

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. H. Sies

**Zur Schutzfunktion von Selenoprotein P  
bei der Oxidation von  
Low-Density-Lipoproteinen (LDL)**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von

Henrik Traulsen

(2004)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab  
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. Sies

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Schliess

Meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1	Selenoprotein P	7
1.1.1	Prävention pathologischer Prozesse	8
1.1.2	Charakteristika	8
1.1.3	Biosynthese	9
1.1.4.	Funktionen	11
1.2	LDL und Arteriosklerose	13
1.2.1	Physiologie und Struktur von LDL	13
1.2.2	Bedeutung von LDL für Arteriosklerose	15
1.3	Fragestellung	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Reagentien	18
2.1.1	Synthese von Peroxynitrit	18
2.2	Präparation von Selenoprotein P (SeP)	19
2.2.1	Isolierung Heparin-bindender Proteine aus menschlichem Plasma mit Heparin- Sepharose- Affinitätschromatographie	19
2.2.2	Ionenaustauschchromatographie	20
2.2.3	Ni <sup>2+</sup> -NTA- Affinitätschromatographie	22
2.3	Gelelektrophorese und immunochemische Methodik	24
2.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	24
2.3.2	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	24
2.3.3	Elektrotransfer (Western Blot)	25
2.3.4	Dot-Blot	25
2.3.5	Immundetektion	25
2.4	Oxidation Heparin-bindender Proteine mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	26

2.5	Oxidation von Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL)	26
2.5.1	Präparation von Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL)	27
2.5.2	Bestimmung der Konzentration von LDL	27
2.5.3	Oxidation mit Kupferchlorid (CuCl <sub>2</sub> ) und AAPH [2,2'-Azobis (2-amidinopropan)- dihydrochlorid]	27
2.5.4	Oxidation mit Peroxynitrit	28
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>30</b>
3.1	Selenoprotein P als endogener Schutzfaktor bei Oxidation von LDL	30
3.1.1	Oxidation mit Kupferchlorid (CuCl <sub>2</sub> )	30
3.1.2	Oxidation mit AAPH	32
3.1.3	Oxidation mit Peroxynitrit (ONOO <sup>-</sup> )	33
3.2	Einfluß Heparin-bindender Proteine auf die LDL-Oxidation	34
3.2.1	Oxidation mit Kupferchlorid (CuCl <sub>2</sub> )	35
3.2.1.1	Einfluß Heparin-bindender Proteine nach Oxidation mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	36
3.2.2	Oxidation mit AAPH	37
3.3	Vergleich der Wirkung von Selenoprotein P und Heparin-bindenden Proteinen	37
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>51</b>

## Abkürzungen

AAPH: 2,2'-Azobis(2-amidinopropan)-dihydrochlorid

Apo B: Apolipoprotein B

Apo B-Rezeptor: Rezeptor für Apolipoprotein B

ddH<sub>2</sub>O: Reinstwasser

EDTA: Ethylendiamintetraacetat

GSH: Glutathion

Hep-Proteingemisch: Gemisch Heparin-bindender Proteine

LDL: Lipoprotein niedriger Dichte (low-density lipoprotein)

MW: Molekulargewicht

oxLDL: oxidiertes Lipoprotein niedriger Dichte

PBS: Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

PMSF: Phenylmethylsulfonylfluorid

SeP: Selenoprotein P

Upm: Umdrehungen pro Minute

# 1 Einleitung

## 1.1 Selenoprotein P

Selenoprotein P (SeP) ist ein Glykoprotein, das im Blutplasma von Säugetieren zu finden ist und zur Klasse der Selenoproteine zählt (Burk et al., 1994, Mostert, 2000). 40-60% des gesamten Selens im menschlichen Blutplasma sind in Selenoprotein P gebunden (Åkesson und Martensson, 1991, Deagen et al., 1993, Harrison et al., 1996), der hohe Selengehalt damit eine hervorstechende Eigenschaft von Selenoprotein P. Hinweise auf seine Existenz gab es erstmals Anfang der 1970er Jahre, als man auf Proteine aufmerksam wurde, in denen sich schnell größere Mengen des an Ratten als Natriumselenit verabreichten Spurenelements Selen wiederfanden (Millar, 1972, Burk, 1973). 1982 konnte gezeigt werden, daß Selen in Form von Selenocystein im Protein gebunden ist (Motsenbrocker und Tappel, 1982). Alle spezifischen Selenoproteine enthalten in ihrer Polypeptidkette Selenocysteinreste, die für die biologische Funktion des Proteins verantwortlich sind und deren Austausch durch Cysteinreste mit einem Funktionsverlust einhergeht. Der Einbau der Selenocysteine erfolgt spezifisch (Abbildung 1-2). Selenoprotein P ist das einzige bisher bekannte spezifische Selenoprotein, das mehrere Selenocysteine (bis zu 10) pro Polypeptidkette besitzt (Hill et al., 1991). Nicht-spezifische Selenoproteine enthalten Selen vorwiegend als Selenomethionin, aber auch als Selenocystein, wobei der Einbau in das Protein allerdings unspezifisch erfolgt und die selenhaltigen Aminosäuren lediglich den Platz der schwefelhomologen Aminosäuren Methionin und Cystein einnehmen. Im menschlichen Plasma beträgt die Konzentration von Selenoprotein P etwa 50 nM (Åkesson et al., 1994) und schwankt in Abhängigkeit von der Ernährungssituation beträchtlich (Marchaluk et al., 1995). Daß SeP für den Organismus aber von größerer Bedeutung ist, spiegelt sich im Verhalten der SeP-Konzentration bei Selenunterversorgung wider. Sie sinkt in diesem Fall nicht so stark ab wie die anderer Selenoproteine (z.B. zelluläre Glutathionperoxidase mit Bedeutung für den Zellschutz) und steigt bei selenreicher Ernährung schneller wieder an (Hill et al., 1992). Die Bedeutung dieses Proteins ist nicht endgültig geklärt, verschiedene Ergebnisse weisen jedoch sowohl auf eine protektive Funktion als auch auf eine Funktion im Selentransport hin.

### 1.1.1 Prävention pathologischer Prozesse

Niedrige Selen-Plasmakonzentrationen sind mit einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert, die SeP-Konzentrationen bei Patienten mit Karzinomen des Respirations- oder Verdauungstraktes sind gegenüber Kontrollpersonen signifikant erniedrigt (Persson-Moschos, 1999). Eine krebsschutzende Wirkung durch Selensupplementierung konnte in mehreren Untersuchungen belegt werden. In zwei chinesischen Studien gelang es, in einem Gebiet, in dem Hepatitis B weit verbreitet ist, die Inzidenz des Leberzellkarzinoms durch tägliche Gabe von 200 µg Selen als Selenhefe bzw. von mit Selen angereichertem Tafelsalz (15 ppm Selen als Natriumselenit) deutlich zu reduzieren (Yu et al., 1997). In einer weiteren Studie mit über 1.300 Hautkrebspatienten (Clark et al., 1996) konnte die Zweittumorhäufigkeit bei Prostatakrebs (-63%), Kolonkarzinom (-58%) und Lungenkrebs (-49%) deutlich gesenkt werden, insgesamt war die Krebssterblichkeit in der Supplementierungsgruppe um 49% geringer. Es wird vermutet, daß Selen als essentielles Spurenelement seine krebsschutzende Wirkung durch Katalyse antioxidativer Reaktionen im aktiven Zentrum selenabhängiger Enzyme und auch in Form antikarzinogen wirksamer Selenmetaboliten [Selenwasserstoff ( $H_2Se$ ) Methylselenol ( $CH_3SeH$ ) oder Selenodiglutathion ( $GSSeSG$ ); Combs et al., 2001] entfaltet und DNA-Mutationen verhindern kann. Positiven Einfluss von Selen auf das Immunsystem zeigte auch eine Untersuchung an HIV-Patienten, wobei diejenigen mit einem Selenmangel ein nahezu 20-fach höheres Risiko hatten, an HIV-assoziierten Krankheiten zu sterben (Baum et al., 1997). Eine finnische Studie wies auf ein erhöhtes Risiko für Myokardinfarkt und Tod durch koronare Herzkrankheit bei niedrigem Selenplasmaspiegel hin (Salonen et al., 1982), eine weitere auf verstärkte Progression der Arteriosklerose (Salonen et al., 1991). Selenoprotein P als Hauptträger des Plasmaselens hat damit Bedeutung in der Prävention einiger Krankheiten. Ebselen, eine niedermolekulare, selenorganische Verbindung, wird bereits klinisch bei der Behandlung von Schlaganfällen erprobt (Übersicht bei Parnham und Sies, 2000).

### 1.1.2 Charakteristika

SeP ist ein ubiquitäres, hauptsächlich in der Leber exprimiertes Protein (Kato et al., 1992), wird aber auch in anderen Geweben gebildet, darunter u.a. Niere, Gehirn, Pankreas, Muskel, Herz, Lunge, Placenta (Dreher et al., 1997), Darm oder



hämatopoetische Zellen (Steinert et al., 1998). Bei der Präparation von SeP nach Mostert et al. (1998), die auch im Rahmen dieser Doktorarbeit zur Anwendung kam, werden zwei Isoformen des Proteins mit Größen von 61 und 51 kDa gewonnen. Präparation mit monoklonalen Antikörpern ergibt Proteine mit Größen von 61 und 55 kDa (Åkesson et al., 1994). Ein früherer Translationsabbruch bei der Form mit dem niedrigeren Molekulargewicht wird als Grund für die Existenz der Isoformen genannt. SeP ist in hohem Maße glykosyliert. Seine cDNA läßt ein Molekulargewicht von nur 41 kDa erwarten, das auch durch enzymatische Deglykosylierung erreicht wird (Mostert et al., 1998).

### 1.1.3 Biosynthese

Der Mechanismus des Einbaus von Selenocystein in die Polypeptidkette von Selenoproteinen war lange Zeit ungeklärt. Chambers et al. fanden 1986 heraus, daß eines der Stoppcodons, das UGA-Codon, für Selenocystein codieren kann.

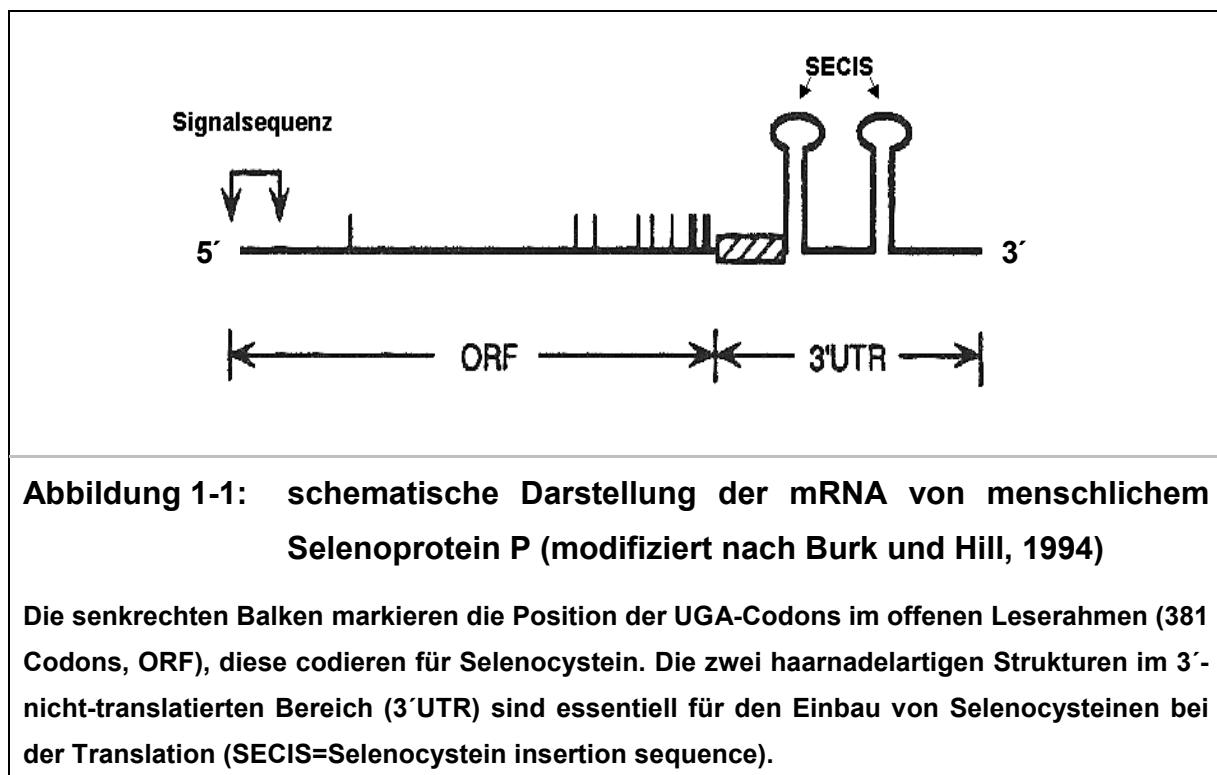
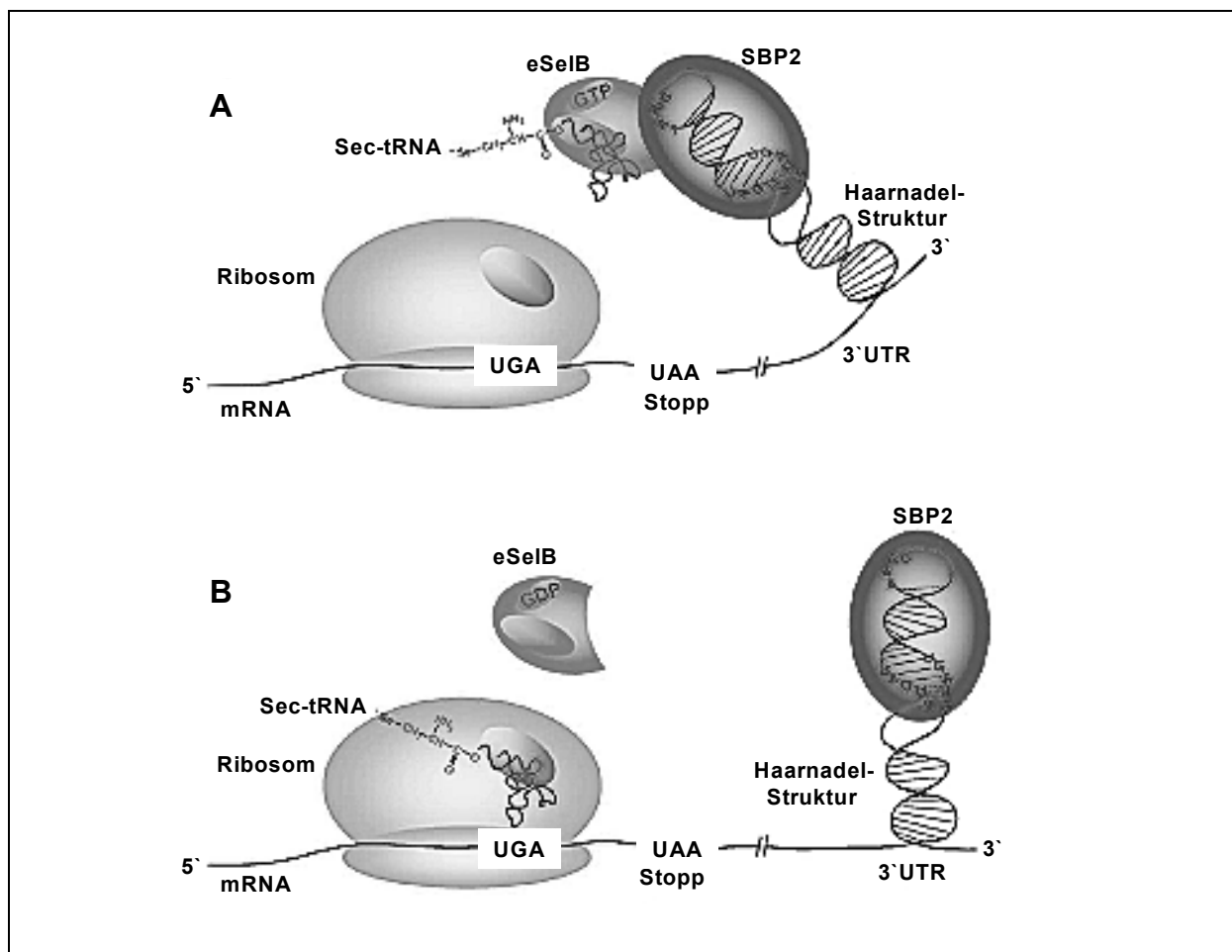


Abbildung 1-1 zeigt schematisch die mRNA von menschlichem SeP. Neun der für Selenocystein kodierenden UGA-Codons finden sich im 3'-terminalen Drittel der mRNA (im Protein zwischen Aminosäure 281 und 358 von 381 Aminosäuren), nur eines nahe dem 5'-Ende (Aminosäure 40). Essentiell für den Einbau der Selenocysteine bei der Translation sind haarnadelförmige mRNA-Strukturen im 3'-

nicht-translatierten Bereich, sogenannte Selenocystein-Insertionssequenzen (Hill et al., 1993). Nur wenn sie vorhanden sind, kodiert das eigentliche Stoppcodon UGA für ein Selenocystein, was die einzige bisher bekannte Erweiterung des genetischen Codes seit der Entschlüsselung darstellt.

Um das Stoppcodon UGA als Selenocystein zu translatieren, müssen bei Säugetieren neben der Haarnadelstruktur im nicht-translatierten Bereich zwei weitere Faktoren vorliegen, das Protein SBP2 (Copeland et al., 2000) und ein Selenocystein-spezifischer Elongationsfaktor eSelB (Tujebajeva et al., 2000). SBP2 bindet an die Haarnadelstruktur der mRNA und bildet einen Komplex mit dem Elongationsfaktor eSelB, der die Selenocysteyl-tRNA gebunden hat. Dieser Gesamtkomplex sorgt



**Abbildung 1-2: Schema des Einbaus von Selenocystein in Proteine bei Säugetieren (nach Tujebajeva et al., 2000)**

(A) Die Haarnadelstruktur in der 3`-nicht-translatierten Region der mRNA im Komplex mit dem SBP<sub>2</sub>-Protein und dem eukaryontischen eSelB liefert die Selenocysteyl-tRNA an das Ribosom.

(B) Dissoziation des Komplexes nach Abgabe der beladenen tRNA an das Ribosom.

(aus Thanbichler und Böck, 2001).

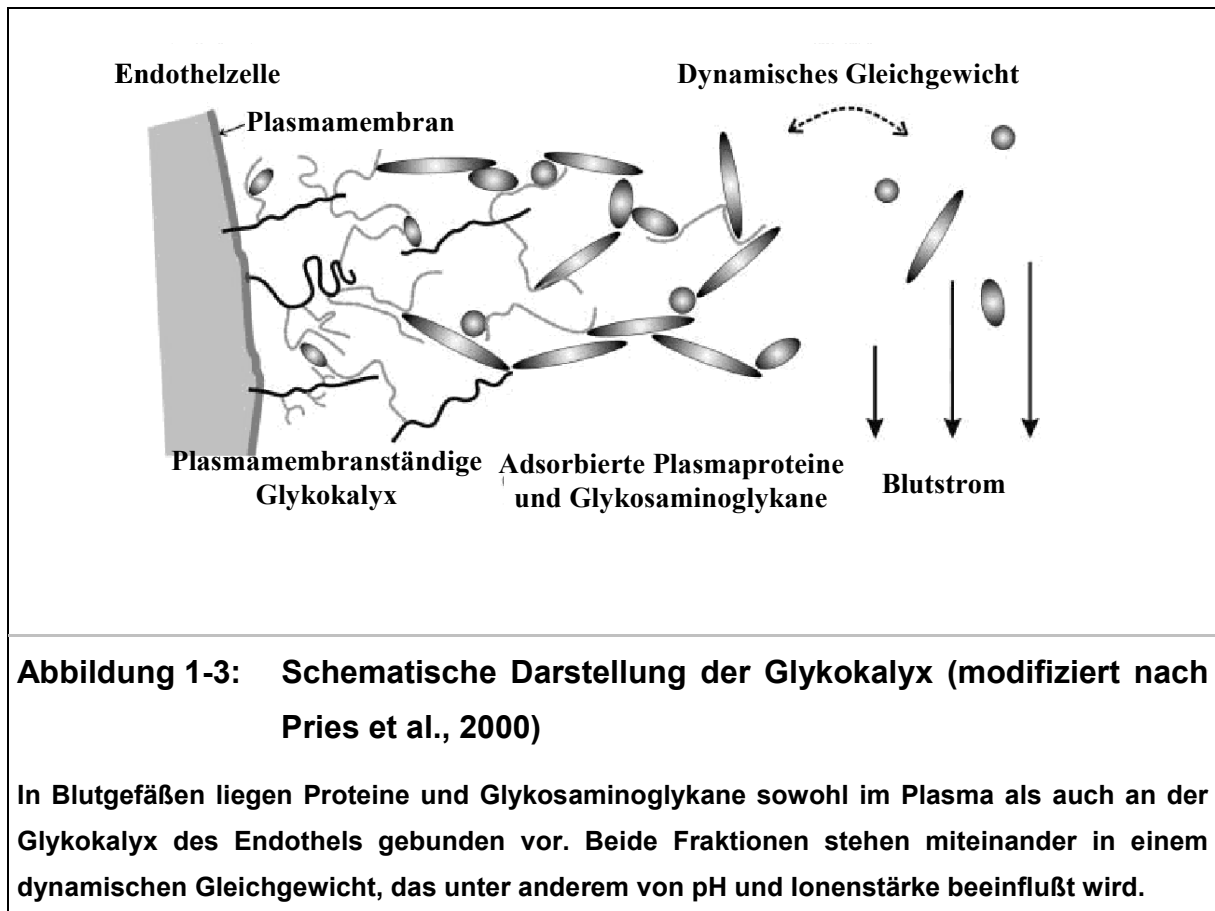
dann bei Vorliegen des UGA-Codons in der mRNA für den Einbau von Selenocysteinen in das Protein. Abbildung 1-2 veranschaulicht den Mechanismus.

#### 1.1.4. Funktionen

Die Bedeutung von Selenoprotein P für den Organismus ist bis heute nicht endgültig geklärt, es wird jedoch angenommen, daß es der extrazellulären Abwehr von Oxidationsprozessen (Burk und Hill, 1994) und als Transportprotein für Selen dient (Motchnik und Tappel, 1990). Vergleich zwischen Wildtyp-Mäusen und sogenannten Knockout-Mäusen, die nicht über das SeP-Gen verfügen, zeigt eine wichtige Rolle von SeP im Selentransport von der Leber zu den Zielgeweben (Schomburg et al., 2003; Hill et al., 2003; Burk et al., 2003). Auch die Selenversorgung proliferierender Zellen ist von SeP abhängig (Saito und Takahashi, 2002). Das Freisetzen von Selen, das in SeP in Form von Selenocystein kovalent gebunden ist, erfordert allerdings große Mengen an Energie und wäre demnach eher ein uneffizienter Mechanismus der Selenversorgung. SeP wird zudem in sehr vielen Geweben exprimiert, wenn auch in geringerem Ausmaß als in der Leber (Persson-Moschos, 2000). Der Annahme, daß Selenoprotein P in der Abwehr von Oxidationsprozessen Bedeutung hat, liegen Versuchsergebnisse von Burk et al. (1980) zugrunde. Sie zeigen eine protektive Funktion von SeP gegen durch Diquat verursachte Lipidperoxidation in Leber und Niere. Nähere Untersuchungen zur Lipidperoxidation der Rattenleber klärten, daß die Nekrose der Hepatozyten zentrilobulär nach einer Schädigung der Endothelzellen beginnt. SeP kann diesen Prozeß durch Bindung und nachfolgenden Schutz der Leberendothelien verhindern (Atkinson et al., 2001).

Selenoprotein P bildet Komplexe mit Übergangsmetallionen wie Quecksilber- (Yoneda und Suzuki, 1997), Cadmium-, Nickel-, Zink- und Kupferionen (Sidenius et al., 1999). Auffällig ist das Vorkommen vieler basischer Aminosäuren in der Proteinstruktur von SeP. 17 Histidine sowie zwei Lysine sind in zwei Bereichen konzentriert und vermitteln mit ihren positiven Ladungen die Fähigkeit, an Heparin zu binden (Åkesson und Martensson, 1991, Hondal et al., 2001). Dies ist interessant, weil die polyanionische Struktur von Heparin ähnlich den Heparansulfat-Proteoglykanen auf der Oberfläche von Zellmembranen ist. Selenoprotein P bindet an zelluläre Membranen (Wilson und Tappel, 1993) und Endothelzellen (Burk et al., 1997). Im Rahmen inflammatorischer Prozesse sinkt der pH-Wert des Plasmas lokal, was zu einer verstärkten Bindung von SeP durch Interaktion der basischen

Aminosäuren mit den negativ geladenen Sulfatresten der Proteoglykane führt (Arteel et al., 2000). Selenoprotein P liegt dann an einem für die Entwicklung der Arteriosklerose zentralen Ort, dem Endothel, in höherer Konzentration gebunden vor. Dort könnte es als Schutzschicht den Angriff plasmatischer Oxidantien und die Oxidation von Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL) im Bereich der Gefäßwand durch Endothelzellen oder im Rahmen inflammatorischer Prozesse verhindern. Abbildung 1-3 veranschaulicht den Prozeß der Interaktion von Plasmaproteinen und Endothel.



Endothelzellen bilden Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}$ ), welches zusammen mit dem Superoxidradikal  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , das von Phagozyten intravasal freigesetzt wird, zu Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ , Oxoperoxonitrat $^{1-}$ ) reagieren kann (Beckman et al., 1994). Peroxynitrit ist durch seine Toxizität gegenüber Mikroorganismen ein wichtiger Mediator der Immunabwehr, kann aber auch an körpereigenen Zellen zu Lipidperoxidation, DNA-Schäden, Mutationen oder Nitrierung von Proteinen führen. Der Körper verfügt daher über Schutzmechanismen zur Abwehr von Peroxynitrit-Schäden (Arteel et al., 1999). Hierzu zählt auch Selenoprotein P, das *in vitro* bei steigender Plasmakonzentration einen zunehmendem Schutz vor durch Peroxynitrit

verursachter Oxidation bewirkt (Arteel et al., 1998). Als Erklärung wird diskutiert, daß SeP in der Lage ist, reaktive Sauerstoffspezies abzufangen (Mostert, 2000). Besonders Selenocysteine kommen für solche Redoxprozesse in Frage (Briviba et al., 1996). Sie sind reaktiver als entsprechende Cysteine, liegen bei physiologischem pH im Gegensatz zu Cysteinen ionisiert vor und reagieren als Bestandteil synthetischer Peptide zügiger zu Diseleniden als korrespondierende Cystein-haltige Peptide; mithilfe von Glutathion (GSH) werden sie als Diselenide auch schneller reduziert als korrespondierende Disulfide (Besse et al., 1997, Koide et al., 1993, Müller et al., 1994). In einigen Enzymen dienen sie im aktiven Zentrum der Katalyse von Redoxreaktionen. Bisher bekannte Selenoproteine spielen eine zentrale Rolle beim antioxidativen Zellschutz (Glutathionperoxidasen), bei der Kontrolle des zellulären Redoxstatus und der Transkription (Thioredoxinreduktasen), im Schilddrüsenhormonstoffwechsel (Deiodinasen), in der Spermatogenese sowie bei der bakteriellen Energiegewinnung (Flohé et al., 2000). Selenoprotein P vermag ähnlich wie Glutathionperoxidasen Phospholipidhydroperoxide zu reduzieren, was zum Oxidationsschutz von LDL beitragen kann. Das Spektrum der verwendeten Reduktionsäquivalente reicht dabei von Glutathion über Dithiothreit, 2-Mercaptoethanol, Cystein und Homocystein (Saito et al., 1999) bis Thioredoxin, mit dem als Thiolsubstrat die höchste Enzymaktivität erreicht wird (Takebe et al., 2002). Effekte von Selenoprotein P auf die Oxidation von LDL sind bisher nicht untersucht.

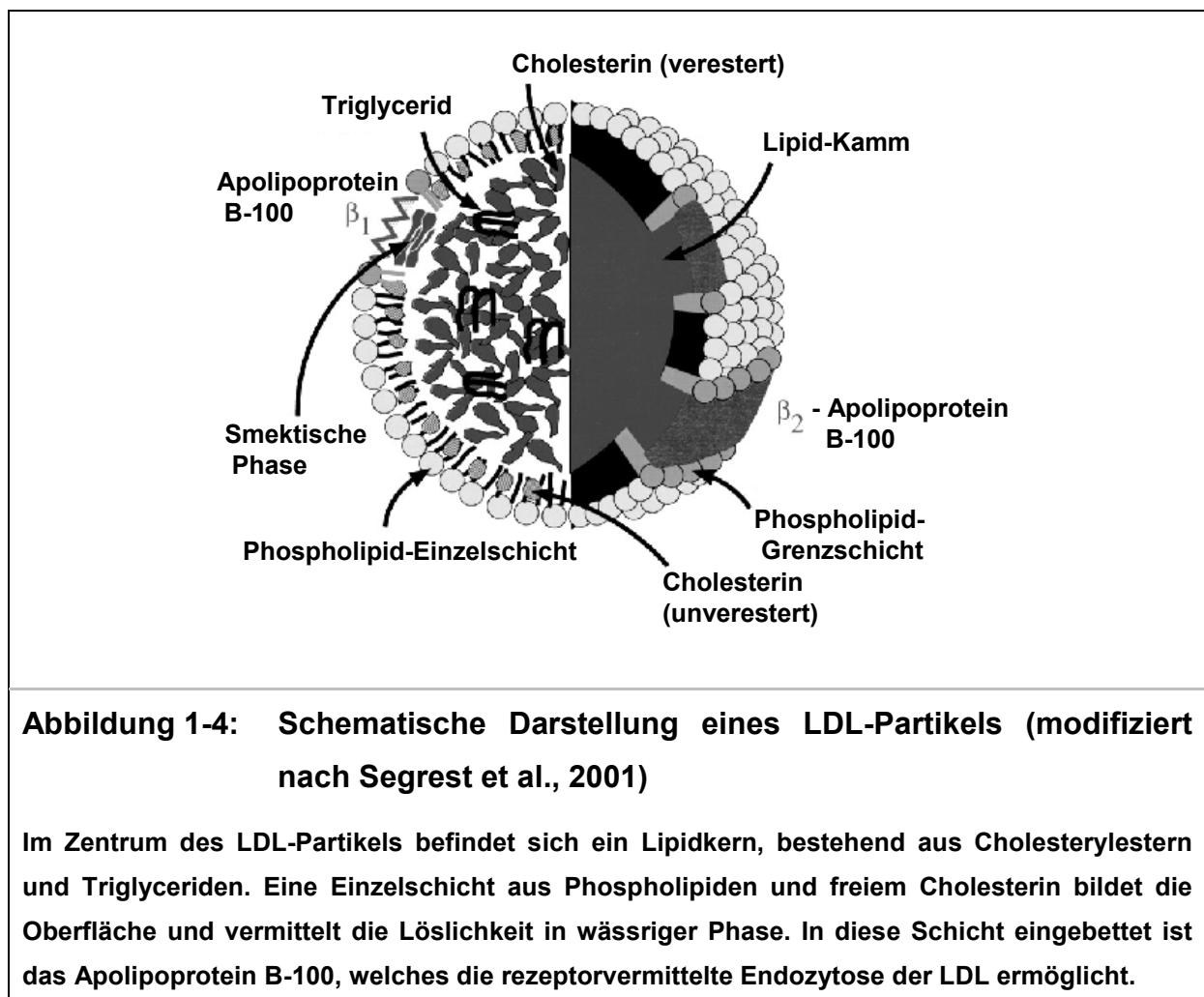
## **1.2 LDL und Arteriosklerose**

Etwa 50% der Mortalität gehen in der westlichen Welt auf Krankheiten des kardiovaskulären Systems zurück. Einer der wichtigsten pathophysiologischen Faktoren ist dabei die Arteriosklerose, sie ist die häufigste krankhafte Veränderung der Arterien und geht einher mit Gefäßverhärtung, Verdickung, Elastizitätsverlust und Lichtungseinschränkung durch arteriosklerotische Plaques. In der Folge können Thromben oder Emboli zu Ischämien und lebensbedrohlichem Myokardinfarkt oder Schlaganfall führen. Risikofaktoren der Arteriosklerose sind Hyperlipidämie, Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotin, Entzündungen, Streß u.a.

### **1.2.1 Physiologie und Struktur von LDL**

Lipoproteine niedriger Dichte sind die Hauptquelle der Lipide in arteriosklerotischen Läsionen (Steinberg et al., 1989) und gemäß derzeitiger Theorie von zentraler Bedeutung für die Entstehung der Arteriosklerose. Sie transportieren

etwa 60% des Serumcholesterins und versorgen damit Zellen unterschiedlicher Gewebe, die zum Aufbau ihrer Zellmembran oder zur Biosynthese von Steroidhormonen auf Cholesterin angewiesen sind. LDL zirkulieren ca. zwei Tage im Blut, bevor sie in der Leber abgebaut oder auch als oxidierte LDL von Makrophagen aufgenommen werden und dann für die Genese der Arteriosklerose Bedeutung haben können. Mit einem Molekulargewicht von 2,5 Millionen Dalton (550 kDa durch Apolipoprotein B-100) und einem Durchmesser von 19-25 nm zählen sie zu den größten Molekülen im Blut. Sie bestehen aus einem Lipidkern (verestertes Cholesterin und Triglyceride) mit umgebender Phospholipidschicht (Phosphatidylcholin und freies Cholesterin), in die das Apolipoprotein B-100 eingelagert ist (Abbildung 1-4).

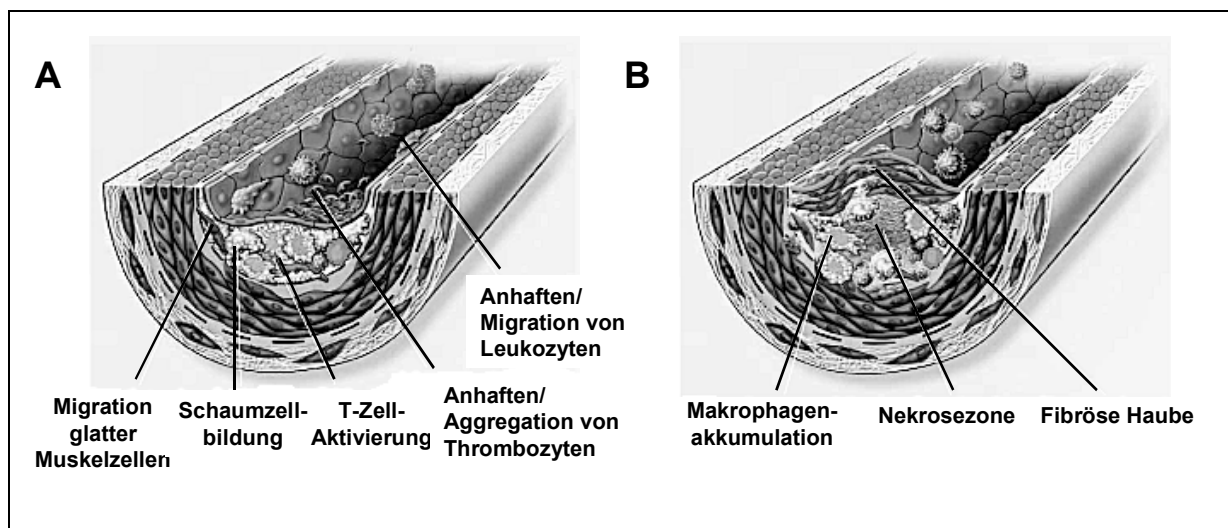


Die Endozytose der LDL wird durch Bindung an den entsprechenden Rezeptor auf der Zelloberfläche ausgelöst. Erhöhte intrazelluläre Cholesterinkonzentrationen inhibieren die Aktivität und Expression des Schlüsselenzyms der Cholesterinsynthese (HMG-CoA-Reduktase), aktivieren die

Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (Senken der Konzentration freien Cholesterins) und supprimieren die Synthese neuer LDL-Rezeptoren (Brown et al., 1981). Einen Überblick zu Metabolismus, Struktur, und Zusammensetzung von LDL geben Esterbauer et al. (1992).

### 1.2.2 Bedeutung von LDL für Arteriosklerose

Die Oxidation von LDL führt zu Reaktionen der mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Innern und beinhaltet auch Veränderungen des Apolipoproteins B-100 auf der LDL-Oberfläche. Modifizierte oxLDL werden deswegen nicht mehr über den üblichen Weg via Apo B-Rezeptor aufgenommen, sondern gelangen über sogenannte Scavenger-Rezeptoren in die Zelle (Brown und Goldstein, 1983). Dieser Prozeß allerdings kann im Gegensatz zur Aufnahme nativer LDL nicht herunterreguliert werden, was Folgen für die betroffenen Zellen hat. Große Mengen von Lipiden reichern sich in Makrophagen und glatten Muskelzellen der arteriellen Gefäßwand an und führen zu Schaumzellbildung und Tod der phagozytierenden Zellen (Ross, 1993), einem wichtigen Schritt in der Arterioskleroseentwicklung. Abbildung 1-5 zeigt zwei frühe Arteriosklerosestadien, an deren Entwicklung oxLDL beteiligt sind.



**Abbildung 1-5: Stadien der Arteriosklerose (modifiziert nach Ross, 1999)**

(A) Frühe Läsion der Arterie: Fettstreifen, bestehend aus lipidbeladenen Monozyten und Makrophagen (Schaumzellen) sowie T-Lymphozyten. Später erfolgt die Einwanderung glatter Muskelzellen. (B) Fortgeschrittene Läsion: Fibröser Plaque. Durch eine fibröse Schicht wird die Nekrosezone aus Leukozyten, Lipiden und Zelldebris im Zentrum der Läsion vom Gefäßlumen getrennt. Oxidierte LDL bewirken Schaumzellbildung und Makrophagenakkumulation.

Einen Überblick zu Theorien der Arterioskleroseentstehung geben Ross (1999, "Response-To-Injury-Hypothese") sowie Iuliano (2001) und Steinberg und Witztum (2002, "Oxidant-Stress-Hypothese").

Oxydierte LDL sind u.a. cytotoxisch und induzieren Apoptose, erhöhen die Expression von Makrophagen-Kolonie-stimulierendem-Faktor und Monozyten-chemotaktischem Protein durch Endothelzellen, induzieren Adhäsion der Monozyten am Endothel, werden zügig von Makrophagen aufgenommen und bewirken Schaumzellbildung, induzieren Migration und Proliferation glatter Muskelzellen, verhindern endothelabhängige Gefäßerweiterung und haben gerinnungsfördernden Einfluß auf Endothelzellen und Thrombozyten (Berliner und Heinecke, 1996, Ross, 1999).

Es ist unklar, wie die Oxidation *in vivo* erfolgt. Möglich ist sie durch Aktivität von Leukozyten intra- wie extravaskulär beispielsweise im Zuge inflammatorischer Prozesse, durch Monozyten/Makrophagen oder Endothelzellen in der Gefäßwand mittels Lipoxygenase, Myeloperoxidase, NADPH-Oxidase u.a. (Chisolm und Steinberg, 2000). Iuliano et al. (2000) konnten Radioiod-markierte native LDL nach Injektion in Arteriosklerosepatienten in den Schaumzellen der arteriosklerotischen Plaques nachweisen. Da dieser Prozeß durch Gabe des Antioxidans Vitamin E weitgehend verhindert werden konnte, sehen sie hierin den Nachweis von *In-vivo*-Oxidation der LDL nach Injektion in den Patienten. Die Existenz oxydierter LDL *in vivo* ist gesichert. Aus arteriosklerotischen Plaques können oxLDL mit LDL-typischen Lipidperoxydationsprodukten gewonnen werden (Ylä-Herttuala et al., 1989; Iuliano, 2001), und Lipoproteine mit charakteristischen Eigenschaften oxydierter LDL zirkulieren im menschlichen Plasma (Sevanian et al., 1997) ebenso wie Antikörper gegen oxLDL (Hörkkö et al., 2000), die mit nativen LDL nicht reagieren. Bei der Oxidation von LDL mit Kupfer(II)chlorid entstehen oxLDL mit gleichen Eigenschaften wie die der LDL aus arteriosklerotischen Plaques (Ylä-Herttuala et al., 1989).

Selenoprotein P, das an Glykosaminoglykane binden kann (Arteel et al., 2000), ist wahrscheinlich auch in der Lage, LDL zu binden, die auf ihrer Oberfläche Apolipoprotein B-100 (Apo B) als glykosyliertes Protein tragen (Kohlenhydrate machen 8-10 % des Gesamtgewichts von Apo B aus; Esterbauer et al., 1992). Auch eine kovalente Bindung zwischen SeP und LDL ist denkbar, denn das Apoprotein verfügt über 25 Cysteine in seiner Aminosäuresequenz (davon vier freie SH-Gruppen; Esterbauer et al., 1992), SeP über noch reaktivere Selenocysteine, die zur



---

Bildung von Selenosulfid-Brücken oder Veresterungen zur Verfügung stehen. So könnte SeP im Kontakt mit Apolipoprotein B-100 als strukturgebendem Teil der LDL-Partikel auf der Lipoprotein-Oberfläche, an die beispielsweise Kupferionen zum Auslösen der Lipidperoxidation binden müssen (Thomas et al., 1997), eine Schutzschicht generieren. Initiation und Propagation der LDL-Oxidation könnten beeinflusst werden, indem Radikale abgefangen oder die Kettenreaktion der Lipidperoxidation an LDL unterbrochen würden.

### 1.3 Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluß von Selenoprotein P auf die Oxidation von Lipoproteinen niedriger Dichte geprüft werden. Dabei sollten verschiedene *In-vitro*-Systeme zur LDL-Oxidation eingesetzt werden, im einzelnen Kupfer(II)chlorid ( $\text{CuCl}_2$ ), 2,2'-Azobis(2-amidinopropan)-dihydrochlorid (AAPH) und Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ , Oxoperoxonitrat<sup>1-</sup>). Die Oxidation von LDL sollte in An- oder Abwesenheit von SeP erfolgen und die Wirkung von SeP in allen Fällen mit der von Rinderserumalbumin verglichen werden, bei Oxidation mit  $\text{CuCl}_2$  und AAPH zudem mit einem Gemisch Heparin-bindender Proteine.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Reagentien

Die verwendeten Chemikalien stammten, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma (Deisenhofen). Lösungen der Substanzen wurden jeweils mit Reinstwasser aus einer Milli-Q-Anlage (Millipore, Eschborn) zubereitet.

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4; Zusammensetzung: 8,18 g/L NaCl, 1,8 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g/L KCl, 0,24 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) wurde sowohl bei den Präparationen von Selenoprotein P und Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL) wie auch bei allen Versuchen zur Oxidation eingesetzt.

Der polyklonale Primärantikörper gegen Selenoprotein P wurde von Gavin Arteel nach dem Protokoll von Mostert et al. (1998) hergestellt, der verwendete Anti-Rabbit IgG- Sekundärantikörper (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) über die Firma Dianova (Hamburg) bezogen.

#### 2.1.1 Synthese von Peroxynitrit

Peroxynitrit wurde von Darius P. Buchczyk nach dem Protokoll von Koppol et al. (1996) synthetisiert. Je 125 mL Natriumnitrit (NaNO<sub>2</sub>, 0,6 M) und saure H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (2,4 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2,6 % (v/v) HCl) wurden zügig mittels Peristaltikpumpen (Fluß: 34 mL/min) unter schnellem Rühren in 250 mL Natriumhydroxidlösung (NaOH, 1,2 M) infundiert. Dabei wurden NaNO<sub>2</sub>- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung unmittelbar vor Einlauf in die NaOH-Lösung mittels eines T-förmigen Schlauchstücks vereinigt. Nach Synthese wurden die Ansätze mindestens 30 min bei 4°C mit Mangandioxid (MnO<sub>2</sub>) inkubiert, um überschüssiges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu entfernen (abgeschlossen, wenn keine Blasenbildung mehr zu erkennen war). Anschließend konnte das MnO<sub>2</sub> durch Filtration abgetrennt und das gewonnene Peroxynitrit bei -80°C gelagert werden. Lösungen höherer Konzentration wurden durch Gefrierfraktionierung hergestellt. Die Bestimmung der Peroxynitritkonzentration erfolgte spektrophotometrisch durch Messung der Extinktion bei 302 nm ( $\epsilon_{302\text{nm}} = 1670 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ), die gewünschte Konzentration wurde dann durch Verdünnung mit KOH-Lösung [0,2 % (w/v)] eingestellt.

## 2.2 Präparation von Selenoprotein P (SeP)

Selenoprotein P wurde nach dem Protokoll von Mostert et al. (1998) aus menschlichem Plasma gewonnen. Lösungen enthielten 1 mM PMSF als Proteaseinhibitor. Soweit möglich wurden für die Präparation Plastikgefäße verwendet.

### 2.2.1 Isolierung Heparin-bindender Proteine aus menschlichem Plasma mit Heparin- Sepharose- Affinitätschromatographie

Heparin-Sepharose CL-6B wurde von Amersham/Pharmacia (Freiburg) bezogen und bei 4°C in 20 % (v/v) Ethanol gelagert. Vor Gebrauch wurde die Sepharose unter Verwendung eines Keramikfilters und einer Absaugvorrichtung zweifach mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend zweimal in Puffer A1 (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 100 mM NH<sub>4</sub>Ac; 10 mM 2-Mercaptoethanol; 1500 mL angesetzt) äquilibriert. Die Regeneration des Gelmaterials nach Gebrauch erfolgte gemäß Angaben des Herstellers durch alternierendes Waschen (mindestens dreimalige Wiederholung) des Materials mit Hoch-pH-Puffer (0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 0,5 M NaCl) und Niedrig-pH-Puffer (0,1 M NaAc pH 5; 0,5 M NaCl). Bei jeder fünften Regenerationsprozedur wurden beide Puffer mit zusätzlich 8 M Harnstoff angesetzt.

Humanes Plasma einer abgelaufenen Plasmakonserven (300 mL, von der Blutbank Düsseldorf bereitgestellt) wurde bei 37°C aufgetaut und mit 2-Mercaptoethanol (Endkonzentration 10 mM) versetzt. Anschließend wurde das Plasma mit der Heparin-Sepharose (80 mL) für 1 h bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert, wobei sowohl Blasenbildung als auch ein Absetzen der Gelmatrix vermieden wurden. Nach der Inkubation wurde die Sepharose dreimal für 10 min mit je 150 mL Puffer A1 gewaschen, dann erfolgte die Elution der Heparin-bindenden Plasmaproteine für 30 min bei 4°C mit zunächst 150 mL Puffer B1 (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 2 M NH<sub>4</sub>Ac; 10 mM 2-Mercaptoethanol; 500 mL angesetzt) und danach nochmals mit 50 mL Puffer B1. Die Fraktionen wurden vereinigt und mittels Zentrifugation (Ultrafiltration, Centriprep YM-30, Amicon/Millipore, Schwalbach) bei 4°C und 4000 Upm auf ein Volumen von 25-30 mL eingeengt. Die gewonnene Proteinlösung wurde nun bei 4°C für 2 h gegen 5 L ddH<sub>2</sub>O (+10 mM 2-Mercaptoethanol), über Nacht in 5 L Puffer A2 (s. 2.2.2) und am folgenden Tag nochmals für 2 h in 5 L Puffer A2 dialysiert. Der verwendete Dialyseschlauch

(Spectra/Por, Ausschlußgröße 6000-8000 Da, Roth, Karlsruhe) war vorher in ddH<sub>2</sub>O mit EDTA gekocht und auf Raumtemperatur abgekühlt worden.

### 2.2.2 Ionenaustauschchromatographie

Nach Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie erfolgte die Ionenaustauschchromatographie an einer Q-Sepharose-Säule (25 mL; Q-Sepharose fast flow, Pharmacia, Freiburg). Die Säule wurde in 20 % (v/v) Ethanol bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch wurde sie mit mindestens 50 mL ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend mit mindestens 50 mL Puffer A2 (50 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM NH<sub>4</sub>Ac; 10 mM 2-Mercaptoethanol; 500 mL angesetzt) äquilibriert. Die Regeneration des Gelmaterials nach Benutzung erfolgte gemäß Angaben des Herstellers durch alternierendes Waschen (mindestens dreimalige Wiederholung) des Materials mit je einem Säulenvolumen Hoch-pH-Puffer (1 M NaOH) und Niedrig-pH-Puffer [10 % (v/v) Hac].

Die Chromatographie erfolgte am FPLC-System LCC-500 Plus mit P-500-Pumpen sowie einem Frac-100-Fraktionssammler von Pharmacia (Freiburg) mit dem in Tabelle 2-1 dargestellten Programm.

**Tabelle 2-1: FPLC-Programm für Q-Sepharose-Säule zur Präparation von SeP**

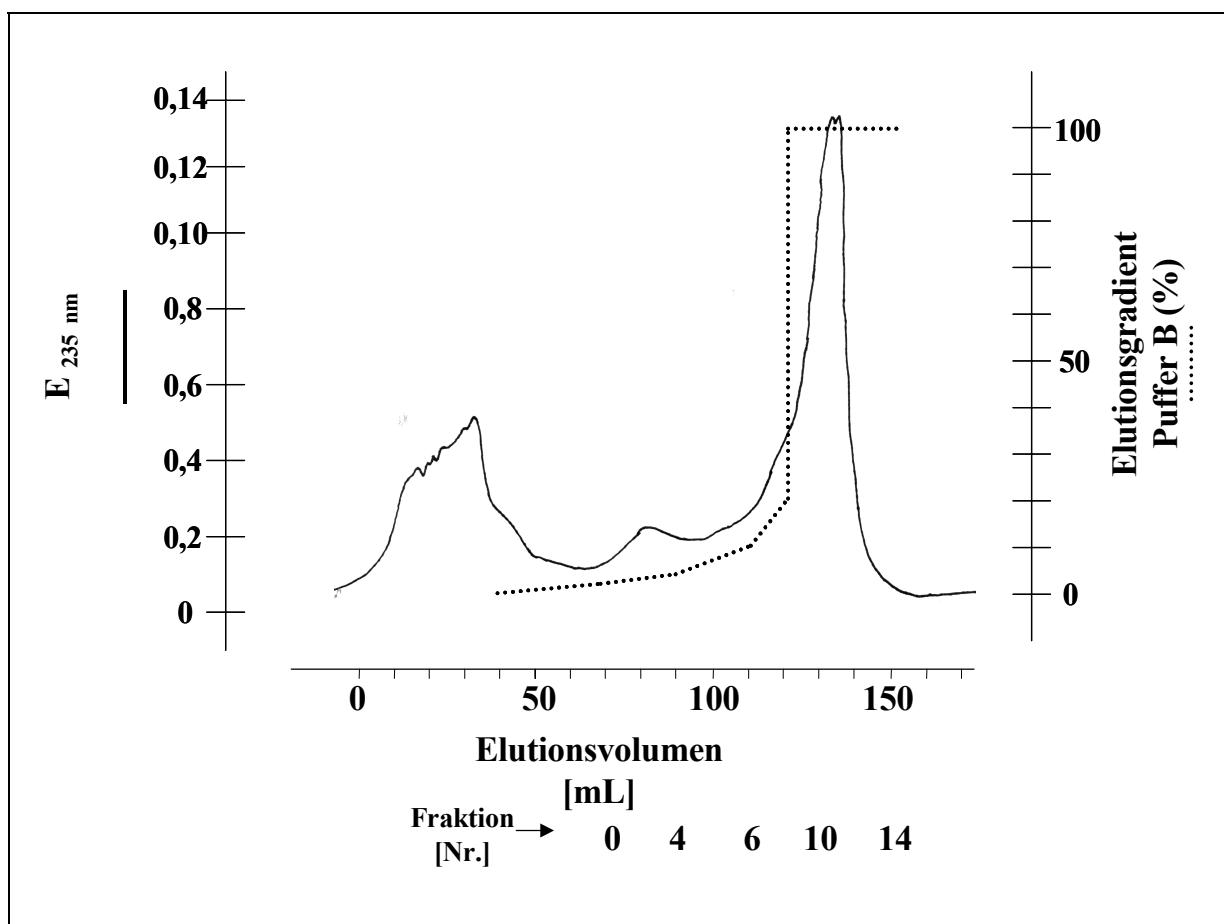
Schritt	Volumen	Parameter	Einstellung
1	0	CONC % B	0
2	0	VALVE.POS	1.2
3	0	VALVE.POS	2.2
4	0	VALVE.POS	3.2
5	0	ML/MIN	3
6	0	CM/MIN	0.1
7	40 <sup>a</sup>	VALVE.POS	1.1
8	40	CONC %B	0
9	70	CONC %B	2.5
10	70	PORT.SET	6.1 <sup>b</sup>
11	90	CONC %B	5
12	110	CONC %B	10
13	120	CONC %B	20
14	120	CONC %B	100
15	170	PORT.SET	6.0 <sup>c</sup>
16	170	CONC %B	100
17	170	CONC %B	0
18	200	CONC %B	0

<sup>a</sup> Abhängig vom geladenen Volumen, hier 25 mL.

<sup>b</sup> Fraktionssammler Start (5 mL).

<sup>c</sup> Fraktionssammler Stopp.

Die Proteinlösung aus 2.2.1 wurde auf die Säule aufgetragen und mit einem Gradienten aus Puffer A2 / Puffer B2 (Puffer B2: 50 mM Tris-HCl pH 8; 2 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$ ; 10 mM 2-Mercaptoethanol; 500 mL angesetzt) eluiert. Die Absorption wurde bei 235 nm aufgezeichnet (Abbildung 2-1). Von Beginn des Gradienten an wurden 5 mL-Fractionen gesammelt. Fractionen mit hoher Absorption (Fractionen 7-13, s. Abbildung 2-1) wurden vereint und durch Ultrafiltration bei 4000 Upm (Centriprep YM-30) auf ein Volumen von ca. 5 mL eingengt. Die Probe wurde anschließend wie in 2.2.1 beschrieben zunächst gegen  $\text{ddH}_2\text{O}$  und dann gegen Puffer A3 (s. 2.2.3, jedoch ohne Glycerin) dialysiert.



**Abbildung 2-1: Elutionsprofil zur Q-Sepharose-Ionenaustauschchromatographie**

Elution von auf die Q-Sepharose-Säule (25 mL Säulenvolumen) aufgetragenen Proteinen erfolgte mit einem ab 40 mL schrittweise steigenden  $\text{NH}_4\text{Ac}$ -Gradienten (bis 2 M) bei einem Fluß von 3 mL/min. Fractionen wurden ab 70 mL gesammelt und Nr. 7-13 für die weitere Präparation verwendet. Die Grafik zeigt die Absorption bei 235nm (durchgezogene Linie) und den  $\text{NH}_4\text{Ac}$ -Gradienten (gepunktete Linie).

### 2.2.3 Ni<sup>2+</sup>-NTA- Affinitätschromatographie

Nach Ionenaustauschchromatographie erfolgte die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie an einer Ni<sup>2+</sup>-NTA- Säule (2 mL; Qiagen, Hilden). Die Säule wurde in 20 % (v/v) Ethanol bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch wurde sie mit mindestens 4 mL ddH<sub>2</sub>O und mindestens 4 mL Essigsäure [10 % (v/v)] gewaschen und anschließend mit mindestens 4 mL Puffer A3 [20 mM Tris-HCl pH 7,9; 10 mM NH<sub>4</sub>Ac; 0,5 M NaCl; 10 mM 2-Mercaptoethanol; 10 % Glycerin (v/v); 500 mL angesetzt] äquiliibriert. Die Regeneration des Gelmaterials nach Gebrauch erfolgte gemäß Angaben des Herstellers durch alternierendes Waschen des Materials (mindestens 2-malige Wiederholung) mit je 10 Volumen Glycerin [30 % (v/v) Glycerin] und Niedrig-pH-Puffer [10 % (v/v) Hac]. Nach fünfmaliger Verwendung wurde das Gelmaterial ausgetauscht.

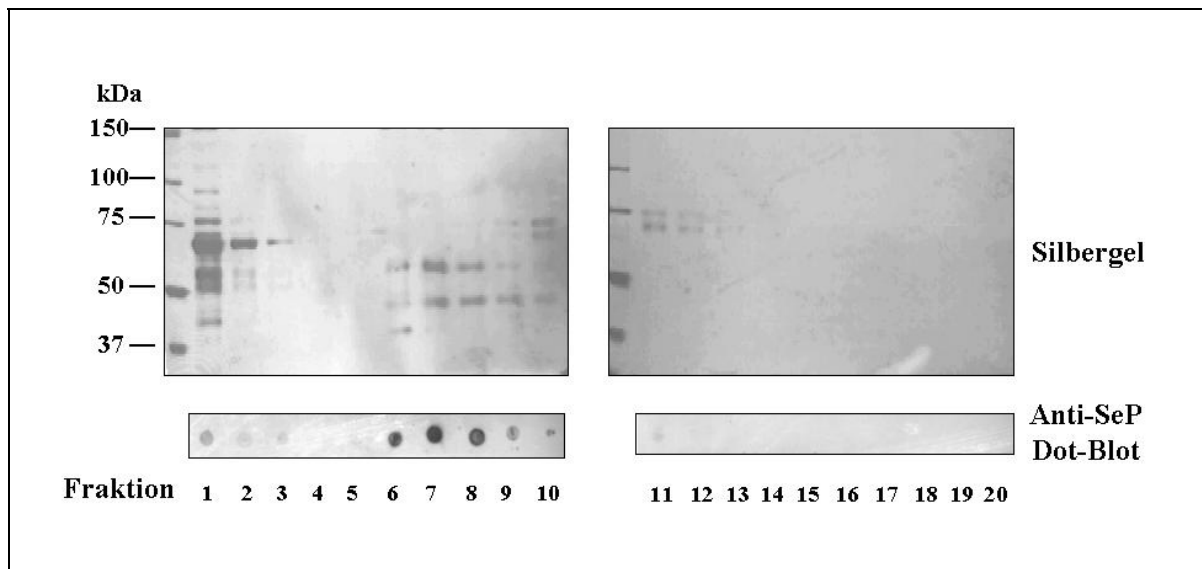
Die Chromatographie erfolgte am FPLC-System (s. 2.2.2) mit dem in Tabelle 2-2 dargestellten Programm.

Schritt	Volumen	Parameter	Einstellung
1	0	CONC % B	0
2	0	VALVE.POS	1.2
3	0	VALVE.POS	2.2
4	0	VALVE.POS	3.2
5	0	ML/MIN	0.5
6	0	CM/MIN	0.5
7	6 <sup>a</sup>	VALVE.POS	1.1
8	8	CONC %B	0
9	8	PORT.SET	6.1 <sup>b</sup>
10	9	CONC %B	7.5
11	38	CONC %B	40
12	38	PORT.SET	6.0 <sup>c</sup>
13	38	CONC %B	100
14	48	CONC %B	100
15	48	CONC %B	0
16	58	CONC %B	0

<sup>a</sup> Abhängig von geladenem Volumen, hier ca. 4 mL.  
<sup>b</sup> Fraktionssammler Start (1 mL).  
<sup>c</sup> Fraktionssammler Stopp.

Die Proteinlösung aus 2.2.2 wurde auf die Säule geladen und mit einem Gradienten aus Puffer A3 / Puffer B3 [Puffer B3: 20 mM Tris-HCl pH 7,9; 10 mM NH<sub>4</sub>Ac; 0,5 M NaCl; 0,4 M Imidazol; 10 mM 2-Mercaptoethanol; 10 % (v/v) Glycerin;

500 mL angesetzt] eluiert. Von Beginn des Gradienten an wurden 1 mL-Fractionen gesammelt. Aliquots (100  $\mu$ L) aller Fractionen wurden mit 100  $\mu$ L 2 x Probenpuffer versetzt [Zusammensetzung in doppelt konzentrierter Form: 125 mM Tris, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerin, 100 mM DTT, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau] und zur Dot-Blot-Analyse (s. 2.3.4) sowie zur Silberfärbung (s. 2.3.2; Abbildung 2-2) verwendet. Die Fractionen, die im Dot-Blot Immunreaktivität mit dem polyklonalen Anti-Selenoprotein P-Antikörper (s. 2.1) zeigten und sich im silbergefärbten Polyacrylamidgel rein darstellten (vgl. Fractionen 6 bis 8 in Abbildung 2-2), konnten in den Experimenten mit Selenoprotein P eingesetzt werden. Für die Experimente mit Heparin-bindenden Proteinen (Proteingemisch) wurden Fractionen ausgewählt, die sich im Silbergel mit mehreren Proteinbanden darstellten und im Dot-Blot sehr schwach immunreaktiv waren (vgl. Fractionen 9+10 in Abbildung 2-2).



**Abbildung 2-2: Elutionsprofil nach  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Chromatographie**

Die Fractionen nach Nickel-NTA-Chromatographie wurden elektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE, 10% Acrylamid; 25  $\mu$ L Probe/Spur), mit Silbernitrat gefärbt und parallel im Dot-Blot (1  $\mu$ L/Dot) analysiert. Die Detektion im Dot-Blot erfolgte mit polyklonalen Anti-Selenoprotein P-Antikörpern.

Vor Verwendung in  $\text{H}_2\text{O}_2$ - und LDL-Oxidationsexperimenten wurden die Fractionen bei 4°C für 2 h gegen 5 L dd $\text{H}_2\text{O}$  (kein Zusatz von 2-Mercaptoethanol) sowie über Nacht und 2 h am folgenden Tag gegen je 5 L PBS (pH 7,4; kein Zusatz von 2-Mercaptoethanol) dialysiert. Das Vorquellen des Dialyseschlauchs (Spectra/Por, s. 2.2.1) erfolgte im Unterschied zu 2.2.1 in Abwesenheit von EDTA,

um einen Einfluß von EDTA auf die LDL-Oxidationsexperimente ausschließen zu können.

Im Anschluß wurde die Proteinkonzentration des Dialysats nach Bradford (1976) mit Hilfe des Biorad Protein Assay (Biorad, München) gegen Standards aus Rinderserumalbumin (RSA) bestimmt, die Proteinlösung aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## **2.3 Gelelektrophorese und immunochemische Methodik**

### **2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Zusammensetzung der eingesetzten SDS-Polyacrylamid-Gele erfolgte nach Angaben von Laemmli (1970) und Towbin et al. (1979):

Trenngel (12 % Acrylamid): 4% (v/v) Lösung 1; 2,5% (v/v) Lösung 2; 3,5% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}$ ;  $7 \times 10^{-3}\%$  (v/v) APS;  $7 \times 10^{-4}\%$  (v/v) N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin (TEMED). Sammelgel (4% Acrylamid): 1,34% (v/v) Lösung 1; 3% (v/v) Lösung 3; 5,66% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}$ ;  $7,5 \times 10^{-3}\%$  (v/v) APS;  $7,5 \times 10^{-4}\%$  (v/v) TEMED. Zusammensetzung der einzelnen Lösungen: Lösung 1: 30 % (w/v) Acrylamid; 0,8 % (w/v) Bisacrylamid; Lösung 2: 0,4 % (w/v) SDS; 1,5 M Tris (8 mM EDTA) pH 8,8. Lösung 3: 0,4 % (w/v) SDS; 1,5 M Tris (8 mM EDTA) pH 6,8. Elektrodenpuffer: 0,2 M Glycin; 0,1 M Tris; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,8; APS: 10-12% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat. Nach Elektrophorese wurden die Proteine im Gel entweder angefärbt oder auf eine Membran elektrotransferiert. Zur Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue wurden die Proteine im Gel durch Schwenken in einer Lösung aus 0,1% (w/v) Coomassie Serva Blue R in 10% (v/v) Eisessig, 30-40% (v/v) Methanol oder Ethanol und 50-60 % Wasser für 15-30 min fixiert und angefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Schwenken des Gels in Entfärberlösung [10% (v/v) Eisessig; 30% (v/v) Ethanol oder Methanol] entfernt.

### **2.3.2 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen**

Im Anschluß an die SDS-Gelelektrophorese (2.3.1) wurden die Gele für 30 min in Lösung 1 [40 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure] fixiert und 20 min in Lösung 2 inkubiert [30 % (v/v) Ethanol; 0,125 % (v/v) Glutardialdehyd; 0,1 % (w/v)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ; 6,8 % (w/v) NaAc]. Daraufhin wurden sie 3 x 5 min mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und für 20 min in Lösung 3 [0,25 % (w/v)  $\text{AgNO}_3$ ; 0,04 % (w/v) Formaldehyd] geschwenkt. Es wurde nochmals kurz mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen (2 x 1 min) und schließlich



5-30 min in Lösung 4 [2,5 % (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,02 % (w/v) Formaldehyd] inkubiert, wobei die Proteinbanden sichtbar wurden. Nach ausreichender Färbung konnte die Reaktion durch Inkubation mit 15 % (w/v) EDTA gestoppt werden. Die Gele wurden nun am Geldokumentationssystem Diana II (Raytest, Straubenhagen) gescannt und dokumentiert.

### 2.3.3 Elektrotransfer (Western Blot)

Nach SDS-Gelelektrophorese (2.3.1) erfolgte in einem Biorad Blotting-System (Trans-Blot SD System, Biorad, München) der Proteintransfer von Gel auf PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Amersham, Braunschweig).

Membran und 3 mm-Blottingpapiere (Schleicher & Schuell, Dassel) wurden auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Die Membran mußte für den Transfer kurz in Methanol, dann mit H<sub>2</sub>O gewaschen und für einige Minuten in Transferpuffer äquilibriert werden [Transferpuffer: 25 mM Tris; 0,2 M Glycin; 20% (v/v) Methanol; pH 8,5]. Das Gel wurde ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert und die Blottingpapiere mit Puffer genäßt. Zwei Blottingpapiere wurden auf die Anode aufgebracht, gefolgt von Membran, Gel und zwei weiteren Blottingpapieren. Der gesamte Blottingaufbau wurde dabei luftblasenfrei gehalten. Es folgte der Elektrotransfer bei ca. 60-100 mA pro Gel für 60-90 min (Richtwert: 0,8 mA/cm<sup>2</sup> für 1-2 h, die Spannung übersteigt hierbei nicht 15 V). Ein Erfolg des Transfers wurde durch Anfärben der Proteine geprüft. Die Membran wurde hierfür 1 min lang in essigsaurer Ponceau S-Lösung [0,1% (w/v) Ponceau S in 5% (v/v) Essigsäure] geschwenkt, Proteinspuren und -banden wurden dabei rot sichtbar. Vor Antikörperinkubation (s. 2.3.4) wurde die Membran kurze Zeit mit Leitungswasser entfärbt.

### 2.3.4 Dot-Blot

1 µL der mit Probenpuffer versetzten oder nativen Proteinlösung wurde vorsichtig auf Nitrocellulose-Membran (Hybond ECL, Amersham, Braunschweig) pipettiert und luftgetrocknet. Dann konnte Selenoprotein P wie unter 2.3.5 beschrieben mittels Immundetektion nachgewiesen werden.

### 2.3.5 Immundetektion

Nach dem Elektrotransfer (s. 2.3.3) wurde die PVDF-Membran kurz in TBST gewaschen [TBS (20 mM Tris; 137 mM NaCl; pH 7,6) + 0,1% (v/v) Tween-20]. Anschließend wurde sie in Blockierpuffer [5% (w/v) Magermilchpulver (Biorad,

Hamburg) in TBST] für 1 h bei Raumtemperatur geschwenkt. Der Dot-Blot auf Nitrocellulose-Membran konnte nach dem Trocknen direkt in Blockierpuffer gegeben werden. Es folgte die Inkubation mit polyklonalem Selenoprotein P-Primärantikörper (1:1000 in Blockierpuffer) über Nacht bei 4°C, Waschen der Membranen mit TBST (mindestens dreimal, je 5-10 min) am folgenden Tag und Inkubation mit Peroxidasegekoppeltem Anti-Rabbit-IgG- Sekundärantikörper (s. 2.1) für 1-2 h bei Raumtemperatur.

Die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz (ECL Plus, Amersham/Pharmacia, Braunschweig).

## 2.4 Oxidation Heparin-bindender Proteine mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Heparin-bindende Proteine wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im 1000-fachen molaren Überschuß für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Oxidation erfolgte in 1,5 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäßen (Reaktionsansatz 500 µL). Um überschüssiges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wurde anschließend mit Hilfe von Slide-A-Lyzer Dialysekassetten (Ausschlußgröße 10.000 Da, Kapazität 500 µL; Pierce/Perbio, Bonn) bei 4°C zunächst 1,5 h, dann 2 h und schließlich über Nacht gegen je 5 L PBS (pH 7,4) dialysiert.

Nach Dialyse folgte die Bestimmung der Proteinkonzentration (s. 2.2.4) und der Einsatz im LDL-Oxidationsexperiment. Ein Ansatz, dem anstatt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nur ddH<sub>2</sub>O zugesetzt wurde, diente als Kontrolle und durchlief zeitgleich dieselben Prozeduren wie der Oxidationsansatz. Der Kontrollansatz wurde ebenfalls im LDL-Oxidationsexperiment eingesetzt.

## 2.5 Oxidation von Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL)

Typische Zwischenprodukte der Peroxidation ungesättigter Fettsäuren sind konjugierte Diene. Sie haben ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 234 nm und entstehen auch bei der Oxidation von LDL. So kann der Verlauf eines Oxidationsexperiments anhand der Absorption kontinuierlich verfolgt und Einflüsse pro- oder antioxidativer Substanzen erfaßt werden. Dieses Verfahren wurde von Esterbauer et al. (1989) eingeführt und zählt zu den Standardverfahren zur Messung von LDL-Oxidation. Bei allen Experimenten mit LDL wurde der Verlauf bei einer Wellenlänge von 234 nm mit einem Lambda 2- Zweistrahlenspektrophotometer (Perkin Elmer, Überlingen) verfolgt.

### 2.5.1 Präparation von Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL)

Lipoproteine niedriger Dichte wurden nach dem Protokoll von Kleinveld et al. (1992) aus dem Plasma junger gesunder Probanden beiderlei Geschlechts präpariert. In Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman, Palo Alto, Kalifornien, USA) wurden je 0,9 mL EDTA-Plasma mit 1,87 mL einer Lösung hoher Dichte ("heavy solution", 354 g/L KBr; 153 g/L NaCl; 0,1 mg/L EDTA;  $d = 1,33$  kg/L) versetzt (Dichte nach Zusatz ca. 1,225 kg/L). Diese Lösung wurde in Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) mittels einer Spritze mit gebogener Kanüle bis zum Oberrand der Zentrifugenröhrchen mit NaCl-Lösung (8,7 g/L;  $d = 1,006$  kg/L) vorsichtig überschichtet. Zentrifugation erfolgte in einer Beckman L8-60M-Ultrazentrifuge (Beckman, Palo Alto, Kalifornien, USA) mit SW 41 Ti-Rotor für 2 h bei 120 000 g und 15°C. Die orange-gelbe Lipoproteinbande war danach in der Mitte des Zentrifugenröhrchens zu erkennen und wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt.

Über eine Sephadex PD10-Säule (Amersham/Pharmacia, Freiburg) wurden die Lipoproteine entsalzt. Dazu wurde die Säule mit ca. 20 mL PBS (pH 7,4) äquilibriert, sodann 1 mL der LDL-Lösung aufgetragen und mit 4,5 mL PBS eluiert. Die ersten 2 mL wurden verworfen, die nachfolgenden 2,5 mL mit gereinigten LDL gewonnen. Nach Bestimmen der LDL-Konzentration (2.5.2) wurde die Lösung bei 4°C im Dunkeln gelagert und innerhalb einer Woche nach Blutentnahme verwendet.

### 2.5.2 Bestimmung der Konzentration von LDL

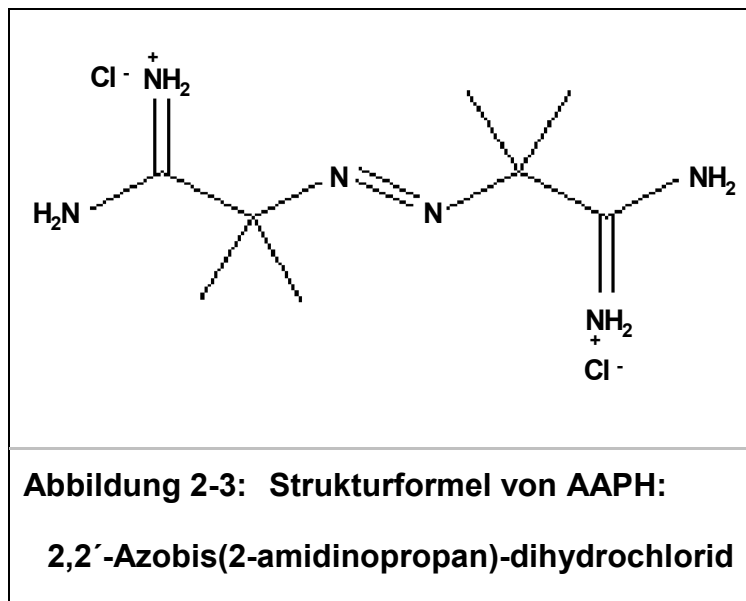
Der Cholesterin-Gehalt einer LDL-Lösung wurde mit Hilfe des CHOD-PAP-Kit von Roche Diagnostics (Mannheim) und einer Cholesterinmaßlösung (1 mg/mL, Sigma, Deisenhofen) bestimmt. Lipoproteine niedriger Dichte weisen einen konstanten Cholesteringehalt auf (31,6%; Puhl et al., 1994), so daß daraus die LDL-Konzentration errechnet werden kann. Für Konzentrationsangaben in mol/L wurde von einem Molekulargewicht von  $2,5 \times 10^6$  Da für LDL ausgegangen.

### 2.5.3 Oxidation mit Kupferchlorid ( $\text{CuCl}_2$ ) und AAPH [2,2'-Azobis(2-amidinopropan)-dihydrochlorid]

Gereinigte LDL (0,1  $\mu\text{M}$ ) wurden bei 37°C mit  $\text{CuCl}_2$  (10  $\mu\text{M}$ ) oder mit AAPH (1 mM) oxidiert. AAPH ist ein wasserlöslicher Initiator der Lipidperoxidation, der durch Zerfall  $\text{N}_2$  und Alkylradikale ( $\text{R}\cdot$ ) bildet, die mit  $\text{O}_2$  zu Peroxylradikalen ( $\text{R-OO}\cdot$ ) und damit Initiatoren der Lipidperoxidation werden. Die Zerfallsrate beträgt

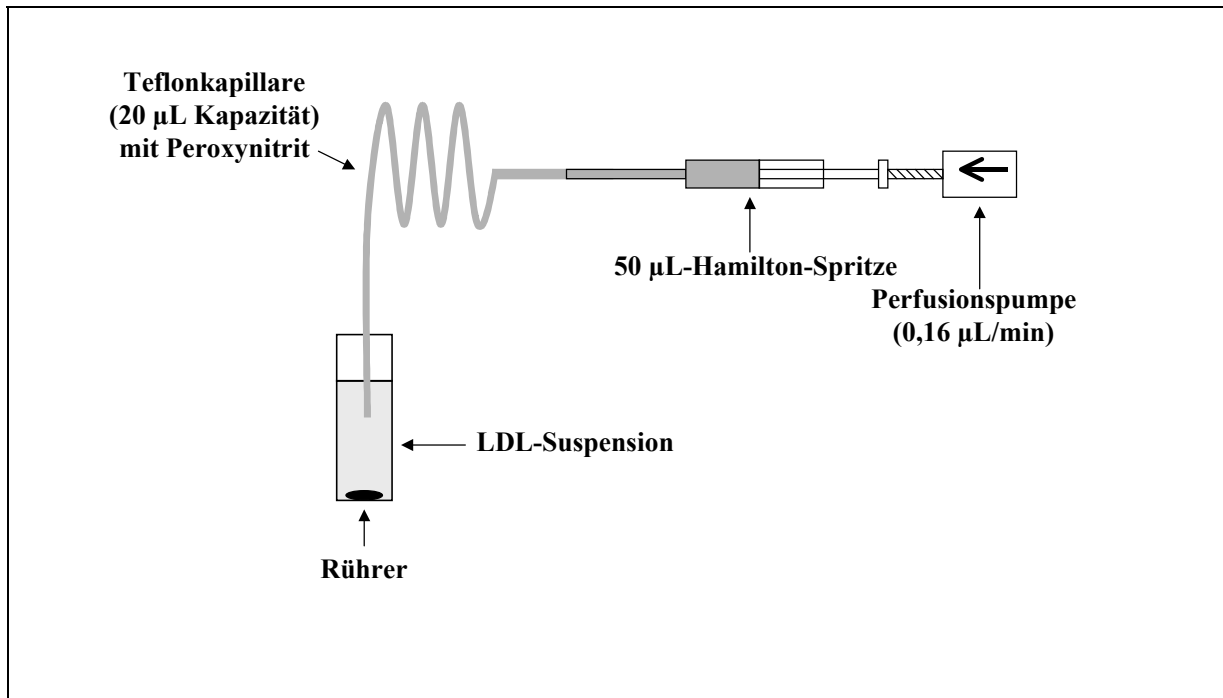
bei 37°C etwa  $1,3 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  (Bowry et al., 1993; Thomas et al., 1994), was einer Halblebensdauer von etwa 150 h entspricht.

Die Inkubation fand in 1,5 mL-Quartzküvetten statt, die in 1 mL PBS neben LDL und Oxidans je nach Versuchsansatz Selenoprotein P oder Rinderserumalbumin enthielten. In einigen Experimenten wurde zusätzlich Heparin (15 mg/mL, Heparin-Natriumsalz, Sigma H-3393, Sigma, Deisenhofen) eingesetzt (s. 3.1.1.1). Alle 5-20 min (bei AAPH bis zu 40 min) wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 234 nm aufgezeichnet.



#### 2.5.4 Oxidation mit Peroxynitrit

Zu gereinigten LDL (0,1  $\mu\text{M}$ ) in PBS wurde Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) unter Rühren bei Raumtemperatur infundiert. Die konstante Peroxynitritkonzentration in der LDL-Suspension wurde dabei mit Hilfe einer Perfusionspumpe erzielt (Flußgeschwindigkeit 0,16  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; Abbildung 2-4). Alle 20 min wurde die Absorption bei 234 nm gemessen.



**Abbildung 2-4: Infusion von  $\text{ONOO}^-$  zur Oxidation von LDL**

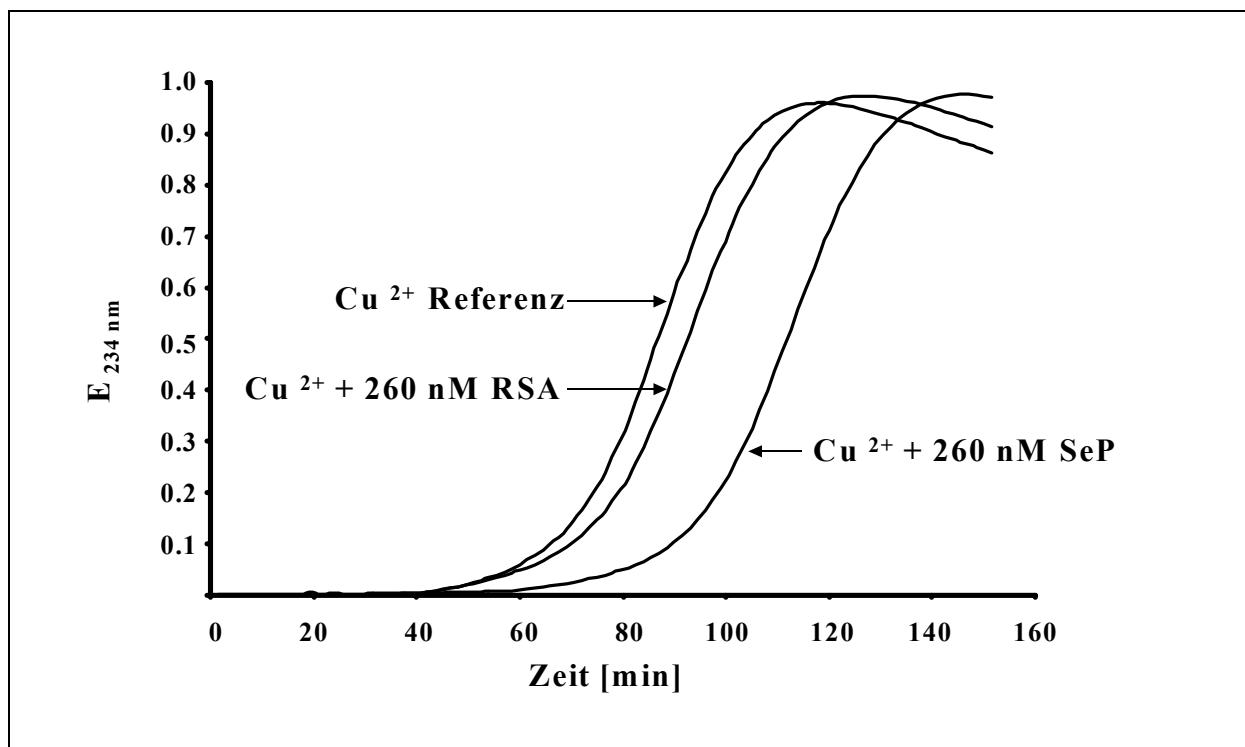
Peroxynitrit wurde unter Rühren mit konstantem Fluss infundiert, um eine Fließgleichgewichtskonzentration Peroxynitrits von etwa 7 nM (bei 10 mM Peroxynitrit-Infusionslösung) aufrecht zu erhalten. Die Bildung konjugierter Diene wurde anhand der Extinktionszunahme bei 234 nm verfolgt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Selenoprotein P als endogener Schutzfaktor bei Oxidation von LDL

##### 3.1.1 Oxidation mit Kupferchlorid ( $\text{CuCl}_2$ )

Untersucht wurde der Einfluß von Selenoprotein P auf die  $\text{CuCl}_2$ -induzierte Lipidperoxidation von LDL. Selenoprotein P und auch Rinderserumalbumin wurden in einer Konzentration von 260 nM eingesetzt, um die Effekte dieser Proteine, die ein ähnliches Molekulargewicht aufweisen, vergleichen zu können. Der Verlauf des Oxidationsprozesses wurde anhand der Bildung konjugierter Diene photometrisch verfolgt (Abbildung 3-1).



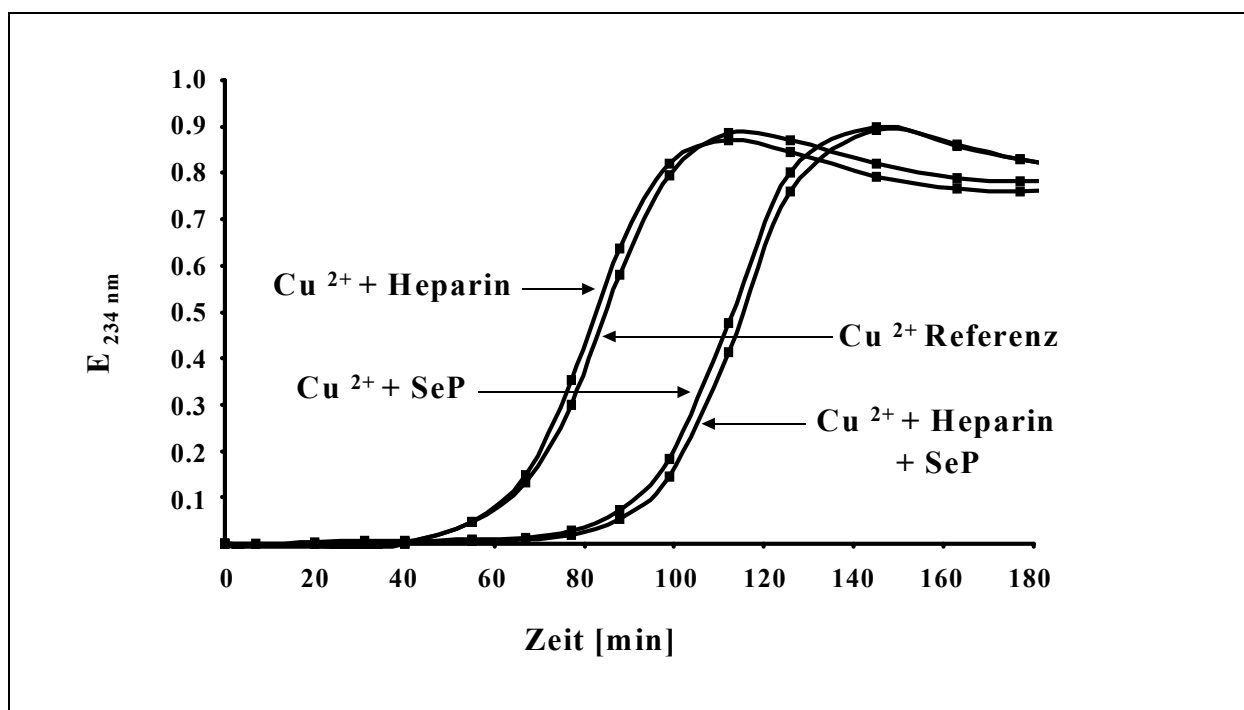
**Abbildung 3-1: Einfluß von Selenoprotein P auf  $\text{CuCl}_2$ -vermittelte LDL-Oxidation**

Gereinigte LDL ( $0,1 \mu\text{M}$ ) in PBS mit Selenoprotein P (SeP) oder Rinderserumalbumin (RSA), je 260 nM, wurden mit  $\text{CuCl}_2$  ( $10 \mu\text{M}$ ) versetzt und bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Referenz enthielt kein zusätzliches Protein. Als Maß der LDL-Oxidation wurde die Bildung konjugierter Diene photometrisch bei einer Wellenlänge von 234 nm verfolgt. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 (RSA) bis 4 (SeP) Experimente mit gleichen Ergebnissen.

Ein Ansatz ohne zusätzliches Protein, d.h. nur LDL und  $\text{CuCl}_2$  in PBS, diente als Referenz, so daß die Wirkung des Proteins im Vergleich zur Referenz ermittelt werden konnte.

Die Oxidation von LDL mit  $\text{CuCl}_2$  (2.5.3) konnte durch Selenoprotein P deutlich inhibiert werden (Abbildung 3-1). Im Vergleich zeigte sich, daß SeP den effektiveren Schutzfaktor darstellt und eine größere Verzögerung der LDL-Oxidation bewirkt als RSA. Desweiteren war festzustellen, daß bereits 100 nM SeP eine stärkere Schutzwirkung besitzt als 260 nM RSA (Daten nicht gezeigt).

Zu den Charakteristika von Selenoprotein P zählt die Eigenschaft, an Heparin zu binden. Daher wurde bei  $\text{CuCl}_2$ -induzierter LDL-Oxidation versucht, durch Zugabe von Heparin den Schutzeffekt von SeP zu verringern, weil SeP unter diesen Bedingungen möglicherweise nicht mehr für einen ausreichenden Schutz der LDL zur Verfügung steht. Selenoprotein P wurde erneut in einer Konzentration von 260 nM eingesetzt. Für Heparin kam eine in Vorversuchen (Daten nicht gezeigt)



**Abbildung 3-2: Einfluß von Heparin auf den Schutz durch Selenoprotein P bei  $\text{CuCl}_2$ - induzierter LDL-Oxidation**

Gereinigte LDL ( $0,1 \mu\text{M}$ ) in PBS mit Selenoprotein P (SeP, 260 nM) oder/und Heparin (Hep, 15  $\mu\text{g/mL}$ ) wurden mit  $\text{CuCl}_2$  ( $10 \mu\text{M}$ ) versetzt und bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Referenz enthielt nur LDL in PBS und Oxidans. Anhand der Bildung konjugierter Diene wurde der Oxidationsverlauf photometrisch bei einer Wellenlänge von 234 nm verfolgt und alle 5-20 min dokumentiert. Die Abbildung ist repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente.

ermittelte Konzentration (15 µg/mL) zum Einsatz, die selbst keinen Einfluß auf den Ablauf der LDL-Oxidation nahm. Bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht des Heparin-Natriumsalzes von 17-19 kDa (Produktinformationen zu Sigma H-3393 Heparin-Natrium Salz, Sigma, Deisenhofen), bedeutet diese Konzentration gegenüber der eingesetzten SeP-Konzentration (260 nM) einen etwa 4fachen Überschuß von Heparin. Der Verlauf der Oxidation wurde photometrisch bei 234 nm verfolgt. Die Referenz enthielt nur LDL in PBS sowie CuCl<sub>2</sub>, die übrigen Ansätze zusätzlich Heparin, Selenoprotein P oder beides gemeinsam.

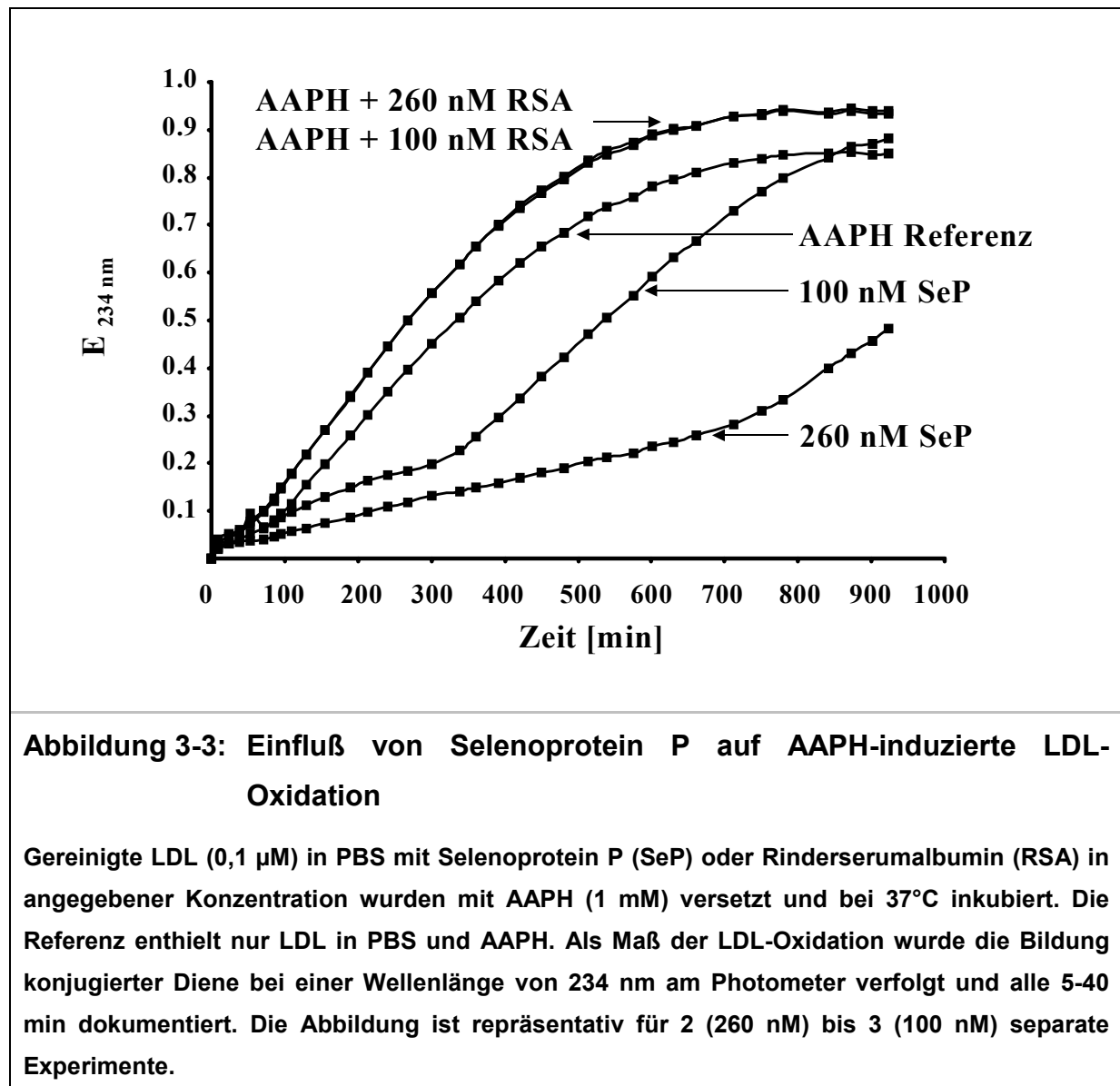
Die Zugabe von Heparin bewirkte keine Abschwächung des Oxidationsschutzes durch SeP. Abbildung 3-2 veranschaulicht, daß Heparin den Oxidationsprozeß der Referenz nicht beeinflusst, jedoch in der eingesetzten Konzentration auch den Schutzeffekt von Selenoprotein P nicht zu beeinflussen vermag.

### 3.1.2 Oxidation mit AAPH

Da der SeP-Effekt durch Cu<sup>2+</sup>-Bindung erklärbar wäre, sollte getestet werden, ob die durch ein anderes Agens induzierte Lipidperoxidation gleichermaßen durch SeP hemmbar ist. Als Initiator der Lipidperoxidation wurde AAPH verwendet. Neben 100 nM und 260 nM Selenoprotein P wurde auch Rinderserumalbumin in entsprechenden Konzentrationen eingesetzt, um einen Vergleich des Effekts von SeP mit RSA zu ermöglichen. Der Versuchsverlauf wurde bei einer Wellenlänge von 234 nm am Photometer beobachtet. Die LDL-Oxidation (2.5.3) mit AAPH (1 mM) verlief wesentlich langsamer als in den Experimenten mit Kupferchlorid (vgl. Abbildungen 3-3 mit 3-1 und 3-2).

Selenoprotein P stellte bei den Versuchen mit AAPH im Vergleich zu Rinderserumalbumin einen effektiven Oxidationsschutz für LDL dar. Abbildung 3-3 zeigt, daß RSA beider Konzentrationen gleichermaßen keinen Schutz vor LDL-Oxidation bietet, während Selenoprotein P die Oxidation in konzentrationsabhängiger Weise deutlich inhibieren kann. Die höhere SeP-Konzentration bewirkte einen entsprechend höheren Schutzeffekt.



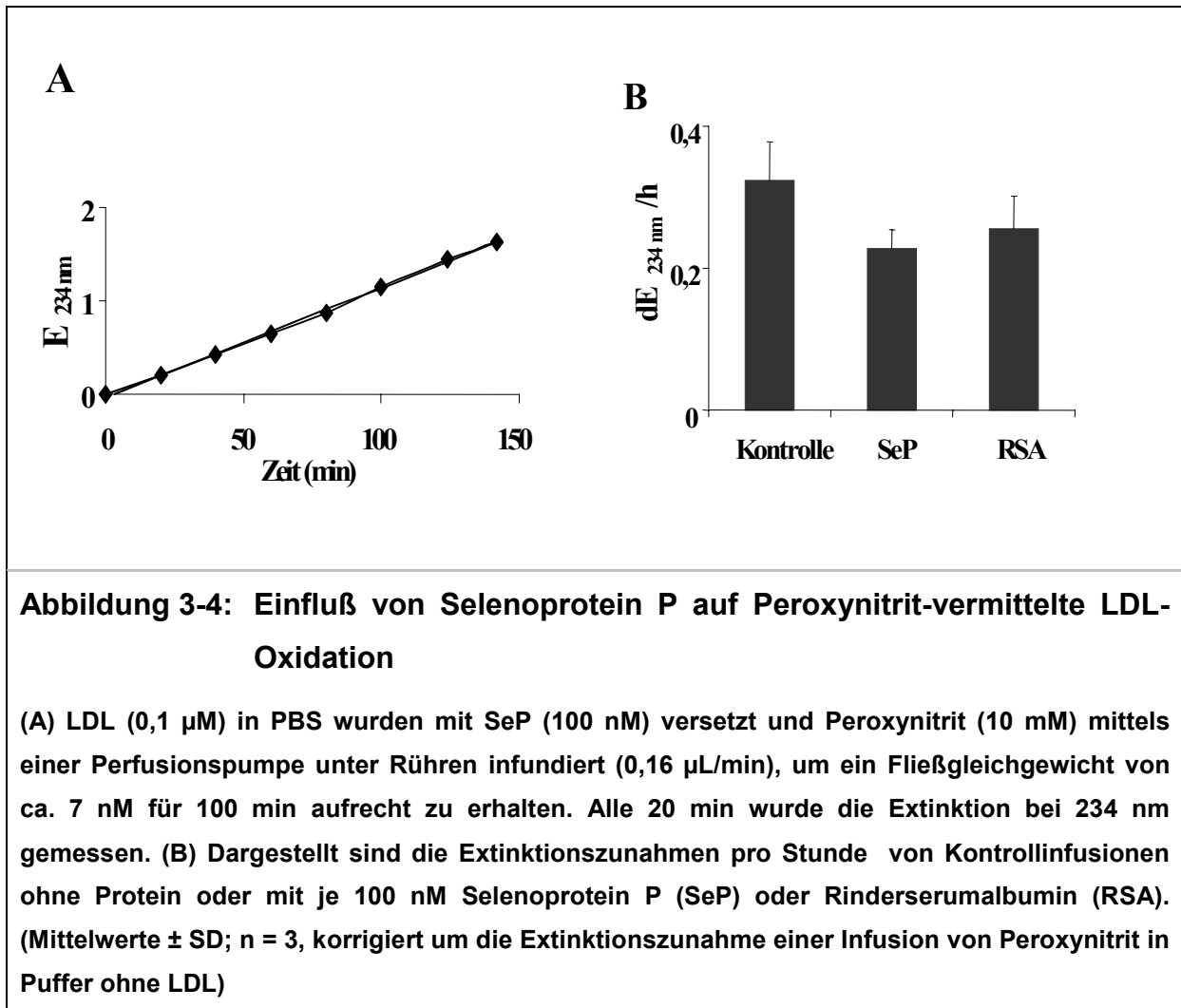


**Abbildung 3-3: Einfluß von Selenoprotein P auf AAPH-induzierte LDL-Oxidation**

Gereinigte LDL (0,1  $\mu\text{M}$ ) in PBS mit Selenoprotein P (SeP) oder Rinderserumalbumin (RSA) in angegebener Konzentration wurden mit AAPH (1 mM) versetzt und bei 37°C inkubiert. Die Referenz enthielt nur LDL in PBS und AAPH. Als Maß der LDL-Oxidation wurde die Bildung konjugierter Diene bei einer Wellenlänge von 234 nm am Photometer verfolgt und alle 5-40 min dokumentiert. Die Abbildung ist repräsentativ für 2 (260 nM) bis 3 (100 nM) separate Experimente.

### 3.1.3 Oxidation mit Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ )

Als eine weitere Möglichkeit zur LDL-Oxidation wurde die Infusion von Peroxynitrit in eine LDL-Suspension genutzt (2.5.4). Die Infusion diente dazu, für die gesamte Dauer des Versuchs (100 min) eine Fließgleichgewichtskonzentration von etwa 7 nM  $\text{ONOO}^-$  aufrecht zu erhalten und somit konstante Oxidationsbedingungen zu erzielen. Selenoprotein P hatte im Unterschied zu den Versuchen mit AAPH und  $\text{CuCl}_2$  hier nur eine geringfügige protektive Wirkung.

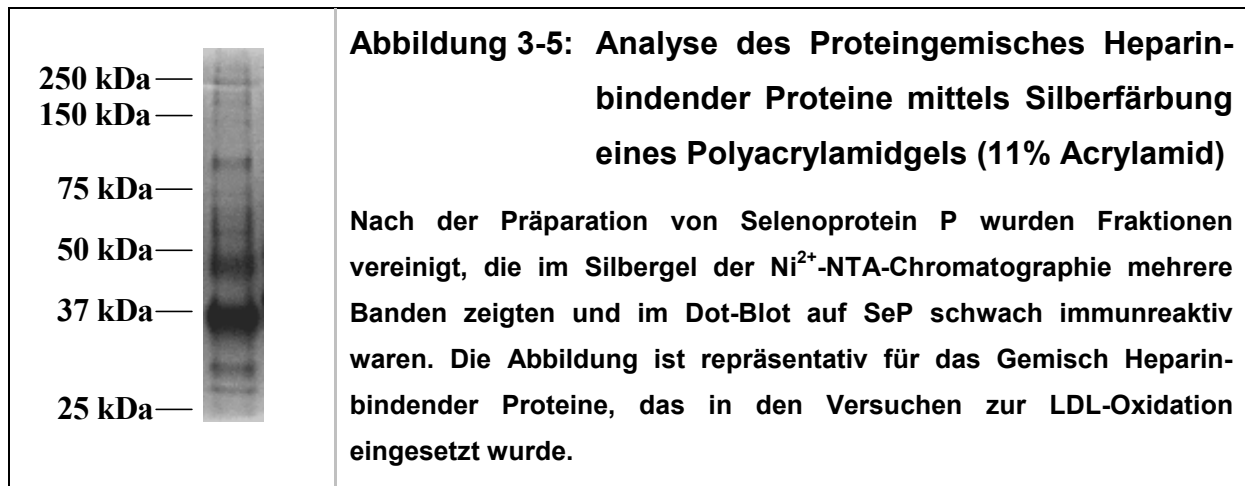


Im Gegensatz zu CuCl<sub>2</sub>/AAPH erfolgte die Zunahme der Extinktion im Falle der Peroxynitrit-Infusion linear (Abbildung 3-4 A). Alle Extinktionszunahmen wurden um die Extinktionszunahme einer Infusion von Peroxynitrit in PBS ohne LDL korrigiert. Selenoprotein P (100 nM) stellte nur einen schwachen Oxidationsschutz dar, der auf die Anwesenheit von Protein zurückzuführen war, wie Vergleich mit der RSA-Kontrolle (100 nM) zeigte (vgl. Abbildung 3-4 B).

### 3.2 Einfluß Heparin-bindender Proteine auf die LDL-Oxidation

Nach der Präparation von Selenoprotein P wurden Fraktionen vereinigt, die im Silbergel der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Chromatographie mehrere Banden zeigten und im Dot-Blot auf SeP schwach immunreaktiv waren. Es sollte untersucht werden, ob auch dieses Gemisch Heparin-bindender Proteine vor LDL-Oxidation schützt. Das Gemisch weist in Bezug auf die Affinität zu Q-Sepharose und Ni<sup>2+</sup>-NTA ähnliche Eigenschaften wie SeP auf, hat aber einen geringen Anteil von SeP, wie mit

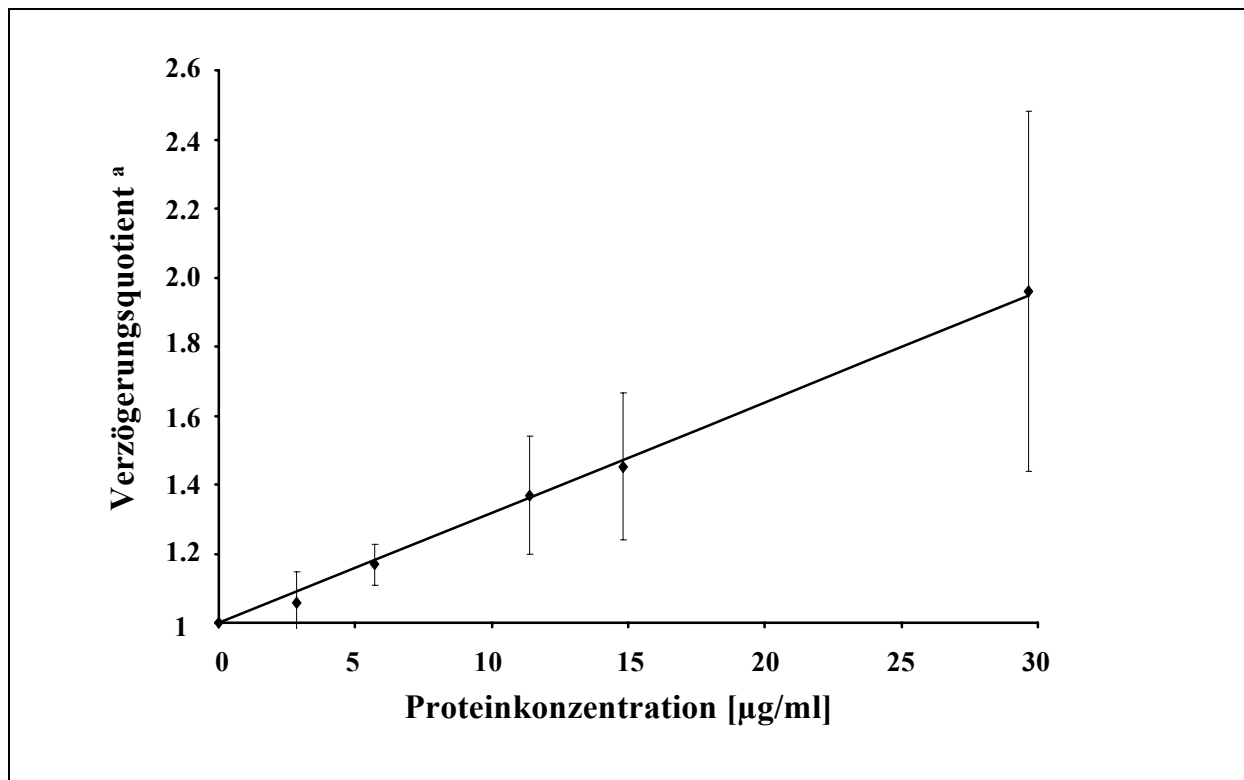
polyklonalem Antikörper nachgewiesen wurde (vgl. 2.2.3, Abbildung 2-2, Fraktionen 9+10).  $\text{CuCl}_2$  und AAPH wurden als Oxidantien eingesetzt. Abbildung 3-5 zeigt ein Silbernitrat-gefärbtes Polyacrylamidgel zur Analyse des Proteingemisches Heparin-bindender Proteine.



### 3.2.1 Oxidation mit Kupferchlorid ( $\text{CuCl}_2$ )

Analog den Versuchen zur Wirkung von Selenoprotein P (3.1.1) wurden Heparin-bindende Proteine bei der  $\text{CuCl}_2$ -induzierten Oxidation eingesetzt. Dazu wurden gleiche Proteinkonzentrationen wie im Falle von SeP verwendet. Die Ergebnisse (Daten nicht gezeigt) entsprachen im wesentlichen denjenigen in Abbildung 3-1, mit dem Unterschied, daß die oxidationsverzögernde Wirkung der Heparin-bindenden Proteine im Vergleich zu SeP etwas geringer ausfiel (vgl. Tabelle 3-1). Sie war jedoch noch immer stärker als die Wirkung der korrespondierenden RSA-Konzentration, so daß ein unspezifischer Proteineffekt durch Bindung von Kupferionen nicht wahrscheinlich ist.

Untersucht wurde weiterhin, ob sich für Heparin-bindende Proteine bei Kupferchlorid-induzierter LDL-Oxidation ein konzentrationsabhängiger Einfluß zeigen ließ. Die antioxidative Kapazität wurde anhand der Dauer der Verzögerungs-("Lag")-Phase gemessen, die nach Reaktionsstart einer meßbaren Zunahme konjugierter Diene vorausging. Der Verzögerungsquotient (Abbildung 3-6) berechnete sich als Quotient der Dauer "Lag"-Phasen von Proteinansatz und Referenz.



**Abbildung 3-6: Konzentrationsabhängiger Einfluß Heparin-bindender Proteine auf CuCl<sub>2</sub>-vermittelte LDL-Oxidation**

Gereinigte LDL (0,1 µM) in PBS mit Heparin-bindendem Protein verschiedener Konzentration wurden mit CuCl<sub>2</sub> (10 µM) versetzt und bei 37°C inkubiert. Alle 1,5 min wurde die Extinktion bei 234 nm aufgezeichnet. Nach LDL-Oxidation wurde die Dauer der "Lag"-Phasen aller Ansätze graphisch ermittelt und der Verzögerungsquotient<sup>a</sup> errechnet. Dargestellt ist der Zusammenhang zwischen Konzentration Heparin-bindender Proteine und Verzögerungsquotient. Der Referenz (LDL in PBS mit CuCl<sub>2</sub>) entspricht 0 µg/mL Protein. (Mittelwerte ± SD; n = 3)

<sup>a</sup> Verzögerungsquotient = Dauer der "Lag"-Phase<sub>Proteinansatz</sub> / Dauer der "Lag"-Phase<sub>Referenz</sub>

Im Rahmen der eingesetzten Konzentrationen zwischen 2,8 und 30 µg/mL Protein fand sich eine lineare Abhängigkeit von Proteinkonzentration und Verzögerungsquotient (Abbildung 3-6). Der Cu<sup>2+</sup>-Referenz (LDL in PBS mit CuCl<sub>2</sub>) entspricht in der Abbildung 3-6 der Wert für 0 µg/mL Heparin-bindendes Protein, also ein Verzögerungsquotient von 1.

### 3.2.1.1 Einfluß Heparin-bindender Proteine nach Oxidation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Es stellte sich die Frage, inwieweit die Oxidation von Heparin-bindenden Proteinen im Vorfeld CuCl<sub>2</sub>-induzierter LDL-Oxidation den Schutzeffekt des Proteingemischs beeinflussen kann. Heparin-bindende Proteine wurden daher

bereits vor ihrem Einsatz im LDL-Oxidationsexperiment mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidiert (s. 2.4). Im anschließenden LDL-Oxidationsexperiment wurde die Schutzfunktion der Proteine nach  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Inkubation mit einem Kontrollansatz (statt  $\text{H}_2\text{O}_2$  nur  $\text{ddH}_2\text{O}$  zugesetzt) verglichen.

Der Verzögerungsquotient der Proteine ließ sich durch vorherige Oxidation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf  $45,9 \pm 3,8 \%$  ( $n=3$ ) des ursprünglichen Wertes verringern, was einer um ca. 50% verminderten Hemmung der  $\text{Cu}^{2+}$ -induzierten LDL-Oxidation gleichkommt.

### 3.2.2 Oxidation mit AAPH

Analog den Versuchen zur Wirkung von Selenoprotein P (3.1.2) wurden Heparin-bindende Proteine ( $14,8 \mu\text{g/mL}$ ) bei der AAPH-vermittelten LDL-Oxidation eingesetzt. Sie zeigten ebenfalls antioxidative Wirkung, allerdings war der Schutz wesentlich schwächer ausgeprägt als der durch Selenoprotein P ( $14,8 \mu\text{g/mL}$ ). Rinderserumalbumin ( $17,9 \mu\text{g/mL}$ ) dagegen hatte keinen oxidationsverzögernden Effekt (Tabelle 3-1).

### 3.3 Vergleich der Wirkung von Selenoprotein P und Heparin-bindenden Proteinen

Tabelle 3-1 zeigt in einer Übersicht die Verzögerungsquotienten von Selenoprotein P, Rinderserumalbumin und Heparin-bindenden Proteinen bei  $\text{CuCl}_2$ - sowie bei AAPH-induzierter LDL-Oxidation.

Bei der  $\text{CuCl}_2$ -Oxidation zeigte sich Selenoprotein P geringfügig wirksamer als das Gemisch Heparin-bindender Proteine, das Selenoprotein P in geringer Menge enthält. Es besteht nur ein kleiner Unterschied im Verzögerungsquotienten. Anders stellte sich die Situation bei AAPH-induzierter LDL-Oxidation dar. Selenoprotein P ist hier mit einem Quotienten von 6,5 deutlich stärker antioxidativ wirksam als das Gemisch Heparin-bindender Proteine (Quotient  $1,2 \pm 0,1$ ). Für Rinderserumalbumin konnte bei  $\text{CuCl}_2$ -induzierter Oxidation mit einem Quotienten von  $1,1 \pm 0,1$  gegenüber 1,0 bei der Referenz nur eine sehr schwache Protektion nachgewiesen werden. Wurde AAPH als Oxidans eingesetzt, fand sich für RSA in der verwandten Konzentration sogar ein geringfügig prooxidativer Effekt auf LDL.

<b>Tabelle 3-1: Verzögerungsquotienten bei CuCl<sub>2</sub>- und AAPH-induzierter LDL-Oxidation</b>	
	<b>Verzögerungsquotient<sup>a</sup></b>
<b>CuCl<sub>2</sub>, 10 µM (Referenz)</b>	1
+ 14,8 µg/mL SeP <sup>b</sup>	1,6 ± 0,4
+ 14,8 µg/mL Hep-Proteingemisch <sup>b</sup>	1,4 ± 0,1
+ 17,9 µg/mL RSA <sup>b</sup>	1,1 ± 0,1
<b>AAPH, 1 mM (Referenz)</b>	1
+ 14,8 µg/mL SeP <sup>c</sup>	6,5
+ 14,8 µg/mL Hep-Proteingemisch <sup>b</sup>	1,2 ± 0,1
+ 17,9 µg/mL RSA <sup>b</sup>	0,8 ± 0,2

<sup>a</sup> berechnet als Quotient der Dauer der "Lag"-Phase von Proteinansatz und Referenz, angegeben sind Mittelwerte ± SD (n=3; <sup>c</sup> n=2)

<sup>b</sup> entspricht einer Konzentration von 260 nM SeP, RSA bzw. Hep-Proteingemisch, wobei zur Berechnung der Konzentration des letzteren ein durchschnittliches MW von 57000 Da zugrundegelegt wurde

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Selenoprotein P *in vitro* LDL-Oxidation verhindert. Bei der Oxidation mit Kupferchlorid ( $\text{CuCl}_2$ ) hatte SeP (260 nM) deutlich antioxidative Eigenschaften, Rinderserumalbumin (RSA) gleicher Konzentration dagegen nur geringe Wirkung (Abbildung 3-1). Dieser Vergleich ist interessant, weil der Schutzeffekt von RSA bei LDL-Oxidation gut untersucht ist. Schnitzer et al. (1997) wiesen nach, daß er hauptsächlich durch Bindung von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zustande kommt und andere Effekte (z. B. Abfangen generierter Radikale) wenig zum Schutz beitragen. Wäre die Wirkung von SeP ebenfalls auf diesen unspezifischen Proteineffekt zurückzuführen, so hätte sie ähnlich schwach ausfallen müssen, da beide Proteine mit einem Molekulargewicht von 69 kDa für RSA und im Schnitt (zwei Isoformen) 57 kDa für SeP ähnlich groß sind. Tatsächlich aber weist die stärkere Wirkung von SeP auf einen spezifischen Effekt hin, der auch in den Versuchen mit AAPH bestätigt wurde.

Kupferionen müssen zum Auslösen der Lipidperoxidation an LDL binden (Thomas et al., 1997), hier erfolgt die LDL-vermittelte Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  als notwendigem Schritt zum Auslösen der Oxidation (Lass et al., 1996), und es beginnt die Oxidationskettenreaktion. Selenoprotein P kann wahrscheinlich an LDL binden, denn es bindet an Glykosaminoglykane (Arteel et al., 2000), und Apolipoprotein B-100 auf der LDL-Oberfläche ist ein glykosyliertes Protein (Esterbauer et al., 1992). Durch Bindung an LDL könnte SeP vor Ort durch Abfangen von Radikalen, Reduktion von Lipidhydroperoxiden (Saito et al., 1999, Takebe et al., 2002) oder Erhalt endogener Antioxidantien wie Vitamin E, das als lipophiles Molekül im LDL-Partikel vorliegt und durch SeP oberflächlich geschützt würde, die Initiation oder das Voranschreiten der LDL-Oxidation verzögern. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher versucht, die antioxidative Wirkung von SeP durch Zugabe von Heparin (SeP bindet Heparin; Åkesson und Martensson, 1991, Hondal et al., 2001) während Kupferchlorid-induzierter LDL-Oxidation zu verringern. In Vorexperimenten wurde, da Heparin ebenfalls Kupferionen bindet, eine Heparinkonzentration ermittelt, die keinen Einfluß auf die LDL-Oxidation hatte, und diese dann im Versuch mit SeP eingesetzt. Es zeigte sich allerdings, daß eine Heparinkonzentration von 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (etwa 4facher molarer Überschuß gegenüber SeP) nicht zu einer Abschwächung des Schutzes durch SeP führte (Abbildung 3-2). Eine mögliche Erklärung ist die, daß SeP unterschiedliche Bindungsstellen für Heparin und LDL besitzt.

Als weiteres LDL-Oxidationsmittel wurde AAPH (s. Abbildung 2-3) angewandt. SeP zeigte eine sehr starke antioxidative Wirkung und verzögerte die Lipidperoxidation über mehrere Stunden (Abbildung 3-3), während die Verzögerungsphase bei  $\text{CuCl}_2$ -Oxidation nur Minuten betrug. Das Extinktionsmaximum bei 234 nm wird bei  $\text{CuCl}_2$ -induzierter Oxidation in wesentlich kürzerer Zeit erreicht, d.h. die LDL-Oxidation mit  $\text{CuCl}_2$  erfolgt schneller als mit AAPH (vgl. Zeitrahmen der Abbildungen 3-1 und 3-3). Das mag auf den langsamen, stetigen Zerfall von AAPH im Gegensatz zur direkten Verfügbarkeit von  $\text{CuCl}_2$  im jeweiligen Testsystem zurückzuführen sein. Ist somit die Freisetzung des Oxidans langsamer – wie im Falle von AAPH –, so werden antioxidative Substanzen langsamer verbraucht und Schutzwirkungen treten stärker hervor.

SeP wurde in zwei Konzentrationen (260 nM und 100 nM) eingesetzt, wobei die höhere einen entsprechend größeren Schutzeffekt erzielte. Dies läßt auf eine konzentrationsabhängige Wirkung von SeP schließen. Rinderserumalbumin (260 nM und 100 nM) hatte hier im Unterschied zur  $\text{CuCl}_2$ -vermittelten Oxidation keine protektive Wirkung, auch in Übereinstimmung mit Schnitzer et al. (1997), die für RSA bei AAPH-induzierter LDL-Oxidation nur eine geringe Wirkung im Vergleich zu  $\text{CuCl}_2$ -Oxidation feststellten. AAPH ist ein Stoff, der nicht wie  $\text{CuCl}_2$  die Bildung von Radikalen katalysiert, sondern durch Zerfall direkt Radikale bildet. Ein Schutzeffekt kann unter diesen Bedingungen durch Interaktion mit gebildeten Radikalen zustande kommen, weniger durch Binden des Initiators, wie etwa bei  $\text{CuCl}_2$ -Oxidation für RSA nachgewiesen wurde (Schnitzer et al., 1997). Die im Rahmen dieser Arbeit mit AAPH erzielten Ergebnisse legen nahe, daß SeP bei der Lipidperoxidation direkt mit gebildeten Radikalen interagieren könnte.

In einem Modell für Peroxynitrit-abhängige Reaktionen schützte SeP (SeP-angereichertes humanes Plasma) vor Hydroxylierung und Nitrierung von Benzoat (Arteel et al., 1998). Es wurde daher der Frage nachgegangen, ob SeP auch vor LDL-Peroxidation durch Peroxynitrit schützen kann. Die Ergebnisse (Abbildung 3-4) zeigen allerdings, daß SeP nur geringfügig protektiv wirksam ist und dieser Effekt im Vergleich mit Rinderserumalbumin vermutlich auf die bloße Anwesenheit zusätzlichen Proteins während der LDL-Oxidation zurückzuführen ist. Die unterschiedliche Natur der eingesetzten Oxidantien bzw. Oxidans-Erzeuger ( $\text{CuCl}_2$ , AAPH,  $\text{ONOO}^-$ ) ist eine Erklärung für unterschiedlich stark ausgeprägte Schutzfunktionen von SeP, wie es beispielsweise für Vitamin E bekannt ist. Keaney



und Vita (2002) weisen darauf hin, daß  $\alpha$ -Tocopherol typischerweise bei der Lipidperoxidation durch Ein-Elektron-Oxidantien (freie Radikale) schützt. Bei Einsatz von Zwei-Elektron-Oxidantien wie hypochloriger Säure (HOCl; Hazell und Stocker, 1997) oder Peroxynitrit erfolgt die LDL-Oxidation über einen anderen Mechanismus (Hazell und Stocker, 1993) und die Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol ist nur gering. Ähnliches gilt möglicherweise auch für Selenoprotein P.

Heparin-bindende Proteine (Abbildung 3-5) wurden ebenfalls auf einen protektiven Effekt bei LDL-Oxidation untersucht. Sie besitzen, da sie den Prozeß der SeP-Präparation bis zum Ende durchlaufen, ähnliche Eigenschaften wie SeP in Bezug auf die Affinität zu Heparin, Q-Sepharose und  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA. In Analogie zu SeP wurde unter gleichen Versuchsbedingungen eine antioxidative Wirkung für Heparin-bindende Proteine bei  $\text{CuCl}_2$ - und AAPH-induzierter LDL-Oxidation nachgewiesen. Diese war schwächer als die von SeP, jedoch stärker als die von Rinderserumalbumin (vgl. Tabelle 3-1 sowie 3.2.1 und 3.2.2). Für Heparin-bindende Proteine gilt daher wie auch für SeP, daß ihre Wirkung nicht allein durch Anwesenheit während der LDL-Oxidation erklärt werden kann. Welche Mechanismen diesen Schutzeffekt bewirken, ist jedoch unklar. Bei  $\text{CuCl}_2$ -induzierter Oxidation wurde zudem im Rahmen des eingesetzten Konzentrationspektrums eine lineare Abhängigkeit von Proteinkonzentration und antioxidativer Wirkung gezeigt (Abbildung 3-6), ein weiterer Hinweis auf einen spezifischen Proteineffekt. Im Vergleich von Heparin-bindenden Proteinen und SeP (Tabelle 3-1) fiel auf, daß SeP unabhängig vom Oxidationsmittel den größten Schutzeffekt besaß. Darüberhinaus entfaltete es seine stärkste Wirkung im Falle von AAPH (Verzögerungsquotient=6,5), während Heparin-bindende Proteine bei  $\text{CuCl}_2$ -Oxidation ihre höchste antioxidative Kapazität hatten (Verzögerungsquotient=1,4). Möglicherweise sind die Unterschiede in der Leistungsfähigkeit auf die große Zahl der Selenocysteine von SeP zurückzuführen, sie sind für Redoxprozesse prädestiniert (Briviba et al., 1996). Versuche mit dem Gemisch Heparin-bindender Proteine (3.2.1.1) zeigten, daß Redoxreaktionen beim Schutz vor LDL-Oxidation eine zentrale Rolle spielen. Die protektive Wirkung des Proteingemisches ließ sich bei der Oxidation von LDL durch vorausgehende Inkubation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  um über 50% senken. Ähnliches gilt wahrscheinlich auch für SeP, das aufgrund der gemeinsamen Präparation mit Heparin-bindenden Proteinen ähnliche Eigenschaften besitzt.

---

*In vivo* ist zur Regeneration der oxidierten Selenocysteine von SeP und zum Erhalt der Phospholipidperoxidaseaktivität (Saito et al., 1999) ein katalytischer Prozeß, ähnlich dem bei Sies et al. (1997) für Glutathionperoxidasen beschriebenen, denkbar (Arteel et al., 2002). Nachschub von Reduktionsäquivalenten in Form von Thioredoxin (Wollman et al., 1997, Soderberg et al., 2000) oder Glutathion und Glutathionkonjugaten (Loe et al., 1996, Mao et al., 2000) ist über die Zellmembran der Gefäßendothelien möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem Schutz vor LDL-Oxidation *in vitro* eine neue Eigenschaft von Selenoprotein P beschrieben. Zusammen mit einer Aufkonzentrierung von SeP am Endothel über eine Bindung an die Glykokalyx (Burk et al., 1997, Arteel et al., 2000) spricht dies dafür, daß SeP als Schutzschicht den Angriff plasmatischer Oxidantien verhindert. Über einen ähnlichen Mechanismus, bei Bindung an das glykosylierte Apolipoprotein B-100, könnte SeP den Schutz vor LDL-Oxidation bewirken. Ein sinkender pH-Wert, wie bei inflammatorischen Prozessen vorkommend, hat zudem eine verstärkte Adhäsion von SeP zur Folge (Arteel et al., 2000). Weitere Untersuchungen an Selenoprotein P werden zeigen, ob und wie weit es *in vivo* für die Protektion von LDL und damit für die Verhinderung arteriosklerotischer Prozesse Bedeutung hat.

## 5 Zusammenfassung

Selenoprotein P (SeP) ist ein Glykoprotein im Blutplasma, das mit 8-10 Selenocysteinen pro Molekül einen einzigartig hohen Selengehalt aufweist. Bekannte antioxidative Eigenschaften dieses Proteins betreffen die Protektion von Leberendothelien bei Diquat-induzierter Lipidperoxidation, Schutz vor Peroxynitrit-induzierter Lipidperoxidation und Protein-Tyrosin-Nitrierung sowie die Reduktion von Phospholipidhydroperoxiden. Selenoprotein P ist in der Lage, an Glykosaminoglykane des Endothels zu binden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein Einfluß von Selenoprotein P auf die Oxidation von Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL) untersucht werden. Kupfer(II)chlorid, 2,2'-Azobis(2-amidinopropan)-dihydrochlorid (AAPH) und Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) kamen als Lipidperoxidationsinitiatoren zum Einsatz. LDL wurden in An- oder Abwesenheit von SeP oxidiert und die Wirkung jeweils mit der von Rinderserumalbumin (RSA) verglichen, im Falle von  $\text{CuCl}_2$  und AAPH zudem mit einem Gemisch Heparin-bindender Proteine.

Aus menschlichem Blutplasma isoliertes SeP (260 nM) bewirkte eine Verzögerung der durch  $\text{CuCl}_2$  und AAPH hervorgerufenen LDL-Oxidation und war RSA gleicher Konzentration deutlich überlegen. Stärkste Protektion durch SeP wurde bei AAPH-induzierter Oxidation erzielt. Beide Proteine konnten LDL-Oxidation durch Peroxynitrit aber nicht inhibieren, was durch einen anderen Oxidationsmechanismus im Falle des  $\text{ONOO}^-$  bedingt sein könnte. Im Vergleich mit Heparin-bindenden Proteinen zeigte sich für SeP im Falle der  $\text{CuCl}_2$ -induzierten LDL-Oxidation eine etwas stärkere protektive Wirkung, die bei AAPH-induzierter Oxidation noch ausgeprägter war. Die protektive Wirkung des Proteingemisches ließ sich bei der Oxidation von LDL durch vorausgehende Inkubation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  um über 50% senken.

Mit dem Schutz vor LDL-Oxidation *in vitro* wurde eine neue Eigenschaft von Selenoprotein P beschrieben. Bindung an die Glykokalyx von Endothelien und die wahrscheinliche Bindung an LDL ermöglichen eine lokale Konzentrierung des Proteins und die Bildung einer Schutzschicht gegen den Angriff plasmatischer Oxidantien, ein Prozeß, der im Zuge inflammatorischer Prozesse mit lokal sinkendem pH-Wert an Bedeutung gewinnen könnte. Möglicherweise kann SeP als potentieller Schutzfaktor auch *in vivo* die Genese oxidiertes LDL, einen frühen, ursächlichen Schritt der Arteriosklerose, verzögern.

## 6 Literatur

- Åkesson, B., and Martensson, B. (1991). Chromatography of selenoproteins in human serum using matrix-bound heparin. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* *61*, 72-76.
- Åkesson, B., Bellew, T., and Burk, R. F. (1994). Purification of selenoprotein P from human plasma. *Biochim. Biophys. Acta* *1204*, 243-249.
- Arteel, G. E., Mostert, V., Oubrahim, H., Briviba, K., Abel, J., and Sies, H. (1998). Protection by SeP in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration. *Biol. Chem.* *379*, 1201-1205.
- Arteel, G. E., Briviba, K., and Sies, H. (1999). Protection against peroxynitrite. *FEBS Lett.* *445*, 226-230.
- Arteel, G. E., Franken, S., Kappler, J., and Sies, H. (2000). Binding of selenoprotein P to heparin: characterization by surface plasmon resonance. *Biol. Chem.* *381*, 265-268.
- Arteel, G. E., Klotz, L.-O., Buchczyk, D. P., and Sies, H. (2002). Selenoprotein P. *Methods Enzymol.* *347*, 121-125.
- Atkinson, J. B., Hill, K. E., and Burk, R. F. (2001). Centrilobular endothelial cell injury by diquat in the selenium-deficient rat liver. *Lab. Invest.* *81*, 193-200.
- Baum, M. K., Shor-Posner, G., Lai, S., Zhang, G., Lai, H., Fletcher, M. A., Sauberlich, H., and Page, J. B. (1997). High risk of HIV-related mortality is associated with selenium deficiency. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *15*, 370-374.
- Beckman, J. S., Chen, J., Ischiropoulos, H., and Crow, J. P. (1994). Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol.* *233*, 229-240.
- Berliner, J. A., and Heinecke, J. W. (1996). The Role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* *20*, 707-727.
- Besse, D., Siegler, F., Diercks, T., Kessler, H., and Moroder, L. (1997). The redox potential of selenocystine in unconstrained cyclic peptides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *36*, 883-885.
- Bowry, V. W., and Stocker, R. (1993). Tocopherol-mediated peroxidation. The prooxidant effect of vitamin E on the radical-initiated oxidation of human low-density lipoprotein. *J. Am. Chem. Soc.* *115*, 6029-6044.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* *72*, 248-254.
- Briviba, K., Roussyn, I., Sharov, V. S., and Sies, H. (1996). Attenuation of oxidation and nitration reactions of peroxynitrite by selenomethionine, selenocystine and esbelen. *Biochem. J.* *319*, 13-15.

- Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1993). Lipoprotein metabolism in the macrophage: implication for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* *12*, 223-261.
- Brown, M. S., Kovanen, P. T., and Goldstein, J. L. (1981). Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* *212*, 628-635.
- Burk, R.F. (1973). Effect of dietary selenium level on <sup>75</sup>Se binding to rat plasma proteins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* *143*, 719-722.
- Burk, R. F., Lawrence, R. A., and Lane, J. M. (1980). Liver necrosis and lipid peroxidation in the rat as the result of paraquat and diquat administration. *J. Clin. Invest.* *65*, 1024-1031.
- Burk, R. F. and Hill, K. E. (1994). Selenoprotein P. A selenium-rich extracellular glycoprotein. *J. Nutr.* *124*, 1891-1897.
- Burk, R. F., Hill, K. E., Boeglin, M. E., Ebner, F. F., and Chittum, H. S. (1997). Selenoprotein P associates with endothelial cells in rat tissues. *Histochem. Cell. Biol.* *108*, 11-15.
- Burk, R. F., and Hill, K. E. (1999). Orphan selenoproteins. *BioEssays* *21*, 231-237.
- Burk, R. F., Hill, K. E., and Motley, A.K. (2003). Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein p. *J. Nutr.* *133*, 1517S-1520S.
- Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBain, W., and Harrison, P. R. (1986). The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *EMBO J.* *5*, 1221-1227.
- Chisolm, G. M., and Steinberg, D. (2000). The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic. Biol. Med.* *28*, 1815-1826.
- Christison, J., Sies, H., and Stocker, R. (1994). Human blood cells support the reduction of low-density-lipoprotein-associated cholesteryl ester hydroperoxides by albumin-bound ebselen. *Biochem. J.* *304* ( Pt 2), 341-345.
- Clark, L. C., Combs, G. F. Jr., Turnbull, B. W. , Slate, E. H., Chalker, D. K., Chow, J., Davis, L. S., Glover, R. A., Graham, G. F., Gross, E. G., Krongrad, A., Leshner, J. L. Jr., Park, H. K., Sanders, B. B. Jr., Smith, C. L., and Taylor, J. R. (1996). Effects of Selenium Supplementation for Cancer Prevention in Patients with carcinoma of the Skin. *J. Am. Med. Ass.* *276*, 1957-1963.
- Combs, G. F., Clark, L. C., and Turnbull, B. W. (2001). An analysis of cancer prevention by selenium. *BioFactors* *14*, 153-159.
- Copeland, P.R., Fletcher, J. E., Carlson, B. A., Hatfield, D. L., and Driscoll, D. M. (2000). A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. *EMBO J.* *19*, 306-314.

- Deagen, J. T., Butler, J. A., Zachara, B. A., and Whanger, P. D. (1993). Determination of the distribution of selenium between glutathione peroxidase, selenoprotein P and albumin in plasma. *Anal. Biochem.* *208*, 176-181.
- Dreher, I., Schmutzler, C., Jakob, F., and Kohrle, J. (1997). Expression of selenoproteins in various rat and human tissues and cell lines. *J. Trace Elem. Med. Biol.* *11*, 83-91.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., and Jürgens, G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* *13*, 341-390.
- Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H., and Rotheneder, M. (1989). Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low-density-lipoprotein. *Free Radic. Res. Commun.* *6*, 67-75.
- Flohé, L., Andreesen, J. R., Brigelius-Flohé, R., Maiorino, M., and Ursini, F. (2000). Selenium, the Element of the Moon, in Life on Earth. *Life* *49*, 411-420.
- Harrison, I., Littlejohn, D., and Fell, G. S. (1996). Distribution of selenium in human blood plasma and serum. *Analyst* *121*, 189-194.
- Hazell, L. J., and Stocker, R. (1997). Alpha-tocopherol does not inhibit hypochlorite-induced oxidation of apolipoprotein B-100 of low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* *414*, 541-544.
- Hazell, L. J., and Stocker, R. (1993). Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. *Biochem. J.* *290*, 165-172.
- Hill, K. E., Zhou, J., McMahan, W. J., Motley, A. K., Atkins, J. F., Gesteland, R. F., and Burk, R. F. (2003). Deletion of Selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse. *J. Biol. Chem.* *278*, 13640-13646.
- Hill, K. E., Lloyd, R. S., and Burk, R. F. (1993). Conserved nucleotide sequences in the open reading frame and 3'untranslated region of selenoprotein P mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *90*, 537-541.
- Hill, K. E., Lyons, P. R., and Burk, R. F. (1992). Differential regulation of rat liver selenoprotein mRNAs in selenium deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *185*, 260-263.
- Hill, K. E., Lloyd, R. S., Yang, J. G., Read, R., and Burk, R. F. (1991). The cDNA for rat selenoprotein P contains ten TGA codons in the open reading frame. *J. Biol. Chem.* *266*, 10050-10053.
- Hörkkö, S., Binder, C. J., Shaw, P. X., Chang, M., Silverman, G., Palinski, W. and Witztum, J. (2000). Immunological responses to oxidized LDL. *Free Radic. Biol. Med.* *28*, 1771-1779.
- Hondal, R. J., Ma, S., Caprioli, R. M., Hill, K. E., and Burk, R. F. (2001). Heparin-binding histidine and lysine residues of rat selenoprotein P. *J. Biol. Chem.* *276*, 15823-15831.

- Iuliano, L., Mauriello, A., Sbarigia, E., Spagnoli, L. G., and Violi, F. (2000). Radiolabeled native low-density-lipoprotein injected into patients with carotid stenosis accumulates in macrophages of atherosclerotic plaque: effect of Vitamin E supplementation. *Circulation* 101, 1249-1254.
- Iuliano, L. (2001). The oxidant stress hypothesis of atherogenesis. *Lipids* 36 Suppl., S 41-44.
- Kato, T., Read, R., Rozga, J., and Burk, R. F. (1992). Evidence for intestinal release of absorbed selenium in a form with high hepatic extraction. *Am. J. Physiol.* 262, G854-858.
- Kleinveld, H. A., Hak-Lemmers, H. L., Stalenhoef, A. F., and Demacker, P. N. (1992). Improved measurement of low-density-lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein. *Clin. Chem.* 38, 2066-2072.
- Keaney, J. F., and Vita, J. A. (2002). Vascular oxidative stress and antioxidant protection in atherosclerosis. What do the clinical trials say? *J. Cardiopulm. Rehabil.* 22, 225-233.
- Koide, T., Iton, H., Otaka, A., Yasui, H., Kuroca, M., Esaki, N., Soda, K., and Fujii, N. (1993). Synthetic study on selenocystine-containing peptides. *Chem. Pharm. Bull.* 41, 502-506.
- Koppenol, W. H., Kissner, R., and Beckman, J. S. (1996). Syntheses of peroxynitrite: to go with the flow or on solid grounds? *Methods Enzymol.* 269, 296-302.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lass, A., Witting, P., Stocker, R., and Esterbauer, H. (1996). Inhibition of copper- and peroxy radical-induced LDL lipid oxidation by ebselen: antioxidant actions in addition to hydroperoxide-reducing activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1303, 111-118.
- Loe, D. W., Almquist, K. C., Deeley, R. G., and Cole, S. P. (1996). Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. *J. Biol. Chem.* 271, 9675-9682.
- Mao, Q., Deeley, R. G., and Cole, S. P. (2000). Functional reconstitution of substrate transport by purified multidrug resistance protein MRP1 (ABCC1) in phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.* 275, 34166-34172.
- Marchaluk, E., Persson-Moschos, M., Thorling, E. B., and Åkesson, B. (1995). Variation in selenoprotein P concentration in serum from different European regions. *Eur. J. Clin. Nutr.* 49, 42-48.
- Millar, K. R. (1972). Distribution of Se<sup>75</sup> in liver, kidney, and blood proteins of rats after intravenous injection of sodium selenite. *N.Z. J. Agric. Res.* 15, 547-564

- Motchnik, P. A., and Tappel, A. L. (1990). Multiple selenocysteine content of selenoprotein P in rats. *J. Inorg. Biochem.* *40*, 265-269.
- Mostert, V., Lombeck, I., and Abel, J. (1998). A novel method for the purification of selenoprotein P from human plasma. *Arch. Biochem. Biophys.* *357*, 326-330.
- Mostert, V. (2000). Selenoprotein P: Properties, functions, and regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* *376*, 433-438.
- Motsenbocker, M. A., and Tappel, A. L. (1982). A selenocysteine-containing selenium-transport protein in rat plasma. *Biochim. Biophys. Acta* *719*, 147-153.
- Müller, S., Senn, H., Gsell, B., Vetter, W., Baron, C., and Böck, A. (1994). The formation of diselenide bridges in proteins by incorporation of selenocysteine residues: biosynthesis and characterization of (Se<sub>2</sub>)-thioredoxin. *Biochemistry* *33*, 3404-3412.
- Parnham, M., and Sies, H. (2000). Ebselen: prospective therapy for cerebral ischaemia. *Expert. Opin. Investig. Drugs* *9*, 607-619.
- Persson-Moschos, M. (2000). Selenoprotein P. *Cell. Mol. Life. Sci.* *57*, 1836-1845.
- Persson-Moschos, M. (1999). Selenoprotein P: nutritional and clinical aspects. PhD dissertation, Lund University, Lund, Sweden.
- Pries, A. R., Secomb, T. W., and Gaehtgens, P. (2000). The endothelial surface layer. *Pflugers Arch.* *440*, 653-666.
- Puhl, H., Waeg, G., and Esterbauer, H. (1994). Methods to determine oxidation of low-density lipoproteins. *Methods Enzymol.* *233*, 425-441.
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis- an inflammatory disease. *New Engl. J. Med.* *340*, 114-126.
- Ross, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* *362*, 801-809.
- Saito, Y., Hayashi, T., Tanaka, A., Watanabe, Y., Suzuki, M., Saito, E., and Takahashi, K. (1999). Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein P. *J. Biol. Chem.* *274*, 2866-2871.
- Saito, Y., and Takahashi, K. (2002). Characterization of selenoprotein p as a selenium supply protein. *Eur. J. Biochem.* *269*, 5746-5751.
- Salonen, J. T., Alfthan, G., Huttunen, J. K., Pikkarainen, J., Puska, P. (1982). Association between cardiovascular death and myocardial infarction and serum selenium in a matched-pair longitudinal study. *Lancet* *2*, 175-179.
- Salonen, J. T., Salonen, R., Seppänen, K., Kantola, M., Suntioinen, S., and Korpela, H. (1991). Interactions of serum copper, selenium, and low-density lipoprotein cholesterol in atherogenesis. *BMJ* *302*, 756-760.



- Schomburg, L., Schweizer, U., Holtmann, B., Flohé, L., Sendtner, M., and Köhrle, J. (2003). Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem. J.* 370, 397-402.
- Schnitzer, E., Pinchuk, I., Bor, A., Fainaru, M., and Lichtenberg, D. (1997). The effect of albumin on copper-induced LDL oxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 1344, 300-311.
- Sevanian, A., Bittolo-Bon, G., Cazzolato, G., Hodis, H., Hwang, J., Zamburlini, A., Maiorino, M., and Ursini, F. (1997). LDL- is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein. *J. Lipid Res.* 38, 419-428.
- Sidenius, U., Farver, O., Jons, O., and Gammelgaard, B. (1999). Comparison of different transition metal ions for immobilized metal affinity chromatography of selenoprotein P from human plasma. *J. Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 735, 85-91.
- Sies, H., Sharov, V. S., Klotz, L. O., and Briviba, K. (1997). Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J. Biol. Chem.* 272, 27812-27817.
- Soderberg, A., Sahaf, B., and Rosen, A. (2000). Thioredoxin reductase, a redox-active selenoprotein, is secreted by normal and neoplastic cells: presence in human plasma. *Cancer Res.* 60, 2281-2289.
- Steinberg, D. and Witztum, J. L. (2002). Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation* 105, 2107-2111.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C., and Witztum, J. L. (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *New Engl. J. Med.* 320, 915-924.
- Steinert, P., Bächner, D., and Flohé, L. (1998). Analysis of the mouse selenoprotein P gene. *Biol. Chem.* 379, 683-691.
- Takebe, G., Yarimizu, J., Saito, Y., Hayashi, T., Nakamura, H., Yodoi, J., Nagasawa, S., and Takahashi, K. (2002). A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *J. Biol. Chem.* 277, 41254-41258.
- Thanbichler, M. and Böck, A. (2001). Selen: Biologie eines Spurenelements. *Einsichten – Forschung an der LMU München 1/2001*, 10-13.
- Thomas, M. J., Chen, Q., Franklin, C., and Rudel, L. L. (1997). A comparison of the kinetics of low-density lipoprotein oxidation initiated by copper or by azobis (2-amidinopropane). *Free Radic. Biol. Med.* 23, 927-935.
- Thomas, M. J., Thornburg, T., Manning, J. H., K., and Rudel, L. L. (1994). Fatty acid composition of low-density lipoprotein influences its susceptibility to autoxidation. *Biochemistry* 33, 1828-1834.

- 
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76, 4350-4354.
- Tujebajeva, R. M., Copeland, P. R., Xu, X., Carlson, B. A., Harney, I. W., Driscoll, D. M., Hatfield, D. L., and Berry, M. J. (2000). Decoding apparatus for eucaryotic selenocysteine insertion. *EMBO J.* 1, 158-163.
- Wilson, D. S., and Tappel, A. L. (1993). Binding of plasma selenoprotein P to cell membranes. *J. Inorg. Biochem.* 51, 707-714.
- Wollman, E. E., Kahan, A., and Fradelizi, D. (1997). Detection of membrane associated thioredoxin on human cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230, 602-606.
- Ylä-Herttuala, S., Palinski, W., Rosenfeld, M. E., Parthasaraty, S., Carew, T. E., Butler, S., Witztum, J. L., and Steinberg, D. (1989). Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J. Clin. Invest.* 84, 1086-1095.
- Yoneda, S., and Suzuki, K. T. (1997). Equimolar Hg-Se complex binds to selenoprotein P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231, 7-11.
- Yu, S. Y., Zhu, Y. J., and Li, W. G. (1997). Protective role of selenium against hepatitis B virus and primary liver cancer in Qidong. *Biol. Trace Elem. Res.* 56, 117-124.

## 7 Anhang

### Danksagung

Sicherlich bedeutet eine jede Forschungsaufgabe viel Arbeit, erfordert Kraft und Einsatz. Wie viel aber, das zeigt sich erst im Verlaufe des Projektes. Die vorliegende Dissertation hat zwei meiner Studienjahre entscheidend geprägt und mir die Möglichkeit gegeben, auf dem Gebiet der medizinischen Forschung meine eigenen Erfahrungen zu sammeln. Darüber bin ich sehr froh, und ich bin dankbar, dass ich zu jeder Zeit ausreichend Unterstützung erfuhr. Allen, die mir dabei halfen, kritisch mit mir diskutierten und mich ermunterten, gilt mein persönlicher Dank.

Dieser Dank gilt vor allem meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. Helmut Sies. Ich danke ihm für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit, diese Forschungsaufgabe übernehmen und erfolgreich zum Abschluss bringen zu können. Immer wieder hat Herr Prof. Dr. Dr. Sies meine Fragen vertieft, mir Anregungen und Hilfestellungen gegeben. Stets spürte ich sein Interesse an Entwicklung und Ergebnissen meiner Arbeit.

Herrn PD Dr. Lars-Oliver Klotz möchte ich danken für viele konstruktive Gespräche, die mich gerade auch in der schwierigen Schlussphase meiner Arbeit voranbrachten. In seiner Arbeitsgruppe habe ich mich sehr wohl gefühlt.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. Dr. Darius P. Buchczyk. Er hat meine Arbeit von Anfang bis Ende begleitet, mich in alle Arbeitstechniken eingeführt, mich gerade auch bei der Lösung sehr praktischer Probleme umfassend unterstützt und mir mit aufmunternden Worten Mut gemacht. Lange Zeit hat er die aufwendige Präparation von Selenoprotein P und die Synthese von Peroxynitrit übernommen und später bei der kritischen Durchsicht meiner Forschungsergebnisse wertvolle Hinweise gegeben.

Herrn Dr. Gavin Arteel danke ich für die Synthese des Anti-Selenoprotein P- Antikörpers, der mir für die Präparation von Selenoprotein P zur Verfügung stand. Ebenso verbunden bin ich der Blutbank Düsseldorf, die mir die für die Präparation erforderlichen Plasmakonserven bereitstellte.

Danken möchte ich aber auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, die grossen Anteil haben am angenehmen Arbeitsklima im Institut, die mir bereitwillig Tipps und Hinweise gaben und die auch noch von Zeit zu Zeit Blut für die LDL-Präparation spendeten.

Nicht zuletzt aber möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie, meinen Eltern und Geschwistern, und bei meiner Freundin bedanken. Sie haben mir während meiner gesamten Studienzzeit helfend zur Seite gestanden, sich mit mir über Erfolge gefreut und in Zeiten der Unsicherheit neue Ansätze ermöglicht und mir die Kraft gegeben, den Blick auf das Wesentliche zu lenken.

## Lebenslauf

<b>Name</b>	Henrik Traulsen	
<b>Anschrift</b>	Gerolsteiner Str. 96 50937 Köln	
<b>Geburt</b>	03.07.1976 in Kiel	
<b>Familienstand</b>	ledig	
<b>Eltern</b>	Dr. Sönke Traulsen, Staatssekretär a.D., Geschäftsführender Vorstand der Raiffeisen Hauptgenossenschaft Nord AG i.R., Ursula Traulsen, Lehrerin, Hausfrau, Malerin	
<b>Geschwister</b>	Vicki (*1968), Fridtjof (*1969), Thyge (*1972)	
<b>Schulischer Werdegang</b>	1983 – 1987	<b>Grundschule Neumünster-Einfeld</b>
	1987 – 1996	<b>Alexander-von-Humboldt-Gymnasium Neumünster</b>
	08/96	Abitur
<b>Ausbildung</b>	1996 – 1997	<b>Deutsches Rotes Kreuz</b> , Rettungsdienstschule Bellin: Ausbildung und Abschluss als staatlich geprüfter Rettungssanitäter
<b>Studienzeit</b>	1997 – 2000	<b>Medizinstudium an der Philipps-Universität Marburg</b>
	04/99	Physikum
	03/00	1. Staatsexamen
	2000 – 2004	<b>Medizinstudium an der Universität zu Köln und Promotionsstudent der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf</b>
	02/01 – 02/03	Forschungsarbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie I der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf
	09/03	2. Staatsexamen
	10/03 – 09/04	Praktisches Jahr Innere Medizin als ERASMUS-Stipendiat am Klinikum der Universität Lausanne (CH), Pädiatrie an der Kinderklinik der Universität zu Köln, Chirurgie am St. Elisabeth Krankenhaus Köln
	11/04	3. Staatsexamen und Studienabschluss