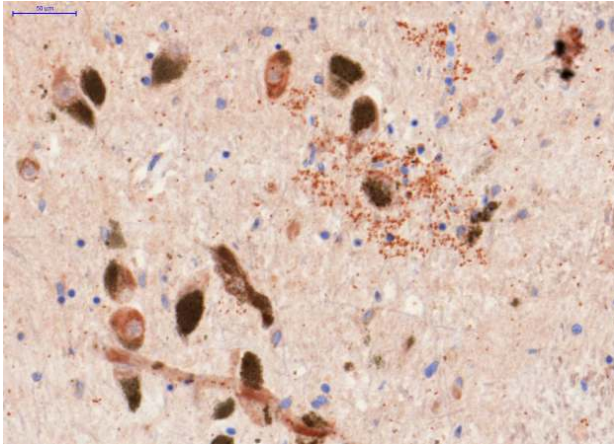


Abbildung 54: Neuronen der Substantia nigra

### 4 Diskussion

#### 4.1 SePP-Expression

In dieser Arbeit sollte die SePP-Expression und -Verteilung in verschiedenen Geweben von Mensch und Maus untersucht werden, um die Zell- und Organspezifität von SePP näher zu charakterisieren. Die Untersuchung der SePP-Expression erfolgte zum einen mittels des MTE-Arrays und zum anderen mittels der klassischen und etablierten ISH und auf Proteinebene mit Hilfe der Immunhistochemie.

##### 4.1.1 Methodik ISH & MTE

Die ISH wurden am Mausgewebe durchgeführt, während der MTE-Array die humane SePP-Expression zeigt. Bei der folgenden zusammenfassenden Interpretation der Ergebnisse wurde davon ausgegangen, dass sich die Expressionen in Maus und Mensch nicht unterscheiden, da keine diesbezüglichen Hinweise aus der Literatur vorliegen. Jedoch könnten prinzipiell im Detail hier nicht erfasste Unterschiede bestehen.

##### *ISH:*

Bei der radioaktiven ISH handelt es sich um eine sehr sensitive Methode zum Nachweis eines spezifischen Transkripts. Zu Kontrollzwecken wurde in den Experimenten neben der Signalgebenden SePP-Antisense-Sonde auch eine sog. Sense-Sonde mitgeführt. Durch die Sense-Sonde kann das Ausmaß der unspezifischen Färbung bzw. der Hintergrundfärbung abgeschätzt werden. Diese war in den Sense-Färbungen durchgehend gering bis mäßig und diffus, und konnte nicht spezifischen Strukturen oder Zelltypen zugeordnet werden. Der Hintergrund wurde zwar bei den langen Expositionen deutlicher, jedoch blieben die Signale diffus und waren dadurch klar von den spezifischen Färbungen abzugrenzen.

Bei der detaillierten Auswertung haben sich die relativ große Schnittdicke sowie die anfangs ausschließlich durchgeführte Hämatoxylin-Gegenfärbung als unvorteilhaft erwiesen. Beide Faktoren erschweren die genaue Zuordnung des SePP-Signals zu einzelnen spezifischen Zellen deutlich, so dass sich die Auswertung überwiegend auf die Histoarchitektur und der daraus sekundär abgeleiteten Zuordnung zu bestimmten Zelltypen beschränken muss.

##### *MTE-Array:*

Bei dem käuflichen MTE-Array handelt es sich um eine sensitive und valide Methode zur radioaktiven Detektion von Transkripten in 76 unterschiedlichen Geweben bzw. Zell-Linien. Die aufgetragenen RNA-Isolate sind auf 8 Housekeeping-Gene normalisiert. Auf jedem Blot sind 8

unterschiedliche Negativkontrollen aufgetragen, welche in unseren Experimenten sämtlich negativ waren. Insofern können die gewonnenen Signale und Ergebnisse als valide eingeordnet werden.

### 4.1.2 SePP-Expression in der Leber

Bei frühen Untersuchungen des Se-Stoffwechsels bei Ratten mit Hilfe von radioaktiven <sup>75</sup>Se-Markierungsexperimenten wurde offenbar, dass oral/intravenös verabreichtes Selen nach der Aufnahme primär in der Leber akkumuliert, dort offensichtlich in einer Protein-Fraktion gebunden wird und über ein Protein ins Plasma sezerniert wird und sich dann sekundär im Körper spezifisch auf unterschiedliche Organe verteilt<sup>87,88</sup>. Nachfolgende Studien konnten zeigen, dass es sich bei diesem Protein zum größten Teil um Selenoprotein P handelt<sup>62,89</sup>. Dies bestätigte sich auch auf mRNA-Ebene in den anschließend durchgeführten Northern Blot-Studien an humanem Lebergewebe und an Rattenlebern<sup>60</sup>. Die Bedeutung und zentrale Rolle von SePP im Allgemeinen und im hepatischen Selenstoffwechsel im Besonderen spiegelt sich auch in unseren Untersuchungen wider. So findet sich in der Leber die mit großem Abstand zu den übrigen Organen weitaus höchste Konzentration an SePP-mRNA. Auch in der ISH wird diese Tatsache betont. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Organsystemen gelang uns hier auf Grund der sehr hohen Expressionsrate mit einer nur (ultra)kurzen Expositionszeit von 2 Tagen ein noch grenzwertig histologisch auswertbares Präparat. Interessanterweise zeigt sich hier, dass das SePP-Transkript über den kompletten Rappaport-Azinus<sup>90</sup> verteilt ist, jedoch eine deutliche Betonung in Zone 1 und Zone 2 aufweist, während die Zone 3 eher weniger SePP mRNA enthält. Diese Verteilung im Leberazinus lässt sich durch 2 Mechanismen deuten. Zum einen handelt es sich bei der SePP-Synthese um eine deutlich Energie-intensive Stoffwechselleistung. Erfahrungen aus den Untersuchungen des hepatischen Stoffwechsels haben gezeigt, dass sich Energie-intensive Stoffwechselschritte bzw. deren Enzyme häufig in Zone 1 und 2 des Rappaport-Azinus lokalisieren lassen<sup>91</sup>. Mechanistisch gesehen besteht auf Grund der Nähe der Zone 1 zum sauerstoffreichen arteriellen Blut aus der Arteria hepatica zwischen den Zonen 1-3 ein Sauerstoff-Gradient im sinusoidalen Blut. Dementsprechend verteilt sich im Leberläppchen die aerobe Glykolyse mit ihrem deutlichen Energiezugewinn (v.a. in Form von ATP) v.a. auf die Zone 1 und 2. Energetisch aufwendige Stoffwechselschritte sind somit meist auf Zone 1 und 2 des Rappaport-Läppchens beschränkt. Zum anderen fluten intestinal resorbiertes Selen und die Selen-haltigen Aminosäuren über die Pfortaderäste zu allererst in der Zone 1 des Leberläppchens an. Funktionell spielen vermutlich beide Mechanismen eine Rolle.

### 4.1.3 SePP-Expression in der Niere

Die Niere nimmt in der Homeostase-Regulation des Selenstoffwechsels eine bedeutende und zentrale Rolle ein. Der Urin stellt den wichtigsten Exkretionsweg für Selen dar<sup>92</sup>, und die Menge des renal ausgeschiedenen Selens korreliert mit der Selen-Aufnahme<sup>93</sup>. Ausscheidungsformen des Selens sind neben Selenomethionin, Selenocystein, Selenit, Selenat und Selenocholin<sup>94</sup> vor allem selenhaltige Zucker<sup>95</sup>. Neuere Arbeiten konnten zeigen, dass v.a. die renalen Aminosäure-Transporter effektiv auch Selenoaminosäuren reabsorbieren<sup>96</sup>. Eine Regulation der Aufnahme von Selen aus der Nahrung im Darm scheint zum Erhalt einer Selen-Homeostase keine bzw. eine untergeordnete Rolle zu spielen<sup>89</sup>.

Die Niere weist im Vergleich zur adulten Leber-Expression (ALE) mit 39% im MTE ebenfalls eine deutliche Expression von SePP mRNA auf. In der ISH zeigt sich, dass sämtliche Glomeruli ausgespart bleiben, während v.a. die proximalen Nierentubuli eine deutliche Positivität zeigen. Auch die distalen Tubuli erscheinen positiv. Die Sammelrohre bleiben negativ.

Die histologische Verteilung des SePP-Transkripts in der Niere scheint die Funktion des SePP im renalen Selen-Stoffwechsel zu bestätigen. Das SePP-Transkript ist in den Epithelien v.a. des proximalen Tubulus lokalisiert, also dem Ort der größten Dichte der Aminosäure-Transporter, welche für die Aufnahme und Regulation der Selenoaminosäuren entscheidend sind. Somit könnte die Funktion der Niere darin bestehen, dass rückresorbierte(s) Selen/Selenoaminosäuren zurück in den Selenkreislauf geschleust werden, indem das Selen in SePP verpackt wird und zurück ins Blutplasma abgegeben wird. Diese Rolle des Selenoproteins scheint dadurch bestätigt zu werden, dass die SePP-Knock-Out-Maus vermehrt Selen über den Urin verliert<sup>97</sup>. Ferner konnte von Burk et al. gezeigt werden, dass SePP im Primärharn vorhanden ist, und dieses über Megalin im proximalen Tubulus zurückresorbiert wird<sup>98</sup>. Eine ähnliche Situation scheint bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz vorzuliegen. Klinische Studien konnten überdies zeigen, dass Patienten in Abhängigkeit des Stadiums ihrer Nierensuffizienz einen geringeren Selen-Gehalt im Blut haben<sup>21</sup>.

Studien an SePP-Knock-Out-Mäusen konnten zeigen, dass diese Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen etwa die 2,4-fache Menge an Selen über die Nieren verlieren<sup>97</sup>. In weiteren Experimenten wurde Mäusen spezifisch hepatisch die Selenoprotein-Synthese inaktiviert, was unter anderem dazu führte, dass der Selengehalt in der Niere reduziert wurde<sup>74,65</sup>, so dass davon ausgegangen werden kann, dass auch die Niere zumindest teilweise auf hepatisch-synthetisiertes SePP zum Erhalt des renalen „Selen-Pools“ angewiesen ist.



### 4.1.4 SePP-Expression im Gastrointestinaltrakt

Der Magen-Darm-Trakt nimmt im Selen-Stoffwechsel als Ort der primären Resorption aus der Nahrung eine wichtige Rolle ein. Der Darm nimmt dabei wahrscheinlich keine regulatorische Funktion wahr<sup>89</sup>. Ein Großteil des Selen wird im proximalen Dünndarm aufgenommen.

In unseren Untersuchungen mit dem MTE zeigen die unterschiedlichen resorptiven Darmabschnitte allesamt eine eher geringe Expression von Selenoprotein P. Einzig der Magen weist gegenüber den übrigen Darmabschnitten eine leicht erhöhte Expression auf. In den ISH wurde einzig der Dünndarm untersucht. Dieser zeigt eine spezifische Anhäufung von SePP mRNA in den Enterozyten des Kryptenhalses.

Die Funktion der SePP-Expression in den Darmabschnitten bleibt unklar, da der eigentliche Einbau von Selen in zirkulierendes SePP in der Leber stattfindet. Evtl. werden aber bestimmte Selenformen bereits unmittelbar im Anschluss an die Resorption im Enterozyten in die Transportform SePP eingebaut. Des Weiteren könnte die Expression von Selenoprotein P einen antioxidativen Schutz des Enterozyten gegen einwirkende Radikale aus dem Chymus darstellen<sup>70</sup>. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass im Rahmen der kolorektalen Karzinogenese eine Änderung der mRNA-Expression von SePP und GPX2 zu finden ist<sup>70,99</sup>. In diesen Studien zeigt die normale Kolonschleimhaut, in Übereinstimmung mit unseren Befunden, eine Expression von SePP. Im Adenom dagegen findet sich im Vergleich zur normalen Mukosa eine Reduktion der Expression von SePP und eine Aufregulation der GPX2<sup>99</sup>. Ferner wurde bei kolorektalen Karzinomen im Vergleich zur normalen Mukosa eine Reduktion der SePP-Expression gefunden<sup>70</sup>. Die Expressions-Befunde der GPX2 hingegen waren im Karzinom im Gegensatz zum kolorektalen Adenom uneinheitlich. Die Autoren dieser Studien postulieren eine komplementäre Funktion von SePP und GPX2 beim Schutz vor oxidativen Schäden, und damit eine sekundäre Auffregulation der GPX2 bei Verlust der SePP-Expression. Ob diese Hypothese zutrifft oder ob es sich um ein Paraphänomen der Karzinogenese handelt, muss anhand weiterer Studien geklärt werden.

### 4.1.5 SePP-Expression in fetalen Organen

Bislang gibt es nur wenige Publikationen, die sich mit SePP und der humanen fötalen Entwicklung und Expression beschäftigen. Lee et al.<sup>100</sup> untersuchten in einer kürzlich veröffentlichten Studie an der Maus die Expression von SePP. Das SePP-Transkript konnte in allen untersuchten Embryonalstadien der Maus nachgewiesen werden. Die durchgeführten InSitu-Hybridisierungen ließen eine Lokalisation des SePP-Transkripts im Nervensystem bzw. Neuroektoderm erkennen. In sämtlichen untersuchten Entwicklungsstadien zeigte sich das SePP-Transkript in den Blutzellen.

## Diskussion

Ferner fand sich eine Expression in den Extremitäten bzw. den Extremitätenanlagen, dem Gastrointestinaltrakt, der Lunge, der Niere, der Leber, der Glandula submandibularis, dem Pankreas, der Harnblase und der Haut.

Unsere Untersuchungen mit dem humanen MTE-Array zeigen auf transkriptioneller Ebene, dass auch im humanen Fetus SePP eine Rolle spielt. Leider liegen uns bezüglich des fetalen Alters der auf dem MTE aufgetragenen Proben keine Angaben vor.

Die fötale Leber zeigt absolut betrachtet nur etwa 1/5 der adulten SePP-Expression. Die Spitzenposition bezüglich der SePP-Expressionen wird von der Plazenta angeführt.

Dies unterstreicht die Funktion des SePPs als Selen-Transportprotein. Generell hat die Leber eine wichtige Rolle im Recycling des Selens der plasmatischen Selenoproteine. Diese Funktion scheint sie im adulten und fötalen Organismus gleichermaßen zu erfüllen. Im adulten Organismus hat die Leber außerdem die wichtige Funktion Selen, das aus der Resorption im Gastrointestinaltrakt im Pfortaderblut anflutet, in SePP zu fixieren, ins Serum zu sezernieren und damit letztlich Se den Körperzellen in verwertbarer Form zur Verfügung zu stellen. Die letztgenannte Funktion scheint in der fötalen Leber eine untergeordnete Rolle zu spielen, da fötal über das Pfortaderblut kein resorbiertes Se anflutet. Vielmehr wird Selen aus dem maternalen Blut in der Plazenta aufgenommen, direkt in der Plazenta in Form von SePP gebunden<sup>101</sup> und dem fötalen Kreislauf zugeführt.

Da sich die Funktion der adulten Leber offensichtlich fötal auf die Plazenta und die fötale Leber aufspaltet, wurden in den vergleichenden Abbildung 32-35 neben den absoluten Expressionswerten auch die relativen Werte verglichen (bezogen auf die fötale Leberexpression (relativ II, Abbildung 34), die fötale Expression der Plazenta (relativ I, Abbildung 33) und die fötale Expression von Plazenta + Leber (relativ III, Abbildung 35)). Bei der Betrachtung der Werte bezogen auf die fötale Leberexpression nähert sich die Expression von Milz, Niere und Thymus den adulten Werten an.

Wie bereits erwähnt zeigt die Plazenta eine deutliche, bzw. unter den untersuchten fötalen Organen die höchste SePP-Expression. Die SePP-Expression in der Plazenta wurde bereits durch Untersuchungen an der Maus bestätigt<sup>100,101</sup> und zeigt im Schwangerschaftsverlauf bei der Maus einen bis zur Geburt ansteigenden Verlauf<sup>101</sup>.

## Diskussion

Sehr auffallend verhält sich die SePP-Expression in der Lunge, welche sich fötal etwa um den Faktor 6 von der adulten SePP-Expression unterscheidet. In Versuchen an Ratten<sup>102</sup> konnte gezeigt werden, dass der Selengehalt des fötalen Lungengewebes am 18. Trächtigkeitstag im Vergleich zum Selengehalt bei Geburt sowie postpartal erhöht ist. Elektronenmikroskopische Untersuchungen<sup>103</sup> konnten zeigen, dass am Tag 18 der fötalen Rattenentwicklung in der Lunge eine beginnende Differenzierung von undifferenzierten Epithelzellen in alveoläre Deckzellen Typ I und Typ II stattfindet. Dieses Entwicklungsstadium korreliert in etwa mit der 26. Schwangerschaftswoche beim Menschen<sup>104</sup>. In dieser Zeit differenziert das alveoläre Deckepithel aus, und es wird beginnend Surfactant produziert<sup>104</sup>. Somit korreliert zumindest in der Ratte der Zeitpunkt des höchsten Selengehalts in der Lunge mit einem außerordentlich wichtigen Zeitpunkt in der Lungenreifung, nämlich dem Zeitpunkt der Differenzierung der Alveolar-Typ-II-Epithelzellen und damit dem Zeitpunkt der beginnenden Surfactant-Produktion. Dieser Zeitraum der pulmonalen Entwicklung definiert beim Menschen die Schwelle des frühestmöglichen Überlebens von Frühgeborenen. Untersuchungen an Frühgeborenen in Neuseeland<sup>105</sup> konnten zeigen, dass Frühgeborene mit einem erniedrigten Plasma-Selengehalt ein signifikant höheres Risiko hatten, eine chronische Lungenerkrankung bzw. eine bronchopulmonale Dysplasie zu entwickeln. Auf der Basis dieser Studie wurden Interventionsstudien durchgeführt, z.B. mit Supplementation von Selen bei sehr untergewichtigen Frühgeborenen (<1500 g)<sup>106</sup>. In dieser und weiteren Studien zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den supplementierten und den Kontroll-Gruppen<sup>107</sup>. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte darin liegen, dass ein Selenmangel schon Tage bis Wochen vor der Frühgeburt die Differenzierung der Alveolarepithelien verzögert und dieses Reifungsdefizit durch postpartale Supplementation nur begrenzt kompensiert werden kann. Dass Selen einen Einfluss auf die Synthese des Surfactants hat konnte in Zellkulturexperimenten gezeigt werden<sup>108</sup>. In Studien an neugeborenen Ratten wurde ferner der Effekt von Selen-Mangel während der Schwangerschaft sowie direkt postpartal auf die Lungenentwicklung mit und ohne Hyperoxie untersucht<sup>109,110</sup>. Hier konnte gezeigt werden, dass pathologische Veränderungen, z.B. eine Rarefizierung der Alveolarwände sowie eine interstitielle Entzündung, bei Selen-Mangel deutlich vermehrt auftreten (z.B. 100% der Tiere bei Selenmangel vs. 60% bei Selen-adäquater Versorgung<sup>109</sup>). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die vermehrte Resistenz fötaler Typ-II-Pneumozyten im Vergleich mit adulten Typ-II-Pneumozyten gegenüber Hyperoxie unter anderem mit der Hochregulation von GPX korreliert<sup>111</sup>. Wade et al.<sup>111</sup> untersuchten an isolierten humanen fetalen Typ-II-Pneumozyten der Schwangerschaftswochen 13-20 mit Hilfe des Affymetrix-Genchips U133 die Genexpression nach

## Diskussion

Induktion der Pneumozytenreifung durch cAMP, Dexomethason und Isobutylmethylxanthin. Die Messwerte zeigen im Vergleich zu nicht induzierten fötalen Pneumozyten nach 72h Induktion eine mehr als 2-fache Erhöhung des Transkriptlevels von SePP (Abbildung 55). Diese mRNA-Erhöhung spricht in erster Linie für eine tatsächliche SePP-Aufregulation.

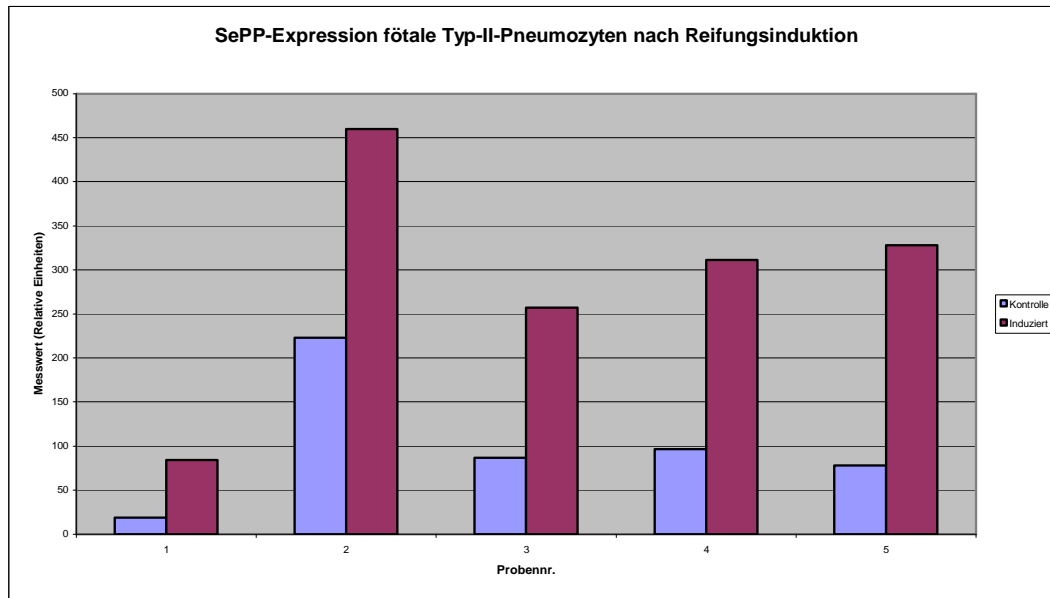


Abbildung 55: SePP-Expression fötale Typ-II-Pneumozyten nach Reifungsinduktion mittels cAMP/Dexamethason/Isobutylxanthin (Daten nach Wade et al. <sup>111</sup>)

Diese Untersuchungen unterstreichen die Wichtigkeit von Selen und Selenoprotein P in der Entwicklung und Reifung der fötalen Lunge. Dennoch bleibt die Funktion des Selens bei der Lungenreifung funktionell unklar.

Interessant ist ferner die nicht vorhandene Expression von SePP im fötalen Gehirn, was deutlich von unseren Erwartungen abweicht. Leider liegen auch hier keinerlei Angaben über das Schwangerschaftsalter des Feten, dessen Gewebe mittels MTE analysiert wurde, vor. In unseren immunhistochemischen Färbungen konnten wir zeigen, dass in vielen Neuronen des untersuchten Gehirns eines Frühgeborenen immunhistochemisch SePP deutlich nachweisbar ist. Wir gehen davon aus, dass dieses SePP durchaus auch lokal synthetisiert wird, so dass das SePP-Transkript zu erwarten gewesen wäre. Zu diskutieren wäre hier, ob die Menge des Transkripts letztlich in der Transkript-Menge der übrigen Neuronen und der Gliazellen untergeht und dadurch nicht nachweisbar wäre, oder ob ein nicht repräsentatives Gehirnareal für den MTE-Array aufgearbeitet wurde. Hier bedarf es weiterer Untersuchungen, am ehesten auf der Basis einer In-Situ-

Hybridisierung. Untersuchungen an Ratten<sup>112</sup> konnten zeigen, dass sich Selen bei Supplementation der trächtigen Mütter im Cerebellum, dem Cortex cerebri, dem Hippocampus und dem Hypothalamus anreichert. Dies deckt sich mit den Ergebnissen unserer immunhistochemischen Untersuchungen.

Die SePP-Expression des fötalen Herzens ist im Vergleich zum adulten Herzen deutlich geringer. Zum Thema Selen und fötaler Herzentwicklung gibt es bislang sehr wenige Veröffentlichungen, so dass eine ausreichende Diskussionsgrundlage nicht besteht und sicherlich weitere Untersuchungen von SePP im Herzen notwendig und vielversprechend sind.

### 4.1.6 SePP-Expression tracheobronchial

Die SePP-Expression und deren mögliche Bedeutung für die Differenzierung der fötalen bzw. früh-postpartalen Lunge wurden bereits bei den fötalen Organsystemen diskutiert. Die adulte Lunge zeigt im Gegensatz zu der fötalen Lunge in unseren MTE-Experimenten eine eher geringe Expression von SePP mRNA. In den ISH weist das Alveolarepithel zum Teil eine geringe Positivität auf. In der Alveolarwandung liegen vereinzelt deutlich positive Zellen, am ehesten Myofibroblasten entsprechend. Das Bronchialepithel bleibt negativ.

Die Expression von SePP in der humanen Lunge sowie der Rattenlunge wurde bereits in Northern-Blot-Studien gezeigt<sup>60</sup> und bestätigt damit unsere Ergebnisse. Die Funktion des SePP in der Lunge ist unklar. Jedoch konnte eine kürzlich veröffentlichte Studie<sup>113</sup> an Myofibroblasten von Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose zeigen, dass Myofibroblasten dieser Patienten einen erhöhten Gehalt an Lipidhydroperoxiden haben. Bei der Untersuchung der Myofibroblasten auf Expressionsebene mittels cDNA-Arrays konnte festgestellt werden, dass SePP zu den am höchsten hochregulierten Genen zählt. Dies könnte darauf hinweisen, dass die in unseren ISH-Experimenten in der Alveolarwandung erkennbaren positiven Zellen tatsächlich Myofibroblasten sind. Zur definitiven Bestätigung sind hier jedoch weitere Experimente mit dem Ziel der Kollokalisation des SePP-Transkripts sowie typischer myofibroblastärer Proteine notwendig.

Untersuchungen an Ratten konnten zeigen, dass ein Selen-Mangel zu einer reduzierten Resistenz der Lunge gegenüber Hyperoxie führt, häufig mit vermehrter Ausbildung eines Lungenödems sowie Pleuraödemen<sup>114,115</sup>, so dass ein Radikal-protektiver Schutz der Lunge durch Selen wahrscheinlich ist.

### 4.2 Expression pGPX

Die pGPX ist ein weiteres aktiv ins Blut sezerniertes Selenoprotein. pGPX liegt im Serum oder Plasma in vergleichbaren Konzentrationen zu SePP vor, trägt jedoch aufgrund des geringeren Selengehaltes nur einen Bruchteil zum zirkulierenden Selenpool bei. pGPX kann Hydroperoxide und Lipidhydroperoxide reduzieren. Als Substrat dient dabei Glutathion, Thioredoxin und Glutaredoxin<sup>116</sup>. Die pGPX- Expression ist gewebspezifisch und findet sich in Leber, Niere, dem Herzen, der Schilddrüse und anderen Organen<sup>117</sup>. Die Niere ist der Hauptproduktionsort der plasmatischen pGPX<sup>118</sup> und enthält den höchsten Level an pGPX-mRNA. Die mRNA findet sich dabei v.a. im proximalen Tubulus<sup>119</sup>. Die pGPX wird von der produzierenden Zelle ins Kolloid der Schilddrüsenfollikel<sup>120</sup>, ins Serum, die Extrazellulärflüssigkeit, die Milch und andere Körperflüssigkeiten sezerniert<sup>121</sup>.

Die Verteilung im Bereich von Gewebegrenzstrukturen weist auf eine mögliche Barriere-Funktion von pGPX gegenüber Hydroperoxiden hin. Ferner wird diskutiert, dass die pGPX über die Beeinflussung des RedOx-Statuses des extrazellulären Milieus einen dämpfenden Einfluss auf die Aktivierung der Lipoxygenase im Rahmen des „oxidative burst“ von aktivierten Phagozyten hat und damit letztlich die Freisetzung von Zytokinen dämpft bzw. verhindert<sup>121</sup>.

In unseren Experimenten bestätigt sich die bekannte Verteilung der pGPX. Hinweise auf ein mögliches Donor-Akzeptor-Verhältnis zwischen pGPX- und SePP-produzierenden Zellen ergeben sich nicht.

### 4.3 SePP-Expression im humanen Gehirn

Es konnte bereits relativ früh gezeigt werden, dass das Gehirn bei der Selenversorgung im Vergleich zu den anderen Selen-abhängigen Geweben eine bevorzugte Stellung einnimmt, und dass dessen Selenversorgung auch bei Selenmangel lange aufrechterhalten wird<sup>122</sup>.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass SePP sowie andere Selenoproteine im Gehirn eine wichtige Rolle spielen<sup>123</sup>. In den Untersuchungen mittels MTE-Array konnten wir eine differentielle Expression von SePP in unterschiedlichen Hirnarealen zeigen.

#### 4.3.1 Methodik Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine weit verbreitete und auch Routine-mäßig eingesetzte Methode zum Nachweis und der relativen Quantifizierung von Proteinen. Die Validität der Immunhistochemie steht und fällt dabei mit der Spezifität des eingesetzten Antikörpers.

In unseren Versuchen haben wir einen polyklonalen Antikörper verwendet, der kommerziell durch eine von uns beauftragte Firma durch eine Immunisierung von Kaninchen mit einem

synthetischen Peptid aus der humanen SePP-Sequenz hergestellt wurde. Die Spezifität des Antikörpers wurde zunächst in Western-Blot-Experimenten überprüft und verifiziert<sup>84,85</sup>. Die Färbeintensität in den unterschiedlichen Hirnarealen unterliegt in unseren Färbungen mäßiggradigen Schwankungen. Dies kann sicherlich zu einem kleinen Teil auf einen unterschiedlichen Selenstatus der Patienten hinweisen. Eine weitere, die Färbeintensität beeinflussende Störgröße ist bei postmortalem Gewebe natürlich stets das Intervall zwischen Tod und Gewebsentnahme und anschließender Gewebsfixation. Diese Faktoren scheinen in unseren Färbungen auch Einfluss auf die Hintergrundfärbung zu besitzen. Ein weiterer nicht zu vernachlässigender Faktor bei Enzym-gekoppelten Nachweissystemen ist die Reaktionstemperatur, in unserem Fall also die Raumtemperatur. Unsere Färbungen wurden im Zeitraum von ca. einem  $\frac{3}{4}$  Jahr durchgeführt, so dass die Temperaturschwankungen in dem nicht klimatisierten Labor durchaus bis maximal 10° Celsius betragen konnten.

Bei jeder Immunfärbung besteht die Gefahr, dass der eingesetzte Antikörper unspezifisch an Gewebsstrukturen bindet und dadurch ein falsch positives Signal entsteht. Dies gilt im Gehirn im Speziellen für die Myelinscheiden. Daher wäre es sinnvoll unsere hier gezeigte zerebrale Proteinverteilung neben den orientierend durchgeführten Western Blot-Untersuchungen mit anderen Methoden (z.B. Myelinaufreinigung) zu bestätigen.

Die immunhistochemischen Färbungen zeigen distinkte Signale bei geringer bis mäßiggradiger unspezifischer Hintergrundfärbung. Die hohe Intensität der Immunfärbung ist bei unseren Färbungen nicht mit einer absoluten starken Expression von SePP gleichzusetzen, da das von uns eingesetzte Immunfärb-Kit durch Verstärkungsmechanismen auch gering exprimierte Proteine nachweisen kann.

### 4.3.2 SePP in Neuronen

Wir konnten im Rahmen dieser Studie zeigen, dass SePP in vielen Neuronen des Gehirns und des Rückenmarks immunhistochemisch nachweisbar ist. Dabei fällt auf, dass v.a. große Neurone (sog. Golgi-Typ I-Neurone) ein deutliches SePP-Signal zeigen (vgl. Tabelle 10). Lokalisationspezifisch weisen auch kleinere (Inter-)Neurone eine positive SePP-Immunfärbung auf. Deutlich positiv kommen z.B. die großen Pyramidenzellen des Cortex sowie die Motoneurone im Rückenmark zur Darstellung.

Das SePP-Signal zeigt dabei eine zytoplasmatische Verteilung, wobei insbesondere der Antikörper SePP2, welcher z.T. das Signalpeptid von SePP abdeckt, SePP wahrscheinlich im Bereich des endoplasmatischen Retikulums bzw. Golgi-Apparats anfärbt, so dass SePP in diesen Neuronen anscheinend auch neu synthetisiert und evtl. auch ins Interstitium exportiert wird. Ferner zeigen

sich fokal, z.B. im Thalamus, punktuell Neuronen-nah im Neuropil granuläre SePP-Signale, die möglicherweise den Synapsen zuzuordnen sind.

In Untersuchungen von Burk et al.<sup>124</sup> gelang es primär nicht, SePP im Gehirn immunhistochemisch darzustellen. Ursächlich hierfür wurde diskutiert, dass das zerebrale SePP evtl. trunkiert ist oder andere antigenetisch relevante Alterationen aufweist<sup>123</sup>. In unseren Versuchen wurde daher ein hochsensitives Biotin-Streptavidin basiertes Nachweissystem verwendet, das auch den Nachweis von sehr geringen Mengen von SePP ermöglicht.

Studien an Neuronen-Zellkulturen konnten zeigen, dass Selen für das Überleben von Neuronen in Zellkulturen essentiell ist. Dabei zeigte sich, dass v.a. ein SePP-like Protein (bovines Homolog von SePP) aus dem Rinderserum das Überleben von Zellkultur-Neuronen am effektivsten fördert<sup>33</sup>. In den beiden beschriebenen SePP-KO-Maus-Modellen wiesen die Mäuse deutliche Gangstörungen und Ataxien auf<sup>63,97</sup>, was auf eine Störung der Funktion der an der motorischen Koordination beteiligten Neurone aber wohl auch auf eine Störung der langen Bahnsysteme im Rückenmark zurückzuführen sein dürfte. Insbesondere die Purkinje-Zellen des Kleinhirns, welche in unseren Immunfärbungen SePP positiv sind, könnten hierbei eine wichtige Rolle spielen<sup>125</sup> und die Defizite der KO-Maus in den motorischen Tests (z.B. Rotarod Test) erklären.

Peters et al. fanden ferner heraus, dass in der KO-Maus in der Ca1-Region des Hippocampus eine Störung der Synapsenfunktion bzw. der postsynaptischen Signaltransduktion vorliegt<sup>125</sup>. Des Weiteren wurde ein schwerer Defekt der synaptischen Plastizität im Hippocampus beschrieben.

Peroxinitrit ist ein hochreaktives Radikal, das aus der Reaktion von NO mit einem Superoxid-Anion ( $O_2^-$ ) entsteht. NO dient im ZNS als Neurotransmitter und wird im Rahmen von entzündlichen Veränderungen durch Hochregulation der NO-Synthase vermehrt produziert. Der vermehrte oxidative Stress durch Peroxinitrit führt zu Veränderungen von Proteinen, Lipiden und DNA<sup>126</sup>. SePP kann die schädliche Wirkung von Peroxinitrit reduzieren<sup>67</sup> und könnte damit möglicherweise auf Neuronen protektiv wirken.

### 4.3.3 SePP in Oligodendrozyten & der Myelinscheide

Bereits in Untersuchungen im Jahre 1991 konnte Clausen et al. mit Hilfe von radioaktivem Selen in Fraktionen des Gehirns von Wistar Ratten nachweisen, dass radioaktives Selen in der Myelin-Fraktion zu finden ist, und dass radioaktives Selen mit einer GPX-Aktivität assoziiert ist.

In den von uns durchgeführten Immunfärbungen gegen SePP zeigte sich in den auf- und absteigenden langen Bahnsystemen des Rückenmarks eine teils sehr deutliche Färbung im Bereich



der Myelinscheide, welche offenbar mit dem Kaliber der Myelinscheide korreliert. So zeigten Nervenfasern mit kleinem Durchmesser oft nur eine geringe Färbeintensität, während parallel verlaufende große Nervenfasern eine deutliche Färbung aufwiesen. Auch im Gehirn selbst zeigen die großen Faserbahnen der Capsula interna ein inhomogenes Bild, wobei hier relativ viele Fasern mit geringer Färbeintensität überwiegen. Die Färbeintensität nimmt dabei bei den großen intrazerebralen Bahnsystemen eindrucksmäßig von cranial nach caudal zu. Ebenfalls eine deutliche Färbung zeigen die Nervenscheiden der Neuronen des Nervus opticus und des Nervus hypoglossus. Diese spezifische Verteilung des SePP in den Myelinscheiden weist auf eine spezifische Funktion von SePP in den Myelinscheiden bzw. den Axonen hin (vgl. Abbildung 56). Valentine et al.<sup>127</sup> konnten am SePP-KO-Modell zeigen, dass das Fehlen von SePP im ZNS zu einer axonalen Degeneration im Hirnstamm und Rückenmark führt. Dabei scheinen die Motoneuronen in ihrer Funktion und Morphologie nicht auffallend alteriert zu sein, vielmehr scheint die funktionelle Schädigung im mittleren und distalen Axon-Segment zu liegen. Bei der Untersuchung der Axone des Hirnstamms im Elektronenmikroskop zeigt sich eine vermehrte Ansammlung von Zellorganellen, wie sie typisch ist für Störungen des schnellen axonalen Transportes. Ähnliche Veränderungen konnten im Rahmen einer experimentellen Vitamin-E-Defizienz bei Ratten beobachtet werden<sup>128</sup>. Diese Befunde scheinen einen Hinweis darauf zu geben, dass der axonale Transport offenbar durch eine Störung der RedOx-Balance im Axon gestört ist.

Die wahrscheinliche Lokalisation der axonalen Störung in der KO-Maus und die von uns nachgewiesene Lokalisation von SePP im Bereich der langen Bahnsysteme korreliert gut mit den motorischen Symptomen der SePP-KO-Maus<sup>74</sup>. Dass ein schwerer Selen-Mangel auch beim Menschen zu motorischen Störungen bzw. Störung der motorischen Entwicklung führen kann, konnte Ferreira Azevedo in einem Fallbericht eines 12-jährigen Mädchens mit Mutation im SBP2-Gen nachweisen<sup>129</sup> (vgl. Abbildung 3).

## Diskussion

Zelltyp	Subtyp		SePP-Färbung	Färbemuster
Neuronen	Interneurone		- - +	diffus zytoplasmatisch
	Motoneurone		+++++	diffus & granulär zytoplasmatisch
	Purkinje-Zellen (Kleinhirn)		+++	diffus zytoplasmatisch
	Pyramidenzelle (Cortex)		++++	diffus zytoplasmatisch, wenig granulär
Gliazellen	Oligodendrozyten	Zellkörper	-	diffus
		Nervenscheide	- - +++	
	Astrozyten	ruhend	-	granulär zytoplasmatisch
		aktiviert	++	
	Mikrogliazellen		-	granulär zytoplasmatisch
	Bergmann-Glia (Kleinhirn)		++	
	Ependymzellen		+++++	
Plexus choroideus (Epithel)		+++++	diffus zytoplasmatisch	

Tabelle 10: Zusammenfassung der unterschiedlichen zerebralen Zellen und deren SePP-Immunreaktivität

### 4.3.4 SePP bei multipler Sklerose

Die multiple Sklerose ist eine relativ häufige, schubförmig verlaufende autoimmune Erkrankung des zentralen Nervensystems. Histopathologisch finden sich fokal, diffus im Zentralnervensystem verteilt liegende, durch Zerfall der Myelinscheide entstandene Entmarkungsherde mit im floriden Stadium nachweisbaren Infiltraten von autoreaktiven Lymphozyten und Makrophagen. Sekundär kommt es meist zur Ausbildung von gliösen Narben sowie sekundärer Destruktion der Axone<sup>130</sup>. Die Ätiologie der MS ist bislang noch unklar, doch geht man heute von einer multifaktoriellen Pathogenese aus. So besteht ein eindeutiger genetischer Zusammenhang zwischen bestimmten HLA-Typen und der Häufigkeit von MS. Des Weiteren diskutiert wird ein Zusammenhang mit einer viralen Infektion mit Bildung autoreaktiver Antikörper gegen Myelinproteine. Eine ursächliche Pathogenese durch ROS erscheint unwahrscheinlich, wenngleich durch die Einwanderung und Aktivierung der Makrophagen bzw. der Mikrogliazellen im Rahmen des sog. „oxidative burst“ ausgedehnt Radikale freigesetzt werden, und diese lokal im Bereich der Entmarkungsherde Schaden anrichten können. So erscheint es wahrscheinlich, dass Selen bzw. Selenoproteine zwar keinen Einfluss auf die Entstehung der Entmarkungsherde haben, dass jedoch möglicherweise der Entzündungsverlauf bzw. die Regeneration durch den antioxidativen Einfluss von Selen bzw. SePP beeinflusst werden kann. Einige antioxidative Wirkstoffe konnten bereits im Tiermodell und z.T. auch am Menschen positiv getestet werden<sup>56</sup>. Zu therapeutischen Ansätzen mit Selen liegen nur relativ wenige Daten vor.

Die von uns untersuchten zerebralen Schnittpräparate eines Patienten mit multipler Sklerose zeigen

mehrere ältere Entmarkungsherde. Erwartungsgemäß fehlen im Bereich dieser Herde die Myelinscheiden der Axone sowie die damit verbundene SePP-Immunreaktivität weitestgehend. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen zeigen, dass im Bereich der Entmarkungsherde in der Umgebung der Axone kein SePP mehr vorhanden ist und somit auch die antioxidative Wirkung von SePP im Sinne einer Lipidhydroperoxid-Peroxidase gerade in dem Bereich fehlt, in dem durch die Entzündung ausgedehnt ROS freigesetzt werden. Ein bekanntes Phänomen in Entmarkungsherden der MS ist die protrahierte Schädigung und das Verschwinden der Axone auch bei weitestgehend abgeklungener Entzündung. Ursächlich hierfür könnte ein fehlender Schutz der Axone vor ROS durch SePP oder andere abgeleitete Selenoenzyme sein (vgl. Abbildung 56). Aus Zellkulturexperimenten an Oligodendrozyten ist bekannt, dass Selen essentiell für die Differenzierung junger Oligodendrozyten ist. Evtl. könnte daher Selen bzw. SePP auch für die Remyelinisierung wie sie z.T. im Bereich der Entmarkungsherde auftritt, essentiell und förderlich sein.

### 4.3.5 SePP in Astrozyten

Die Gruppen von Steinbrenner und Yang konnten zeigen, dass Astrozyten konstitutiv SePP synthetisieren und z.T. auch sezernieren<sup>131,132</sup>. Astrozyten sind für die Regulation und Aufrechterhaltung des zerebralen extrazellulären Milieus und damit auch der RedOx-Balance zuständig. In unseren Färbungen zeigten sich fokal z.B. im Bereich des Hippocampus Astrozyten mit vergrößerten Zellkernen, morphologisch passend zu aktivierten Astrozyten. Diese Astrozyten wiesen intrazytoplasmatisch grobgranuläre SePP-Signale auf. Ob es sich hier um Lysosomen handelt, die aus dem Extrazellulärraum aufgenommenes SePP in die Zelle importieren, um Selen-abhängige Proteine (z.B. GPX) zu synthetisieren, oder ob es sich um astrozytär synthetisiertes SePP in Vesikeln für den Export in den Extrazellulärraum handelt, lässt sich an den vorliegenden Färbungen nicht beurteilen. Zur Klärung dieser Fragestellung würden sich kolokalisierende Färbungen gegen Proteine der Lysosomen bzw. der sekretorischen Vesikel anbieten.

### 4.3.6 SePP bei Morbus Alzheimer

Im untersuchten Hirngewebe der Alzheimer-Patienten zeigten sich fokal sehr vereinzelt Neuronen im Bereich des Gyrus frontalis, dem okzipitalen Cortex, im Hippocampus (CA2-4), dem Praesubiculum und der Insula mit intrazytoplasmatischen, teils granulären SePP-positiven Einschlüssen, bei denen es sich z.T. um sog. Neurofibrillary Tangles handeln kann. Die Verteilung korreliert mit der neuropathologisch berichteten Verteilung der Alzheimer-Veränderungen. Bellinger et al. konnten in Post-Mortem-Studien am Gehirn von Alzheimer-Patienten am

konfokalen Mikroskop eine Kolokalisation von SePP mit Amyloid- $\beta$ -Protein in Alzheimer Plaques und Neurofibrillary Tangles zeigen<sup>133</sup>. Ob es sich hierbei tatsächlich um eine primäre Störung im SePP-Stoffwechsel handelt oder ob es sich um ein sekundäres Phänomen im Sinne einer unspezifischen Bindung von SePP an Amyloid- $\beta$  handelt, muss in weiteren Studien geklärt werden. Veränderungen im Plasma-Selen- bzw. Liquor-Gehalt ließen sich bei Alzheimer Patienten nicht nachweisen<sup>52</sup>.

Die genaue Pathogenese der Alzheimer Erkrankung ist trotz ausgedehnter Forschungsbemühungen weiter unklar. Eine zentrale Rolle scheint das neurotoxische Protein Amyloid- $\beta$  einzunehmen. Dieses entsteht aus dem sog. APP (Amyloid- $\beta$  Precursor Protein) unter Einwirkung der  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Secretase. Zerebrale Ischämien stellen einen bekannten Risikofaktor für die Entstehung von M. Alzheimer dar. Neuere Studien haben gezeigt, dass es im Rahmen der Hypoxie zur Freisetzung von ROS aus der mitochondrialen Atmungskette kommt mit sekundärer direkter Hochregulation der  $\beta$ -Secretase sowie zusätzlicher Induktion des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ ). HIF-1 $\alpha$  führt wiederum mit Verzögerung zur vermehrten Expression der  $\beta$ -Secretase<sup>134</sup>. Somit scheint auch bei der Genese der Alzheimer-Erkrankung ein wesentlicher pathogenetischer Schritt abhängig von ROS.

### 4.3.7 SePP bei Morbus Parkinson

In den von uns durchgeführten SePP-Immunfärbungen am Gehirn von Patienten mit M. Parkinson ließen sich keine auffallenden Alterationen im Gehalt an SePP finden, insbesondere fanden sich keine offensichtlichen Veränderungen im Bereich der Substantia nigra oder des Striatums. Die Neuronen des Nucleus caudatus zeigen teils keine, teils bis zu mäßiggradige SePP-Immunreaktivität. Die Neuronen des Putamens sowie der Substantia nigra zeigen z.T. eine allenfalls geringgradige Reaktivität.

Weit akzeptierte Theorien zur Pathogenese des M. Parkinson basieren auf der Annahme, dass die Degeneration der dopaminergen Neurone der Substantia nigra sowie des Striatums auf vermehrtem oxidativen Stress beruhen<sup>41</sup>. Zur Entstehung des oxidativen Stresses werden unterschiedliche Pathomechanismen diskutiert, z.B. Entstehung von ROS durch erhöhten Eisengehalt (Fenton Reaktion), Entstehung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch die Monoaminoxidase B (MAO-B) beim Dopaminabbau etc.. Klinische Untersuchungen konnten bei M. Parkinson-Patienten keine auffallenden Veränderungen im Selengehalt bzw. der GPX-Aktivität im Blutplasma oder im Selengehalt im Liquor cerebrospinalis nachweisen<sup>46</sup>. In unterschiedlichen Parkinson-Tiermodellen konnte ein protektiver Einfluss von Selen, am ehesten durch eine vermehrte Aktivität der GPX, sowie ein schädlicher

Einfluss von Selenmangel gezeigt werden<sup>44,45,135</sup>.

Unsere SePP-Immunfärbungen zeigen im Bereich der betroffenen Regionen eine allenfalls geringgradige Immunreaktivität, die sich jedoch bei Parkinson-Patienten und gesunden Individuen nicht auffallend unterscheidet. Da es sich bei SePP um ein antioxidativ wirksames Protein handelt und dieses Protein im Bereich der vulnerablen Neuronengruppen weitestgehend fehlt, kann hierüber generell eine erhöhte Vulnerabilität dieser Neuronen gegenüber ROS begründet liegen.

### 4.3.8 SePP bei amyotropher Lateralsklerose

Die Entdeckung, dass bei einem Teil der familiären Form der ALS eine Mutation der Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase (SOD1) zu finden ist<sup>53,54</sup>, also im Gen eines Enzyms, das am Radikalstoffwechsel beteiligt ist, legt die Vermutung nahe, dass auch Veränderungen bei anderen Enzymen des Radikalstoffwechsels eine Rolle bei der Pathogenese spielen könnten. Insbesondere die selenhaltige GPX-1, die das von der SOD1 produzierte Wasserstoffperoxid zu Wasser abbaut, und damit „Downstream“ der SOD1 agiert, ist in dieser Beziehung interessant.

Immunhistochemische Studien konnten zeigen, dass unter anderem GPX1 im Laufe der Krankheitsentwicklung hochreguliert wird, jedoch in späteren Krankheitsphasen wieder hinunterreguliert wird, und damit evtl. ein Zusammenhang zwischen dem deregulierten RedOx-Haushalt und dem letztlich folgenden Untergang des Motoneurons besteht<sup>136,137</sup>.

In unseren Färbungen zeigt sich in den Motoneuronen des Rückenmarks und des Hirnstamms eine eher geringe zytoplasmatische SePP-Immunreaktivität. Eindrucksmäßig erscheinen die Motoneurone im Rückenmark der ALS-Patienten im Bereich von Motoneuronen mit Ubiquitin-positiven Einschlüssen schwächer gefärbt. Ob es sich hier um ein Sekundärphänomen im Rahmen eines ohnehin alterierten Proteinstoffwechsels bei fortgeschrittener ALS handelt, oder ob hier ein pathogenetischer Zusammenhang besteht, muss in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden. Möglicherweise wird auch SePP im Rahmen der beschriebenen Hochregulation der RedOx-aktiven Enzyme vermehrt abgebaut und das freigesetzte Selen für die Synthese der Selen-abhängigen Enzyme (z.B. GPX1) verwendet. Alternativ könnten die Färbungen aber auch einen erhöhten SePP-Turnover mit vermehrter Aufnahme darstellen. Die Immunhistochemie ist allerdings in dieser Form leider nicht geeignet, hier dynamische Prozesse und deren Ausmaß aufzuklären. Auffallend erscheint bei vielen Neuronengruppen im Rückenmark und Hirnstamm das Fehlen der typischen grobgranulären SePP-Immunreaktivität. Diese grob granulären Einschlüsse sind höchstwahrscheinlich SePP im endoplasmatischen Retikulum oder Golgi-Apparat zuzuschreiben. Hierfür spricht auch die vermehrte Färbung dieser Granula mit dem SePP2-

Antikörper (schließt Signalpeptid mit ein). Diese Tatsache spricht dafür, dass die Neuronen in den vorliegenden Schnitten des Rückenmarks weniger SePP synthetisieren und weniger SePP in den Extrazellulärraum abgeben. Auffallend sind außerdem die vermehrten und aktivierten Astrozyten mit feingranulären SePP-Zytoplasmaeinschlüssen.

Der SePP-Gehalt scheint somit unter anderem in den von der ALS betroffenen Neuronen verringert zu sein. Ob es sich hierbei um einen Nebeneffekt eines ohnehin gestörten neuronalen Stoffwechsels handelt, oder ob es sich um spezifische bzw. funktional relevante Veränderungen handelt, sollte in weiterführenden Studien näher betrachtet werden.

### 4.3.9 SePP in der Hirnentwicklung

Schomburg et al.<sup>72,73</sup> konnten im KO-Maus-Modell zeigen, dass der beschriebene pathologische neurologische Phänotyp der KO-Maus durch Selen-Substitution ab dem Zeitpunkt der elterlichen Paarung oder ab der Geburt verhindert werden kann. Setzt die Selen-Substitution zu einem späteren Zeitpunkt der Hirnentwicklung ein, so bildet sich kein KO-Maus typisches progressives Krankheitsbild, sondern der Status quo der neurologischen Defizite bleibt stabil erhalten, bildet sich jedoch auch nicht zurück. Wird die Selensubstitution eingestellt, so entwickelt sich ab diesem Moment ein progressives Krankheitsbild. Ursächlich diskutiert wurde hier ein lokaler Mangel an Trijodthyronin, da auch die Deiodasen Selen-abhängige Enzyme sind. Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Expression der Deiodase Typ II in der KO-Maus nicht alteriert ist<sup>138</sup>.

In unseren Immunfärbungen am humanen Gehirn konnten wir zeigen, dass SePP offensichtlich in oder zumindest im Bereich der Myelinscheide lokalisiert ist. Die Myelinscheiden der Axone des ZNS sind im Normalfall stabile, von Oligodendrozyten gebildete und wahrscheinlich weitestgehend stoffwechsellinaktive Formationen, welche über die Zeit einen sehr geringen Umbau aufweisen. Selen bzw. SePP, das in Myelinscheiden eingebaut ist, dürfte somit für längere Zeit dort fixiert sein. Huang et al. konnten in einer Myelinaufreinigung nachweisen, dass offenbar in der Myelinscheide eine Selen-abhängige GPX-Aktivität zu finden ist<sup>139</sup>. Möglicherweise könnte es sich bei dieser GPX-Aktivität um SePP handeln, welches nachweislich eine GPX-Funktion beim Abbau von Phospholipidhydroperoxiden hat<sup>68</sup>. Des Weiteren wäre natürlich möglich, dass auch andere GPX im Myelin lokalisiert sind. Die Lokalisation von GPX bzw. SePP in der Myelinscheide könnte einen wichtigen Schutz gegen Phospholipidhydroperoxide in den dicht gepackten Membranstapeln der Myelinscheide darstellen.

Die Lokalisation in der Myelinscheide könnte eine gute Erklärung dafür bieten, warum sich die neurologischen Defizite der KO-Maus nach verspäterer Selen-Substitution und damit zumindest

## Diskussion

partiell abgeschlossener Myelinisierung der Nerven, nicht mehr zurückbilden. Die Tatsache, dass sich jedoch auch nach Abschluss der Myelinisierung durch Absetzen der Selen-Substitution der typische KO-Phänotyp einstellt, weist darauf hin, dass SePP noch weitere wichtige Funktionen hat. Valentine et. al.<sup>127</sup> konnten an elektronenoptischen Untersuchungen zeigen, dass in der SePP-KO-Maus in den mittleren und distalen Segmenten der Axone des Hirnstamms und des Rückenmarks offenbar eine Störung des sog. schnellen anterograden axonalen Transportes auftritt, und es letztlich zu einer Dystrophie der Axone kommt. Eine Vermehrung von F2-Isoprostanen, als Hinweis auf eine vermehrte Lipid-Oxidation, ließ sich jedoch nicht nachweisen.

Ähnliche Veränderungen der Axone ließen sich bei Vitamin-E-defizienten Ratten nachweisen, so dass pathogenetisch diskutiert werden muss, ob nicht doch eine Beeinträchtigung des Radikalstoffwechsels und damit des RedOx-Haushalts bei Selen- bzw. Vitamin E-Mangel ursächlich vorliegen könnte.

Im Rahmen unserer Studie wurden zerebrale Schnittpräparate eines etwa ½ Jahre alten Frühgeborenen immunhistochemisch untersucht. In diesem Alter ist die Myelinisierung der Axone nicht abgeschlossen. Interessanterweise konnten auch hier keine SePP-positiven Oligodendrozyten-Zellkörper nachgewiesen werden. Dies wirft die Frage auf, wie SePP in die Myelinscheide gelangt. Wie bereits eingangs erwähnt, zeigen Oligodendrozyten in Zellkultur ohne Selen-Zusatz eine fehlende Hochregulation der Myelin-assoziierten Gene und zeigen damit eine fehlende Differenzierung vom jungen zum reifen Oligodendrozyten<sup>34</sup>. Auch konnte hier gezeigt werden, dass Selen essentiell während einer sensiblen Phase in der Reifung der jungen Oligodendrozyten vorhanden sein muss, ansonsten wurden die Myelin-assoziierten Gene dauerhaft herunterreguliert, und die Differenzierung zum reifen Oligodendrozyten war verhindert.

Die Tatsache, dass die Neuronen, im Speziellen auch die Neuronen, welche die Axone der langen auf- und absteigenden Bahnen im Rückenmark- und Hirnstamm aufbauen, in unseren Färbungen auch und im speziellen beim untersuchten Säugling deutlich SePP positiv sind, lässt die Hypothese aufkommen, dass SePP, das von Neuronen gebildet wird, entlang des Axons zur Differenzierung und Reifung von Oligodendrozyten und damit der Myelinscheide beiträgt (vgl. Abbildung 56). Hierzu passend wäre die elektronenoptisch ausgedünnt beschriebene Myelinschicht der Hirnstammmaxone im KO-Maus-Modell<sup>140</sup>. Zur Sicherung dieser Hypothese sind aber natürlich noch weitere Untersuchungen notwendig.

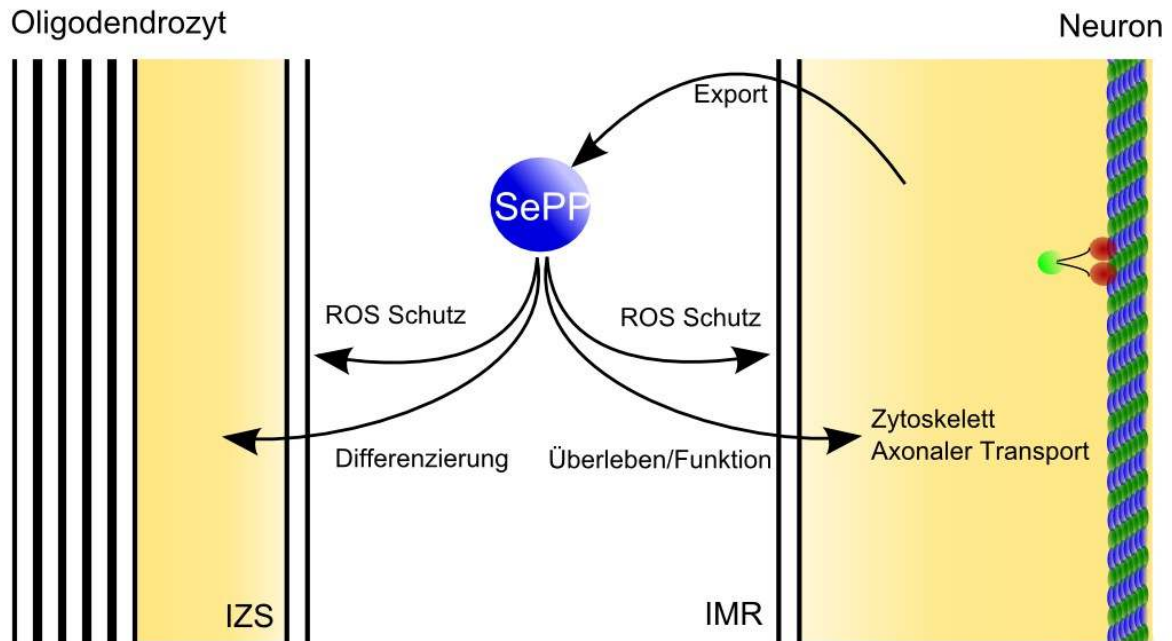


Abbildung 56: Hypothetische Funktionen/Effekte von SePP im Bereich der Myelinscheide (links dichtgepacktes Myelin, ganz rechts Mikrotubulus mit Kinesin schematisch) Abk.: IMR = Intermembranraum, IZS = innerer Zytoplasmasaum

Weiterhin auffallend bei unseren immunhistochemischen Färbungen an den Schnittpräparaten des Säuglings sind die granulären Signale, die im Kleinhirn anscheinend entlang des Dendritenbaumes und im Bereich der kortikalen Neurone entlang von Dendriten-artig verzweigten Strukturen zu finden sind. Primär wurden diese Strukturen als Artefakte aufgefasst, es ließen sich diese jedoch auch in der Wiederholungsfärbung erneut ebenso darstellen. Diese Signale lassen sich keinen bestimmten zellulären Strukturen im Neuropil zuordnen, so dass sicher erneute kolokalisierende Untersuchungen (z.B. mit Proteinen des Myelins, Synapsen oder des Dendritenbaumes) notwendig sind. Es sollte geprüft werden, ob diese SePP-Signale mit dem Bereich der Synaptogenese zusammenfallen. Eher unwahrscheinlich erscheint dagegen im Bereich des Dendritenbaumes der Purkinje-Zellen die Möglichkeit der Myelinbildung mit granulären SePP-Einlagerungen.

#### 4.3.10 SePP und Neurotransmitter

Bislang liegen keine Daten dazu vor, ob es eine Korrelation der Expression von SePP und der Verteilung der Neurotransmitter gibt. Orientierend wurden hierzu aus den Abbildungen in Nieuwenhuys´ „Chemoarchitecture of the Human Brain“<sup>86</sup> die unterschiedlichen Hirnregionen und ihre Transmitter-Verteilung extrahiert und in einer Tabelle zusammengefasst. Letztlich lagen nur zu wenigen Hirnregionen die Angaben zur Transmitter-Verteilung vor (vgl. Abbildung 46). Aus



dieser Zusammenstellung ergab sich kein erkennbarer Zusammenhang zwischen SePP-Expression und dem Vorhandensein eines spezifischen Neurotransmitters. Ob tatsächlich keine eindeutige Korrelation zwischen Neurotransmitter und SePP besteht, muss letztlich anhand neuerer Daten und auch in kolokalisierenden Experimenten abschließend geprüft werden.

### 4.3.11 Mögliche Funktionen von SePP im Gehirn

Die Funktion von SePP im Gehirn bleibt weiterhin größtenteils unklar. Unzweifelhaft dient SePP beim Transport des Selen ins Gehirn als wichtiges Transportvehikel. Welche Funktion SePP jedoch im Neuron selbst wahrnimmt ist unklar. Auch die Lokalisation in der Myelinscheide bleibt funktionell unklar. Die hierarchisch präferentielle Versorgung und gute Retention von Selen im Gehirn in Mangelzeiten wurde in einer Reihe von eleganten interessanten Studien in transgenen Mäusen gezeigt. Diese Studien legen eine entscheidende Bedeutung von SePP im zerebralen Selen-Stoffwechsel nahe. In einem sog. SePP-Zyklus kann neuronal gebildetes SePP als sichere Speicherform außerhalb der Zelle gelagert und bei Bedarf wieder mobilisiert werden<sup>141</sup>. Inwieweit es dabei noch eine enzymatische Funktion erfüllt, oder letztlich nur als Selenpeicher für die Biosynthese der GPX und anderer Selenoproteine fungiert, ist zur Zeit noch unklar. Eine weitere wichtige Funktion könnte SePP bei der Komplexbildung von Schwermetall-Ionen im Gehirn haben, und damit eine wichtige neuroprotektive Funktion wahrnehmen<sup>66</sup>.

Die von uns gezeigte Lokalisation von SePP in der Myelinscheide sowie die pathologischen, im Speziellen ataktischen neurologischen Veränderungen der SePP-KO-Maus geben einen deutlichen Hinweis, dass SePP in der Protektion der Myelinscheiden, offenbar besonders der langen Axone in den Bahnsystemen des Rückenmarks eine entscheidende Rolle spielt. Offenbar scheint hier insbesondere der Schutz vor einer radikalischen Schädigung der Myelinscheide eine Rolle zu spielen. Hierfür sprechen die von Burk et. al. berichteten ultrastrukturellen Veränderungen den Axonen im Hirnstamm, welche Zeichen einer Störung des axonalen Transports aufweisen, einem Phänomen, das man bereits aus anderen Mausmodellen mit Vitamin-E-Mangel ultrastrukturell nachweisen konnte. Ferner besteht ein wichtiger Einfluss von Selen und damit SePP auf die Differenzierung unreifer Oligodendrozyten.

Die immunhistochemische Lokalisation von SePP im Bereich von synaptischen Verbindungen am Zellkörper von Neuronen, z.B. im Thalamus, könnte auf eine mögliche Funktion von SePP im Rahmen der synaptischen Übertragung bzw. der synaptischen Plastizität in diesem Areal hinweisen. Hierfür sprechen auch die Veränderungen der synaptischen Funktion, die Peters et. al. im Rahmen von Untersuchungen der SePP-KO-Maus zeigen konnten<sup>125</sup>. Dies bedarf jedoch

sicherlich noch weiterer Untersuchungen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden viele neue Erkenntnisse über die Expression und Verteilung von SePP gewonnen. Insbesondere der Nachweis von SePP im Gehirn ist im Bezug auf neurodegenerative Erkrankungen, deren Pathogenese über reaktive Sauerstoffradikale (ROS) seit längerem diskutiert wird, sehr interessant und wird sicherlich in weiteren Experimenten weiter untersucht werden müssen. In der vorliegenden Arbeit wurde bereits eine mögliche Kollokalisierung der Alzheimer-Plaques mit SePP vermutet. Diese Kollokalisierung wurde im Folgenden auch im Rahmen einer Immunfluoreszenzstudie der Arbeitsgruppe von M. Berry bestätigt<sup>133</sup>. Ob es sich hier jedoch nur um ein Paraphänomen der Alzheimer-Genese oder ob es sich tatsächlich um ein pathogenetisch relevantes Phänomen handelt, muss in weiteren Studien untersucht werden. Hierbei dürfte die Untersuchung von unterschiedlichen Alzheimer-Stadien von Interesse sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ferner interessante Ergebnisse bei der multiplen Sklerose gefunden. Das Fehlen der SePP-Immunreaktivität in den typischen Entmarkungsherden der multiplen Sklerose könnte eine Erklärung für die fortschreitende Pathogenese der primär nicht geschädigten Axone bieten. Zur weiteren Abklärung dieser Hypothese wären weiterführende immunhistochemische Untersuchungen an Entmarkungsherden im Gehirn und Rückenmark in unterschiedlichen Stadien interessant. Hierbei von großem Interesse wäre natürlich auch die Reaktion der Oligodendrozyten, insbesondere unter Berücksichtigung einer möglichen Remyelinisierung in den Entmarkungsherden. SePP könnte hier im Rahmen der bereits diskutierten neuroprotektiven Funktion und der Funktion als Differenzierungsfaktor der Oligodendrozyten möglicherweise auch einen therapeutischen Ansatzpunkt darstellen. Eine ähnliche protektive Funktion könnte SePP auch bei ischämischen Hirninsulten haben, bei denen, insbesondere im Bereich der nur relativ ischämischen Penumbra ebenfalls eine Pathogenese über ROS diskutiert wird. Hierfür wären immunhistochemische Färbungen an Insulten unterschiedlichen Alters evtl. in Kombination mit Untersuchung der SePP-mRNA, aber natürlich auch der anderen Selenoproteine (z.B. GPX), von großem Interesse.

In der vorliegenden Arbeit wurde ferner erstmals SePP im kindlichen Gehirn untersucht. Hier zeigt sich eine auffallende, strangförmige Verteilung von SePP im Cortex und anderen Lokalisationen, ohne dass eine genauere morphologische Zuordnung des SePP-Signals zu Neuronen bzw. deren Dendriten oder Oligodendrozyten gelingt. Dennoch sollte natürlich in weiteren Untersuchungen versucht werden, diese Immunsignale der Ursprungszelle zuzuordnen. Hierfür bieten sich

## Diskussion

immunhistochemische Koloalisationsstudien von SePP mit MBP (Myelin basisches Protein) bzw. Claudin-11 (Oligodendrozyten) oder Neurofilamenten (Neuronen) an. Evtl. lässt sich dabei ein möglicher, morphologisch lokalisierbarer Einfluss von differenzierenden neuronalen Strukturen auf die Differenzierung der angrenzenden Oligodendrozyten nachweisen. Evtl. könnte SePP auch eine (differenzierende) Funktion in der Synaptogenese haben. Hierauf könnten die immunhistochemischen Befunde im Thalamus hinweisen. Hier fanden sich granuläre SePP-Signale am Zellkörper der Neurone. Diese Befunde könnten mit Hilfe einer Koloalisationsstudie mit immunhistochemischen Markern der Synapsen bzw. der Synaptogenese (z.B. Synaptophorin, Synapsin, Synaptin, Synaptobrevin) weiter abgeklärt werden.

Die Untersuchungen der Expression auf mRNA-Ebene mittels ISH bzw. MTE zeigen ebenfalls interessante Befunde. Bei der Untersuchung der fötalen Expressionswerte hat v.a. die Plazenta einen wichtigen Stellenwert und scheint der Hauptproduktionsort des fötalen SePPs zu sein. Von Interesse wäre hier natürlich der SePP-Serum-Spiegel von Neugeborenen und eine mögliche Korrelation mit einer vorliegenden Plazentapathologie. Diese Fragestellung wird momentan im Rahmen einer Studie in Zusammenarbeit mit der Universitätsfrauenklinik Tübingen am Nabelschnurblut von Neugeborenen untersucht.

## 5 Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-Ethylkarbazol
ALE	Adulte Leber Expression
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
Bp	Base Pairs (Basenpaare)
BSA	Bovines Serum-Albumin
CA1-4	Region 1-4 des Cornu ammonis des Hippocampus
cDNA	complementary DNA
CPM	Counts per Minute
C0t-1-DNA	DNA, angereichert mit hoch- bis mittelhoch repetitiven Sequenzen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Di-Thiothreitol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli (gram-negatives Bakterium)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
GPX	Glutathion-Peroxidase
HA	Hämalaun (Histologische Färbung)
HBSS	Hanks´ balanced salt solution
HCl	Chlorwasserstoff-Lösung (Salzsäure)
HE	Hämatoxylin-Eosion-Färbung (histologische Färbung)
HepG2	humane Zell-Linie eines hepatozellulären Karzinoms
ISH	In-Situ-Hybridisierung
JM-109	E. coli K12-Stamm

## Abkürzungsverzeichnis

KB	Klüver-Barrera (histologische Färbung)
kDa	Kilodalton
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin = Hämocyanin aus der Schlüssellochnapfschnecke
KO	Knock-Out
LB	lysogeny broth (Bakteriennährmedium)
MS	Multiple Sklerose
MTE	Multiple Tissue Expression Array
n(x)	Anzahl von x
NaOH	Natriumhydroxid-Lösung (Natronlauge)
Ncl.	Nucleus (anatomisch)
NO	Stickstoffmonoxid
OH*	Hydroxyl-Radikal
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Ped.	Pedunculus (anatomisch)
PFA	Paraformaldehyd
pGPX	Plasma Glutathion-Peroxidase
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
RPM	Rounds per Minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SDS	sodium dodecylsulfat
Se	Selen
SePP	Selenoprotein P

## Abkürzungsverzeichnis

SSC	saline sodium citrate (Puffer)
SP	Selenoprotein
Taq	Thermus aquaticus (Bakterium)
TBE	Tris-Borat-EDTA (Puffer)
TBS	tris-buffered saline (Puffer)
TEA	Triethanolamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tm	Schmelztemperatur (PCR)
tRNA <sup>sec</sup>	Selenocystein-tRNA
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxin-Reduktase
NTP	Nukleosidtriphosphat
<sup>35</sup> S-UTP	<sup>35</sup> S (Schwefel)-radioaktiv markiertes UTP
UDP	Uridine 5'-triphosphate
ZNS	Zentralnervensystem

**6 Literaturverzeichnis**

1. Berzelius, J.J. Lettre de M. Berzelius à M. Berthollet sur deux métaux nouveaux. *Annales de chimie et de physique* **Vol. 7**, 199-206 (1818).
2. Schwarz, K. & Foltz, C.M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. 1951. *Nutrition* **15**, 255 (1999).
3. Flohe, L., Günzler, W.A. & Schock, H.H. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett* **32**, 132-134 (1973).
4. Rotruck, J.T. u. a. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* **179**, 588-90 (1973).
5. Rotruck, J.T. Relationship of selenium to GSH peroxidase. *Fed. Proc.* 691
6. Forstrom, J.W., Zakowski, J.J. & Tappel, A.L. Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry* **17**, 2639-44 (1978).
7. Chambers, I. u. a. The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the „termination“ codon, TGA. *EMBO J* **5**, 1221-7 (1986).
8. Squires, J.E. & Berry, M.J. Eukaryotic selenoprotein synthesis: mechanistic insight incorporating new factors and new functions for old factors. *IUBMB Life* **60**, 232-235 (2008).
9. Shils, M.E. & Shike, M. *Modern Nutrition in Health and Disease*. (Lippincott Raven: 2005).
10. Swanson, C.A. u. a. Human [74Se]selenomethionine metabolism: a kinetic model. *Am J Clin Nutr* **54**, 917-26 (1991).
11. Van Dael, P., Davidsson, L., Ziegler, E.E., Fay, L.B. & Barclay, D. Comparison of selenite and selenate apparent absorption and retention in infants using stable isotope methodology. *Pediatr Res* **51**, 71-5 (2002).
12. File:L-Selenocysteine.svg - Wikimedia Commons. auf <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:L-Selenocysteine.svg>
13. File:L-Selenomethionine.svg - Wikimedia Commons. auf <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:L-Selenomethionine.svg>
14. Huber, R.E. & Criddle, R.S. Comparison of the chemical properties of selenocysteine and selenocystine with their sulfur analogs. *Arch Biochem Biophys* **122**, 164-73 (1967).
15. Ganichkin, O.M. u. a. Structure and catalytic mechanism of eukaryotic selenocysteine synthase. *J Biol Chem* **283**, 5849-65 (2008).
16. Reilly, C. *Selenium in food and health*. (Springer: 1996).
17. Combs, G.F. & Gray, W.P. Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol. Ther* **79**, 179-192 (1998).
18. Hatfield, D.L., Carlson, B.A., Xu, X.-M., Mix, H. & Gladyshev, V.N. Selenocysteine incorporation machinery and the role of selenoproteins in development and health. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol* **81**, 97-142 (2006).
19. Berry, M.J. Insights into the hierarchy of selenium incorporation. *Nat Genet* **37**, 1162-3 (2005).
20. Abrams, C.K. u. a. Selenium deficiency in long-term total parenteral nutrition. *Nutr Clin Pract* **7**, 175-178 (1992).
21. Zachara, B.A., Salak, A., Koterska, D., Manitius, J. & Wasowicz, W. Selenium and glutathione peroxidases in blood of patients with different stages of chronic renal failure. *J Trace Elem Med Biol* **17**, 291-9 (2004).
22. Yang, D.Y. [Keshan disease--endemic myocardial disease]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* **23**, 445-447 (1984).

23. Nezelof, C., Bouvier, R. & Dijoud, F. Multifocal myocardial necrosis: a distinctive cardiac lesion in cystic fibrosis, lipomatous pancreatic atrophy, and Keshan disease. *Pediatr Pathol Mol Med* **21**, 343-352 (2002).
24. Beck, M.A. u. a. Benign human enterovirus becomes virulent in selenium-deficient mice. *J. Med. Virol* **43**, 166-170 (1994).
25. Alfthan, G. u. a. Selenium supplementation of children in a selenium-deficient area in China: blood selenium levels and glutathione peroxidase activities. *Biol Trace Elem Res* **73**, 113-125 (2000).
26. Moreno-Reyes, R. u. a. Kashin-Beck osteoarthropathy in rural Tibet in relation to selenium and iodine status. *N. Engl. J. Med* **339**, 1112-1120 (1998).
27. Shamberger, R.J. & Frost, D.V. Possible protective effect of selenium against human cancer. *Can Med Assoc J* **100**, 682 (1969).
28. Schrauzer, G.N., White, D.A. & Schneider, C.J. Cancer mortality correlation studies--III: statistical associations with dietary selenium intakes. *Bioinorg Chem* **7**, 23-31 (1977).
29. Clark, L.C. u. a. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA* **276**, 1957-1963 (1996).
30. Lippman, S.M. u. a. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA* **301**, 39-51 (2009).
31. Schweizer, U., Bräuer, A.U., Köhrle, J., Nitsch, R. & Savaskan, N.E. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Res. Brain Res. Rev* **45**, 164-178 (2004).
32. Kaufman, L.M. & Barrett, J.N. Serum factor supporting long-term survival of rat central neurons in culture. *Science* **220**, 1394-6 (1983).
33. Yan, J. & Barrett, J.N. Purification from bovine serum of a survival-promoting factor for cultured central neurons and its identification as selenoprotein-P. *J Neurosci* **18**, 8682-91 (1998).
34. Gu, J., Royland, J.E., Wiggins, R.C. & Konat, G.W. Selenium is required for normal upregulation of myelin genes in differentiating oligodendrocytes. *J Neurosci Res* **47**, 626-35 (1997).
35. Smith, J., Ladi, E., Mayer-Proschel, M. & Noble, M. Redox state is a central modulator of the balance between self-renewal and differentiation in a dividing glial precursor cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10032-7 (2000).
36. Espinosa de los Monteros, A. u. a. Acceleration of the maturation of oligodendroblasts into oligodendrocytes and enhancement of their myelinogenic properties by a chemically defined medium. *Dev Neurosci* **19**, 297-311 (1997).
37. Güvenç, H. u. a. Low levels of selenium in mothers and their newborns in pregnancies with a neural tube defect. *Pediatrics* **95**, 879-82 (1995).
38. Foster, H.D. The iodine-selenium connection: its possible roles in intelligence, cretinism, sudden infant death syndrome, breast cancer and multiple sclerosis. *Med Hypotheses* **40**, 61-5 (1993).
39. Weber, G.F., Maertens, P., Meng, X.Z. & Pippenger, C.E. Glutathione peroxidase deficiency and childhood seizures. *Lancet* **337**, 1443-1444 (1991).
40. Ramaekers, V.T., Calomme, M., Vanden Berghe, D. & Makropoulos, W. Selenium deficiency triggering intractable seizures. *Neuropediatrics* **25**, 217-223 (1994).
41. Jenner, P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann. Neurol* **53 Suppl 3**, S26-36; discussion S36-38 (2003).
42. Kaur, D. u. a. Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity in vivo: a novel therapy for Parkinson's disease. *Neuron* **37**, 899-909 (2003).



43. Kim, H.C. u. a. Protection of methamphetamine nigrostriatal toxicity by dietary selenium. *Brain Res* **851**, 76-86 (1999).
44. Kim, H., Jhoo, W., Shin, E. & Bing, G. Selenium deficiency potentiates methamphetamine-induced nigral neuronal loss; comparison with MPTP model. *Brain Res* **862**, 247-252 (2000).
45. Bensadoun, J.C., Mirochnitchenko, O., Inouye, M., Aebischer, P. & Zurn, A.D. Attenuation of 6-OHDA-induced neurotoxicity in glutathione peroxidase transgenic mice. *Eur. J. Neurosci* **10**, 3231-3236 (1998).
46. Aguilar, M.V. u. a. Cerebrospinal fluid selenium and chromium levels in patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm* **105**, 1245-1251 (1998).
47. Qureshi, G.A., Qureshi, A.A., Memon, S.A. & Parvez, S.H. Impact of selenium, iron, copper and zinc in on/off Parkinson's patients on L-dopa therapy. *J. Neural Transm. Suppl* 229-236 (2006).
48. Guglielmotto, M., Tamagno, E. & Danni, O. Oxidative stress and hypoxia contribute to Alzheimer's disease pathogenesis: two sides of the same coin. *ScientificWorldJournal* **9**, 781-791 (2009).
49. Lovell, M.A., Xie, C., Gabbita, S.P. & Markesbery, W.R. Decreased thioredoxin and increased thioredoxin reductase levels in Alzheimer's disease brain. *Free Radic. Biol. Med* **28**, 418-427 (2000).
50. Mustacich, D. & Powis, G. Thioredoxin reductase. *Biochem J* **346**, 1-8 (2000).
51. Gerhardsson, L., Lundh, T., Minthon, L. & Londos, E. Metal concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* **25**, 508-515 (2008).
52. Meseguer, I. u. a. Cerebrospinal fluid levels of selenium in patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm* **106**, 309-315 (1999).
53. Rabizadeh, S. u. a. Mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis convert superoxide dismutase from an antiapoptotic gene to a proapoptotic gene: studies in yeast and neural cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **92**, 3024-3028 (1995).
54. Magrané, J. u. a. Mutant SOD1 in neuronal mitochondria causes toxicity and mitochondrial dynamics abnormalities. *Hum. Mol. Genet* **18**, 4552-4564 (2009).
55. Kilness, A.W. & Hichberg, F.H. Amyotrophic lateral sclerosis in a high selenium environment. *JAMA* **237**, 2843-2844 (1977).
56. Mirshafiey, A. & Mohsenzadegan, M. Antioxidant therapy in multiple sclerosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **31**, 13-29 (2009).
57. Mohamed, A. u. a. Improvement of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) by thymoquinone; an oxidative stress inhibitor. *Biomed Sci Instrum* **39**, 440-445 (2003).
58. Burk, R.F. & Hill, K.E. Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annu Rev Nutr* **25**, 215-35 (2005).
59. Read, R. u. a. Selenium and amino acid composition of selenoprotein P, the major selenoprotein in rat serum. *J Biol Chem* **265**, 17899-905 (1990).
60. Dreher, I., Schmutzler, C., Jakob, F. & Köhrle, J. Expression of selenoproteins in various rat and human tissues and cell lines. *J Trace Elem Med Biol* **11**, 83-91 (1997).
61. Burk, R.F. & Hill, K.E. Selenoprotein P. A selenium-rich extracellular glycoprotein. *J Nutr* **124**, 1891-7 (1994).
62. Motsenbocker, M.A. & Tappel, A.L. A selenocysteine-containing selenium-transport protein in rat plasma. *Biochim Biophys Acta* **719**, 147-53 (1982).
63. Schomburg, L. u. a. Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem J* **370**, 397-402 (2003).
64. Hill, K.E. u. a. Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse. *J Biol Chem* **278**, 13640-6 (2003).

65. Schweizer, U. u. a. Hepatically derived selenoprotein P is a key factor for kidney but not for brain selenium supply. *Biochem J* **386**, 221-6 (2005).
66. Sasakura, C. & Suzuki, K.T. Biological interaction between transition metals (Ag, Cd and Hg), selenide/sulfide and selenoprotein P. *J Inorg Biochem* **71**, 159-62 (1998).
67. Arteel, G.E. u. a. Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration. *Biol Chem* **379**, 1201-5
68. Saito, Y. u. a. Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein p. *J Biol Chem* **274**, 2866-71 (1999).
69. Calvo, A. u. a. Alterations in gene expression profiles during prostate cancer progression: functional correlations to tumorigenicity and down-regulation of selenoprotein-P in mouse and human tumors. *Cancer Res* **62**, 5325-35 (2002).
70. Al-Taie, O.H. u. a. Expression profiling and genetic alterations of the selenoproteins GI-GPx and SePP in colorectal carcinogenesis. *Nutr Cancer* **48**, 6-14 (2004).
71. Maehara, S.-I. u. a. Selenoprotein P, as a predictor for evaluating gemcitabine resistance in human pancreatic cancer cells. *Int J Cancer* **112**, 184-9 (2004).
72. Hill, K.E., Zhou, J., McMahan, W.J., Motley, A.K. & Burk, R.F. Neurological dysfunction occurs in mice with targeted deletion of the selenoprotein P gene. *J Nutr* **134**, 157-61 (2004).
73. Schweizer, U., Michaelis, M., Köhrle, J. & Schomburg, L. Efficient selenium transfer from mother to offspring in selenoprotein-P-deficient mice enables dose-dependent rescue of phenotypes associated with selenium deficiency. *Biochem J* **378**, 21-6 (2004).
74. Renko, K. u. a. Hepatic selenoprotein P (SePP) expression restores selenium transport and prevents infertility and motor-incoordination in Sepp-knockout mice. *Biochem J* **409**, 741-9 (2008).
75. Nakayama, A., Hill, K.E., Austin, L.M., Motley, A.K. & Burk, R.F. All regions of mouse brain are dependent on selenoprotein P for maintenance of selenium. *J Nutr* **137**, 690-3 (2007).
76. Brown, D.G., Burk, R.F., Seely, R.J. & Kiker, K.W. Effect of dietary selenium on the gastrointestinal absorption of (  $^{75}\text{SeO}_3$  ) $_2$ - in the rat. *Int J Vitam Nutr Res* **42**, 588-91 (1972).
77. Arteel, G.E. u. a. Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration. *Biol Chem* **379**, 1201-5
78. Saito, Y. u. a. Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein p. *J Biol Chem* **274**, 2866-71 (1999).
79. Hirsch, M.C. *InterBRAIN. Version 2.0. CD-ROM für Windows 95/98/NT/2000/XP und MacOS 7.5.* (Springer, Berlin: 2004).
80. Benninghoff, A., Drenckhahn, D. & Zenker, W. *Anatomie, 2 Bde. Bd.2, Nervensystem u.a. , 15. Auflage.* (Urban & Fischer Verlag: 1994).
81. Nolte, J. *The Human Brain.* (Elsevier LTD, Oxford: 2001).
82. The Mouse Brain Library. auf <<http://www.mbl.org/>>
83. BRAINMAPS.ORG. auf <<http://www.brainmaps.org/index.php>>
84. Braig, C. Nachweis der Expression von Selenoprotein P im menschlichen Gastrointestinaltrakt. auf <<http://www.opus-bayern.de/uni-wuerzburg/volltexte/2005/1268/>>
85. Scharpf, M. u. a. Neuronal and ependymal expression of selenoprotein P in the human brain. *J Neural Transm* **114**, 877-84 (2007).
86. Nieuwenhuys, R. *Chemoarchitecture of the Brain.* (Springer-Verlag: 1986).
87. Patterson, B.H. u. a. Human selenite metabolism: a kinetic model. *Am J Physiol* **257**, R556-67 (1989).

88. Bostrom, H., Jorpers, E. & Odeblad, E. An autoradiographic study on the uptake of Se<sup>75</sup>-labelled sodium selenate by different organs of the adult rat. *Acta Physiol Scand* **28**, 255-60 (1953).
89. Kato, T., Read, R., Rozga, J. & Burk, R.F. Evidence for intestinal release of absorbed selenium in a form with high hepatic extraction. *Am J Physiol* **262**, G854-8 (1992).
90. Rappaport, A.M., Borowy, Z.J., Loughheed, W.M. & Lotto, W.N. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology. *Anat Rec* **119**, 11-33 (1954).
91. Jungermann, K. Metabolic zonation of liver parenchyma. *Semin Liver Dis* **8**, 329-41 (1988).
92. Yang, G. u. a. Studies of safe maximal daily dietary selenium intake in a seleniferous area in China. I. Selenium intake and tissue selenium levels of the inhabitants. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* **3**, 77-87 (1989).
93. Thomson, C.D. & Robinson, M.F. Urinary and fecal excretions and absorption of a large supplement of selenium: superiority of selenate over selenite. *Am J Clin Nutr* **44**, 659-63 (1986).
94. Robinson, J.R., Robinson, M.F., Levander, O.A. & Thomson, C.D. Urinary excretion of selenium by New Zealand and North American human subjects on differing intakes. *Am J Clin Nutr* **41**, 1023-31 (1985).
95. Kobayashi, Y. u. a. Selenosugars are key and urinary metabolites for selenium excretion within the required to low-toxic range. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **99**, 15932-15936 (2002).
96. Nickel, A. u. a. Characteristics of transport of selenoamino acids by epithelial amino acid transporters. *Chem Biol Interact* (2008).doi:S0009-2797(08)00489-4
97. Burk, R.F., Hill, K.E., Motley, A.K., Austin, L.M. & Norkworthy, B.K. Deletion of selenoprotein P upregulates urinary selenium excretion and depresses whole-body selenium content. *Biochim Biophys Acta* **1760**, 1789-93 (2006).
98. Olson, G.E., Winfrey, V.P., Hill, K.E. & Burk, R.F. Megalin mediates selenoprotein P uptake by kidney proximal tubule epithelial cells. *J Biol Chem* **283**, 6854-60 (2008).
99. Mörk, H. u. a. Inverse mRNA expression of the selenocysteine-containing proteins GI-GPx and SeP in colorectal adenomas compared with adjacent normal mucosa. *Nutr Cancer* **37**, 108-16 (2000).
100. Lee, S.-R. u. a. Spatiotemporal expression of the selenoprotein P gene in postimplantational mouse embryos. *Int J Dev Biol* **52**, 1005-11 (2008).
101. Kasik, J.W. & Rice, E.J. Selenoprotein P expression in liver, uterus and placenta during late pregnancy. *Placenta* **16**, 67-74 (1995).
102. Bou-Resli, M.N., Dashti, H.M., Mathew, T.C. & Al-Zaid, N.S. Pre- and postnatal tissue selenium of the rat in the growing state. *Biol Neonate* **80**, 169-72 (2001).
103. Noack, W. & Schwarz, W. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Entwicklung der Lunge bei Ratten (16. Tag a.p.-10. Tag p.p.). *Anatomy and Embryology* **134**, 343-360 (1971).
104. Moore, K.L. & Persaud, T.V.N. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. (Saunders: 2007).
105. Darlow, B.A. u. a. The relationship of selenium status to respiratory outcome in the very low birth weight infant. *Pediatrics* **96**, 314-9 (1995).
106. Darlow, B.A. u. a. The effect of selenium supplementation on outcome in very low birth weight infants: a randomized controlled trial. The New Zealand Neonatal Study Group. *J Pediatr* **136**, 473-80 (2000).
107. Darlow, B.A. & Austin, N.C. Selenium supplementation to prevent short-term morbidity in preterm neonates. *Cochrane Database Syst Rev* CD003312 (2003).doi:10.1002/14651858.CD003312

108. Fraslon, C., Rolland, G., Bourbon, J.R., Rieutort, M. & Valenza, C. Culture of fetal alveolar epithelial type II cells in serum-free medium. *In Vitro Cell Dev Biol* **27A**, 843-52 (1991).
109. Kim, H.Y., Picciano, M.F., Wallig, M.A. & Milner, J.A. The role of selenium nutrition in the development of neonatal rat lung. *Pediatr Res* **29**, 440-5 (1991).
110. Kim, H.Y., Picciano, M.F. & Wallig, M.A. Postnatal selenium repletion protects lungs of neonatal rats from hyperoxia. *J Nutr* **122**, 1760-7 (1992).
111. Wade, K.C. u. a. Gene Induction during Differentiation of Human Pulmonary Type II Cells In Vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **34**, 727-737 (2006).
112. Bou-Resli, M.N., Mathew, T.C., Dashti, H.M. & Al-Zaid, N.S. Brain selenium accumulation in rat pups of selenium supplemented mothers. *Anat Histol Embryol* **31**, 228-31 (2002).
113. Kabuyama, Y. u. a. Involvement of selenoprotein P in the regulation of redox balance and myofibroblast viability in idiopathic pulmonary fibrosis. *Genes Cells* **12**, 1235-44 (2007).
114. Cross, C.E., Hasegawa, G., Reddy, K.A. & Omaye, S.T. Enhanced lung toxicity of O<sub>2</sub> in selenium-deficient rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **16**, 695-706 (1977).
115. Hawker, F.H., Ward, H.E., Stewart, P.M., Wynne, L.A. & Snitch, P.J. Selenium deficiency augments the pulmonary toxic effects of oxygen exposure in the rat. *Eur Respir J* **6**, 1317-23 (1993).
116. Björnstedt, M., Xue, J., Huang, W., Akesson, B. & Holmgren, A. The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem* **269**, 29382-29384 (1994).
117. Chu, F.F., Esworthy, R.S., Doroshow, J.H., Doan, K. & Liu, X.F. Expression of plasma glutathione peroxidase in human liver in addition to kidney, heart, lung, and breast in humans and rodents. *Blood* **79**, 3233-3238 (1992).
118. Avissar, N. u. a. Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am. J. Physiol* **266**, C367-375 (1994).
119. Whitin, J.C., Bhamre, S., Tham, D.M. & Cohen, H.J. Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol* **283**, F20-28 (2002).
120. Schmutzler, C. u. a. Selenoproteins of the thyroid gland: expression, localization and possible function of glutathione peroxidase 3. *Biol Chem* **388**, 1053-9 (2007).
121. Brigelius-Flohé, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* **27**, 951-65 (1999).
122. Behne, D., Hilmert, H., Scheid, S., Gessner, H. & Elger, W. Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins. *Biochim Biophys Acta* **966**, 12-21 (1988).
123. Chen, J. & Berry, M.J. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J Neurochem* **86**, 1-12 (2003).
124. Burk, R.F., Hill, K.E., Boeglin, M.E., Ebner, F.F. & Chittum, H.S. Selenoprotein P associates with endothelial cells in rat tissues. *Histochem. Cell Biol* **108**, 11-15 (1997).
125. Peters, M.M., Hill, K.E., Burk, R.F. & Weeber, E.J. Altered hippocampus synaptic function in selenoprotein P deficient mice. *Mol Neurodegener* **1**, 12 (2006).
126. Torreilles, F., Salman-Tabcheh, S., Guérin, M. & Torreilles, J. Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite. *Brain Res. Brain Res. Rev* **30**, 153-163 (1999).
127. Valentine, W.M. u. a. Brainstem axonal degeneration in mice with deletion of selenoprotein p. *Toxicol Pathol* **33**, 570-6 (2005).
128. Southam, E., Thomas, P.K., King, R.H., Goss-Sampson, M.A. & Muller, D.P. Experimental vitamin E deficiency in rats. Morphological and functional evidence of abnormal axonal transport secondary to free radical damage. *Brain* **114** ( Pt 2), 915-936 (1991).

129. Ferreira Azevedo, M. u. a. Selenoprotein-Related Disease in a Young Girl Caused by Nonsense Mutations in the SBP2 Gene. *J Clin Endocrinol Metab* (2010).doi:10.1210/jc.2009-2611
130. Trapp, B.D., Ransohoff, R. & Rudick, R. Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr. Opin. Neurol* **12**, 295-302 (1999).
131. Steinbrenner, H., Alili, L., Bilgic, E., Sies, H. & Brenneisen, P. Involvement of selenoprotein P in protection of human astrocytes from oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med* **40**, 1513-1523 (2006).
132. Yang, X., Hill, K.E., Maguire, M.J. & Burk, R.F. Synthesis and secretion of selenoprotein P by cultured rat astrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1474**, 390-396 (2000).
133. Bellinger, F.P. u. a. Association of selenoprotein p with Alzheimer's pathology in human cortex. *J Alzheimers Dis* **15**, 465-72 (2008).
134. Guglielmotto, M. u. a. The up-regulation of BACE1 mediated by hypoxia and ischemic injury: role of oxidative stress and HIF1alpha. *J. Neurochem* **108**, 1045-1056 (2009).
135. Zafar, K.S. u. a. Dose-dependent protective effect of selenium in rat model of Parkinson's disease: neurobehavioral and neurochemical evidences. *J. Neurochem* **84**, 438-446 (2003).
136. Kato, S. u. a. Redox system expression in the motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS, superoxide dismutase 1 (SOD1)-mutated familial ALS, and SOD1-mutated ALS animal models. *Acta Neuropathol* **110**, 101-112 (2005).
137. Kato, S. u. a. Histological evidence of redox system breakdown caused by superoxide dismutase 1 (SOD1) aggregation is common to SOD1-mutated motor neurons in humans and animal models. *Acta Neuropathol* **107**, 149-158 (2004).
138. Schomburg, L. u. a. Synthesis and metabolism of thyroid hormones is preferentially maintained in selenium-deficient transgenic mice. *Endocrinology* **147**, 1306-1313 (2006).
139. Huang, K., Lauridsen, E. & Clausen, J. The uptake of Na-selenite in rat brain. Localization of new glutathione peroxidases in the rat brain. *Biol Trace Elem Res* **46**, 91-102 (1994).
140. Valentine, W.M. u. a. Brainstem axonal degeneration in mice with deletion of selenoprotein p. *Toxicol Pathol* **33**, 570-6 (2005).
141. Schomburg, L., Schweizer, U. & Köhrle, J. Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic. *Cell. Mol. Life Sci* **61**, 1988-1995 (2004).

### 7 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung von Selenoprotein P (SePP) sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene analysiert. Mit Hilfe der In-Situ-Hybridisierung konnte anhand ausgewählter muriner Organe gezeigt werden, dass SePP Gewebs- und Zell-spezifisch exprimiert wird. Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe eines Expression-Arrays humaner Gewebe bestätigt. Ferner wurde mit Hilfe mehrerer polyklonaler Antikörper eine immunhistochemische Färbung von SePP etabliert und evaluiert. Es wurden humane zerebrale Gewebsschnitte immunhistochemisch untersucht und mit Hilfe einer Access-Datenbank eine zerebrale Protein-Karte der Normalverteilung erstellt. Hierbei zeigte sich, dass v.a. lange Bahnsysteme (z.B. im Rückenmark) in der Markscheide eine deutliche SePP-Immunreaktivität aufweisen. Ferner wiesen insbesondere große Neurone im Bereich des Cortex cerebri und des Rückenmarks eine deutliche Immunreaktivität auf. Die untersuchten neuronalen Kerngebiete (z.B. im Hirnstamm) zeigten eine differentielle SePP-Immunreaktivität. Ein postulierter Zusammenhang der SePP-Immunreaktivität mit der Neurotransmitterverteilung konnte nicht festgestellt werden.

Ergänzend wurde orientierend zerebrales Gewebe von einzelnen Patienten mit unterschiedlichen neurodegenerativen Erkrankungen untersucht (Morbus Alzheimer, multiple Sklerose, Morbus Parkinson, amyotrophe Lateralsklerose). Hierbei zeigte sich, dass bei den Herden der multiplen Sklerose die SePP-Immunreaktivität in Korrelation mit dem Verlust der Markscheiden abnimmt. Ein möglicher Zusammenhang mit dem chronischen Verlust von Axonen bei der multiplen Sklerose wurde diskutiert. Bei den untersuchten Gewebeproben von Patienten mit amyotropher Lateralsklerose zeigten die Neurone im Bereich der Ubiquitin-positiven Motoneurone des Rückenmarksvorderhorns eine perinukleär betonte verwaschene SePP-Immunreaktivität. Bei Gewebe von Alzheimer-Patienten fanden sich im Cortex und im Bereich des entorhinalen Cortex bzw. Hippocampus Neurone mit perinukleär kräftiger SePP-Immunreaktivität. Ferner fanden sich SePP-positive Ablagungen, passend zu sog. Neurofibrillary Tangles bzw. Alzheimer-Plaques. Im Gewebe von Patienten mit Morbus Parkinson fanden sich keine Auffälligkeiten der SePP-Immunreaktivität.

Ein Zusammenhang mit der Pathogenese der neurodegenerativen Erkrankungen bzw. ein möglicher protektiver Einfluß von SePP erscheint anhand dieser Daten möglich, bedarf aber der weiteren molekularen Charakterisierung.

### **8 Danksagungen**

Allen, namentlich erwähnt oder unerwähnt, die mich während der vorliegenden Arbeit unterstützt und einen Beitrag zu ihrem Gelingen geleistet haben, möchte ich von ganzem Herzen danken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Köhrle, für seine geduldige und engagierte Betreuung der vorliegenden Arbeit.

Ein besonders großer und herzlicher Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Lutz Schomburg für seine nicht selten aufopfernde Unterstützung bei der Betreuung eines zu Beginn der Arbeit noch recht unerfahrenen medizinischen Doktoranden. Seine besondere Sicht der Dinge, seine unglaublich engagierte Art und die vielen, nicht selten bis in die Nacht reichenden fachlichen Diskussionen haben mich nachhaltig beeindruckt.

Dank gilt auch Herrn PD Dr. Ulrich Schweizer für die große Unterstützung beim Verfassen der wissenschaftlichen Publikation.

Weiterer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Roggendorf und Herrn Dr. Thomas Arzberger, welche mir die ausgedehnten immunhistochemischen Studien am humanen Gehirn ermöglichten und mir bei der nicht immer ganz einfachen Auswertung behilflich waren. Mein besonderer Dank gilt hier auch dem Labor-Team der Neuropathologie, im Speziellen Frau Hannelore Schraut und Frau Petra Herud, welche mir bei der Durchführung der vielen immunhistochemischen Färbungen stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Großer Dank gebührt auch Irina Bonzheim für den aufmunternden und motivierenden Zuspruch sowie das Korrekturlesen des Manuskriptes.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern, Isolde Scharpf und Uwe Scharpf, sowie meiner gesamten Familie für die langjährige und geduldige Unterstützung danken. Dank gilt auch meinem Großvater Herrn Dr. med. vet. Max Stemmer, der mich schon sehr früh auf zahlreichen Praxisfahrten zu seinen „tierischen“ Patienten für Medizin begeistert hat.

**9 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## Lebenslauf

## **10 Erklärung**

„Ich, Marcus Scharpf, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:  
Untersuchungen zur Expression und Verteilung von Selenoprotein P  
selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die  
(unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten  
dargestellt habe.“

17.04.2011

Unterschrift

**11 Anhang**

**11.1 MTE-Daten**

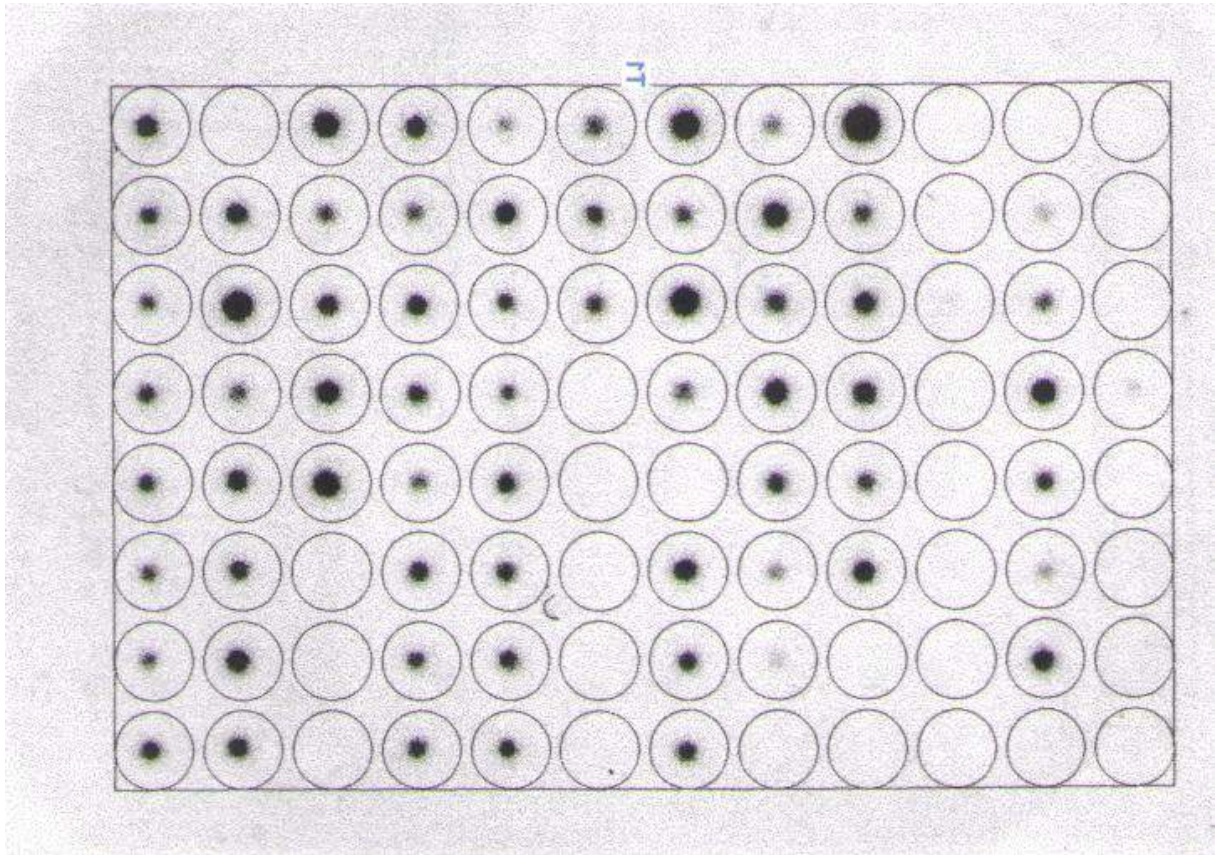


Abbildung 57: MTE-Scan (Scan mit Cyclone Phosphor Storage System)

## Anhang

Tabelle 4: Belegung MTE-Array (Quelle: Clontech Manual)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	whole brain	cerebellum, left	substantia nigra	heart	esophagus	colon, transverse	kidney	lung	liver	leukemia, HL-60	fetal brain	yeast total RNA
<b>B</b>	cerebral cortex	cerebellum, right	accumbens nucleus	aorta	stomach	colon, descending	skeletal muscle	placenta	pancreas	HeLa S3	fetal heart	yeast tRNA
<b>C</b>	frontal lobe	corpus callosum	thalamus	atrium, left	duodenum	rectum	spleen	bladder	adrenal gland	leukemia, K-562	fetal kidney	<i>E. coli</i> rRNA
<b>D</b>	parietal lobe	amygdala	pituitary gland	atrium, right	jejunum		thymus	uterus	thyroid gland	leukemia, MOLT-4	fetal liver	<i>E. coli</i> DNA
<b>E</b>	occipital lobe	caudate nucleus	spinal cord	ventricle, left	ileum		peripheral blood leukocyte	prostate	salivary gland	Burkitt's lymphoma, Raji	fetal spleen	Poly r(A)
<b>F</b>	temporal lobe	hippocampus		ventricle, right	ileocecum		lymph node	testis	mammary gland	Burkitt's lymphoma, Daudi	fetal thymus	human Cat-1 DNA
<b>G</b>	p. g. <sup>#</sup> of cerebral cortex	medulla oblongata		interventricular septum	appendix		bone marrow	ovary		colorectal adeno-Ca, SW480	fetal lung	human DNA 100 ng
<b>H</b>	pons	putamen		apex of the heart	colon, ascending		trachea			lung carcinoma, A549		human DNA 500 ng
	* parasentall gyrus											

# Anhang

Tabelle 5: Rohdaten MTE-Array (Auswertung Cyclone Phosphor Storage System)

File : hSePoSiPARRAY.TIF Acquired : 27.06.2000 15:08:45												
Owner : lutz Subject :												
#T1 - Grid												
Area of each cell is 50 265 (mm2)												
Gross DLU												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	134,911.4	147,442.4	88,035.3	126,613.7	123,507.5	83,756.9	127,480.7	83,567.5	76,633.6	74,794.8	75,662.3	74,533.8
B	101,136.2	162,927.5	83,841.5	118,378.0	123,809.2	78,578.2	119,996.8	81,909.6	74,774.3	71,337.7	136,642.8	73,628.1
C	106,539.3	128,985.1	84,783.6	128,788.2	120,593.1	75,632.4	144,953.2	85,564.2	137,846.7	73,643.0	82,382.2	68,432.6
D	116,361.5	145,550.0	223,746.5	102,888.6	124,313.8	77,816.3	70,976.1	115,435.7	106,161.4	71,908.1	105,358.4	65,279.7
E	116,007.5	115,573.8	173,037.7	123,829.3	104,457.5	76,106.0	102,337.0	165,401.5	140,891.7	72,720.0	169,506.7	71,119.7
F	113,416.5	322,372.0	135,125.4	139,245.1	114,776.1	113,487.0	257,763.8	120,999.2	137,402.2	73,065.4	95,334.3	69,962.0
G	135,196.4	145,300.4	114,432.2	119,983.2	147,436.2	127,056.6	111,677.1	183,929.2	111,948.7	68,104.4	78,423.0	71,473.0
H	153,424.6	93,498.5	205,059.6	149,149.1	97,123.0	126,882.3	257,173.5	101,040.5	544,154.3	69,683.8	71,289.0	72,567.3
Background Subtraction: none												
DLU /mm2												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,684.0	2,933.3	1,751.4	2,518.9	2,457.1	1,666.3	2,536.1	1,662.5	1,524.6	1,488.0	1,505.3	1,482.8
B	2,012.0	3,241.3	1,668.0	2,355.1	2,463.1	1,563.3	2,387.3	1,629.5	1,487.6	1,419.2	2,718.4	1,464.8
C	2,119.9	2,566.1	1,686.7	2,562.2	2,399.1	1,504.7	2,883.8	1,702.2	2,742.4	1,465.1	1,638.9	1,361.4
D	2,314.9	2,895.6	4,451.3	2,046.9	2,473.1	1,548.1	1,412.0	2,296.5	2,112.0	1,430.6	2,096.0	1,298.7
E	2,307.9	2,299.3	3,442.5	2,463.5	2,078.1	1,514.1	2,035.9	3,290.6	2,803.0	1,446.7	3,372.2	1,414.9
F	2,256.4	6,413.4	2,688.2	2,770.2	2,283.4	2,257.8	5,128.0	2,407.2	2,733.5	1,453.6	1,896.6	1,391.9
G	2,689.6	2,890.7	2,276.6	2,387.0	2,933.2	2,527.7	2,221.7	3,659.2	2,227.1	1,354.9	1,560.2	1,421.9
H	3,052.3	1,860.1	4,079.5	2,967.2	1,932.2	2,524.2	5,116.3	2,010.1	10,825.6	1,386.3	1,418.2	1,443.7

## 11.2 Auszug Datenbank Hirnregionen Immunhistochemie

Bahnsysteme										
Bahnsystem	Anzahl Messungen	Anzahl Patienten	MS 0	MS (1)	MS 1	MS 2	MS 3	MS 4	SePP Score (0-10,5)	
Tractus mesenceph. nervi trigemini	5	3	3	0	0	3	3	4	6,2	
Funiculus anterior	5	3	5	0	0	5	0	5	6,0	
Funiculus anterolateralis	5	3	5	0	0	5	0	5	6,0	
Funiculus posterior	5	3	5	0	0	5	0	5	6,0	
Tractus pyramidalis anterior	8	3	8	0	0	8	0	8	6,0	
Tractus pyramidalis lateralis	8	3	8	0	0	8	0	8	6,0	
Tractus spinocerebellans anterior	9	3	9	0	0	9	0	9	6,0	
Tractus spinocerebellans posterior	8	3	8	0	0	8	0	8	6,0	
Fasciculus longitudinalis medialis	21	6	16	0	2	16	5	18	5,8	
Lemniscus lateralis	6	3	6	0	1	3	2	5	5,5	
Fasciculus gracilis	12	3	11	0	0	11	0	11	5,5	
Tractus pyramidalis	8	2	8	1	0	8	1	6	5,4	
Nervus spinalis, Radix posterior	10	3	9	0	0	9	0	9	5,4	
Nervus spinalis, Radix anterior	6	3	5	0	0	6	0	5	5,3	
Commissura alba	5	2	0	0	0	0	2	5	5,2	
Fasciculus anterolateralis	13	3	13	0	0	11	0	11	5,1	
Pedunculus cerebellans superior	8	4	6	0	3	6	3	4	5,0	
Pedunculus cerebellans inferior	3	2	2	0	0	2	1	2	5,0	
Tractus solitarius	4	2	3	0	0	2	0	4	5,0	
Nervus hypoglossus	3	1	0	0	0	0	1	3	5,0	
Lemniscus medialis	10	3	8	1	1	7	2	7	5,0	
Striae terminalis	5	3	4	1	1	2	2	3	4,7	
Tractus opticus	4	3	1	3	2	2	1	2	4,6	
Pedunculus cerebri	5	3	3	1	3	3	3	1	4,5	
Tractus tectospinalis	4	3	1	0	0	0	2	3	4,5	
Pedunculus cerebellans medius	7	4	6	1	1	1	1	6	4,4	
Fasciculus mammillaris principalis	4	4	2	1	2	0	2	2	4,1	
Tractus tegmentalis centralis	5	4	4	0	1	3	1	2	3,6	
Capsula interna	14	5	14	4	3	7	6	3	3,5	
Alveus hippocampi	5	4	5	0	0	2	1	2	3,0	
Fibrae corticosegmentales	3	2	2	0	1	0	0	2	3,0	
Corpus callosum	5	5	3	2	2	2	1	1	2,8	
Fibrae pontocerebellares	4	3	2	1	1	2	0	1	2,4	
Fasciculus cuneatus	11	3	11	0	0	11	0	0	2,0	
Capsula externa	4	3	4	3	2	0	0	0	0,9	

Kerngebiete (I)										
Kerngebiet	Anzahl Messungen	Anzahl Patienten	N 0	N (1)	N 1	N 2	N 3	N 4	SePP Score (0-10,5)	
Nucleus nervi hypoglossi	4	3	0	1	1	2	3	2	5,6	
Olivula inferior	3	1	0	0	0	1	3	1	5,0	
Nucleus solitarius	4	2	0	1	2	2	2	1	4,1	
Nucleus dorsomarginalis	3	1	2	2	1	0	2	1	4,0	
Amygdala, Nucleus basalis	3	3	0	1	2	3	1	0	3,8	
Nucleus medianus thalamii	3	3	0	1	2	1	1	1	3,8	
Area entorhinalis	8	4	3	3	4	6	3	1	3,8	
Nuclei pontes	8	4	1	2	2	5	4	1	3,6	
Hippocampus	16	4	5	5	9	12	7	0	3,5	
Nucleus basalis Meynert	3	2	0	1	0	2	2	0	3,5	
Nucleus medialis thalami	7	4	1	3	3	5	3	0	3,4	
Gyrus temporalis medius	6	1	2	4	4	4	2	0	3,3	
Nucleus centralis superior	3	2	0	2	1	2	0	1	3,3	
Nucleus ventrolateralis	10	5	1	2	3	7	5	0	3,3	
Nucleus dorsalis nervi vagi	4	3	0	0	1	1	2	1	3,3	
Cellulae motoriae	10	2	0	0	1	10	2	1	3,1	
Nucleus medialis amygdalae	3	3	1	2	1	0	1	1	3,0	
Gyrus cinguli	13	5	7	5	7	6	4	1	2,9	
Nucleus dorsalis	6	3	2	2	2	4	2	0	2,8	
Nucleus intermediolateralis	5	2	0	0	1	5	1	0	2,8	
Nucleus lemnisci	4	3	2	0	2	3	1	0	2,8	
Gyrus frontalis medius	18	2	4	5	13	9	4	1	2,8	
Nucleus subthalamicus	4	4	1	2	1	3	1	0	2,8	
Nucleus intercalatus	5	3	1	3	1	4	1	0	2,7	
Nucleus lateralis	3	3	1	2	2	1	1	0	2,7	
Nucleus dorsolateralis	6	4	0	0	1	3	3	0	2,7	
Nucleus ventromedialis	6	2	0	0	0	5	2	0	2,7	
Nucleus proprius	13	3	1	2	2	9	4	0	2,5	
Subiculum	7	4	2	3	4	3	2	0	2,5	
Gyrus supramarginalis	15	3	5	8	8	7	2	1	2,4	
Nucleus reticularis tegmenti pontis	5	2	1	2	2	3	1	0	2,4	
Nucleus corticalis amygdalae	4	3	2	3	1	2	1	0	2,4	
Nucleus vestibularis inferior	3	2	1	2	2	2	0	0	2,3	

Kerngebiete (II)										
Kerngebiet	Anzahl Messungen	Anzahl Patienten	N 0	N (1)	N 1	N 2	N 3	N 4	SePP Score (0-10,5)	
Nucleus corticalis amygdalae	4	3	2	3	1	2	1	0	2,4	
Nucleus vestibularis inferior	3	2	1	2	2	2	0	0	2,3	
Nucleus thoracicus	4	3	1	0	0	3	1	0	2,3	
Gyrus centrale mesencephali	5	2	2	2	3	2	1	0	2,2	
Nucleus reticularis thalami	5	4	3	2	1	3	1	0	2,2	
Gyrus frontalis	36	3	12	18	21	11	7	1	2,1	
Nucleus cuneatus	7	2	2	3	2	4	1	0	2,1	
Nucleus caudatus	8	4	4	5	5	3	1	0	2,1	
Nucleus anterior thalami	4	4	1	2	3	2	0	0	2,0	
Nucleus centromedialis thalami	4	4	2	2	0	2	1	0	2,0	
Nucleus dorsomedialis	3	1	0	0	0	3	0	0	2,0	
Substantia innominata	3	2	1	2	2	1	0	0	1,7	
Gyrus temporalis superior	13	3	3	4	5	4	2	0	1,6	
Area striata	13	3	7	8	7	3	1	0	1,5	
Nucleus mesenceph. nervi trigemini	3	2	1	1	0	2	0	0	1,5	
Locus coeruleus	5	3	3	2	2	2	0	0	1,4	
Globus pallidus externum	4	4	4	3	2	1	0	0	1,4	
Putamen	6	4	6	6	1	2	0	0	1,3	
Nucleus parabrachialis medialis	3	2	3	2	2	0	0	0	1,0	
Substantia gelatinosa	3	1	3	2	2	0	0	0	1,0	
Nucleus pontis oralis	3	2	3	0	1	1	0	0	1,0	
Gyrus dentatus	9	4	2	4	4	1	0	0	0,9	
Nucleus ruber	4	3	4	3	2	0	0	0	0,9	
Globus pallidus internum	4	4	4	1	1	1	0	0	0,9	
Substantia nigra	7	3	4	1	1	2	0	0	0,8	

Farbintensitäten: dunkelblau = dunkelblau/blau/türkis = starke/mittlere/geringe Expression