

Zur Schutzfunktion von Selenoprotein P gegen oxidativen Stress in humanen Hirnzellen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Lirija Alili

aus Krefeld

Düsseldorf
2007

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Peter Brenneisen
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Christian Ganter

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2007

*Für meine allerliebsten
Schwestern*

Inhalt

Abkürzungen	V-VII
1 Einleitung	1
Das Spurenelement Selen	1
Biosynthese und biologische Funktionen von Selenoproteinen	4
Selenoprotein P	9
Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	12
Bedeutung von Selen für das Gehirn	14
Fragestellung	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Chemikalien	18
2.1.2 Puffer und Lösungen	20
2.1.3 Antikörper	23
2.1.4 Assays/Kits	24
2.1.5 Primer für die PCR	24
2.1.6 Verbrauchsmaterialien	25
2.1.7 Geräte	25
2.1.8 Software	26
2.1.9 Verwendete Zelllinien	27
2.2 Methoden	28
2.2.1 Stammhaltung und Kultivierung der Zellen	28
2.2.2 Mykoplasmentest	29
2.2.3 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen	30

2.2.4	Allgemeine Versuchsbedingungen	30
2.2.5	Vitalitätsbestimmung (MTT-Test)	31
2.2.6	Anreicherung von Selenoprotein P aus HepG2-Zellkulturüberständen	32
2.2.7	Fluorometrische Bestimmung der Selenkonzentration	33
2.2.8	Subzelluläre Fraktionierung der Proteine	34
2.2.9	Deglykosylierung von Selenoprotein P	35
2.2.10	Transfektion mit siRNA	35
2.2.11	Enzymassays	36
2.2.11.1	LDH-assay	36
2.2.11.2	Glutathionperoxidase-Assay	37
2.2.11.3	Caspase 3/7 Aktivitätsassay	38
2.2.12	Immunologischer Nachweis von Proteinen	39
2.2.12.1	Konzentrationsbestimmungen von Proteinen	39
2.2.12.2	Denaturierende Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
2.2.12.3	Immunologischer Nachweis (Western-Blot)	41
2.2.12.4	Immunzytochemie	43
2.2.13	RT-PCR	43
2.2.13.1	Isolierung und reverse Transkription der mRNA	43
2.2.13.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	45
2.2.13.3	Agarose-Gelelektrophorese	47
2.2.14	Statistik	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Die humane Hepatoma-Zelllinie HepG2 als Bezugsquelle für Selenoprotein P	49

3.2	Expression von SeP in kultivierten Hirnzellen	56
3.2.1	SeP mRNA-Gehalt nach Stimulation mit verschiedenen Selenverbindungen	56
3.2.2	Expression von SeP in immortalen MOG-G-CCM- und SH-SY5Y-Zellen	59
3.2.3	Glykosylierung von Selenoprotein P	63
3.2.2	Immunzytochemischer Nachweis von SeP in Astrozytoma-Zellen	65
3.2.3	Subzelluläre Verteilung von Selenoprotein P in humanen Astrozytoma-Zellen	66
3.3	Antioxidativer Schutz gegen ROS-induzierte Zytotoxizität	68
3.3.1	Humane Astrozytoma-Zellen (MOG-G-CCM)	68
3.3.2	Humane Neuroblastoma-Zellen (SH-SY5Y)	76
3.3.3	Kokultursystem von MOG-G-CCM und SH-SY5Y	77
3.3.4	Die Lactatdehydrogenase als Nekrosemarker	79
3.3.5	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase als Apoptose-Marker	81
3.3.6	Caspase 3/7 Aktivitätsbestimmung	82
3.4	Vermittlung der antioxidativen Schutzwirkung von SeP durch zelluläre Selenenzyme	84
3.4.1	Modulation des mRNA-Gehaltes verschiedener Selenenzyme nach Stimulation mit Selenverbindungen	84
3.4.2	Selenabhängige Änderung der Expression der cytosolischen Glutathionperoxidase	86
3.4.3	Selenabhängige Änderung der Aktivität des Enzyms Glutathionperoxidase	88
3.5	Inhibition der intrazellulären SeP-Expression durch siRNA-Transfektion	90

4	Diskussion	93
4.1	Die humane Hepatoma-Zelllinie HepG2 als Bezugsquelle für Selenoprotein P	94
4.2	SeP-Expression in verschiedenen Hirnzellen	95
4.3	Mechanismus des Zelltodes in Astrozytoma-Zellen (MOG-G-CCM) nach Stimulation mit t-BHP	97
4.4	Antioxidativer Schutz von humanen Hirnzellen gegen ROS-induzierte Zytotoxizität	98
4.5	SeP als Selentransporter für endogene antioxidative Enzyme	99
4.6	Selenoprotein P als intrazelluläres Antioxidans	101
5	Perspektiven	102
6	Zusammenfassung	103
7	Summary	104
8	Literatur	105
	Publikationen	121
	Konferenzen und Posterbeiträge	122
	Danksagung	123
	Erklärung	125

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
t-ButOOH	tert.-Butylhydroperoxid
DAPI	Bisbenzimid
dest. Wasser	dest Wasser
DMEM	Eagle´s Medium, nach Dubblecco`s Modifikation
DMSO	N,N-Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtrphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fötales Kälberserum
GPx	Glutathionperoxidase
kb	Kilobasen
KCL	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MeOH	Methanol
MgCl₂	Magnesiumchlorid
mM	mMol/L
mm	Millimeter

mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTT	Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
Na₂HPO₄	Natriumhydrogenphosphat
nM	nmol/L
nm	Nanometer
NaN₃	Natriumazid
µm	Mikrometer
µM	µMol/L
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Pleckstrin-Homologie
PH-GPx	Phospholipid-Hydroperoxid Glutathionperoxidase
RLU	Relative Lumineszenz Einheit
pM	pmol/L
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rotationen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SBP	SECIS-bindendes Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PA-Gel	SDS-Polyacrylamidgel
SDS-Page	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sec	Selenocystein
SECIS	Selenocystein Insertionssequenz

SeP	Selenoprotein P
SN	Supernatant (Zellkulturüberstand)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	Tris-gepufferte isotonische Salzlösung mit 0,1% (v/v) Tween
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TR1	cytosolische Thioredoxin-Reduktase
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
U	Units (Enzymeinheiten)
UpM	Umdrehungen pro Minute
(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	Gewichtsprozent

1 Einleitung

1.1 Das Spurenelement Selen

Das chemische Element Selen wurde 1817 erstmals vom schwedischen Chemiker und Mineralogen Joens Jakob Berzelius aus dem Anodenschlamm einer Schwefelsäurefabrik isoliert und nach der griechischen Mondgöttin Selene benannt. Es kommt in Spuren in Blei-, Zink-, Kupfer-, Silber- und Golderzen vor. Im Periodensystem der Elemente findet sich Selen in der 3. Periode der VI. Hauptgruppe zusammen mit Sauerstoff, Schwefel, Tellur und Polonium. Obwohl es auffallende Ähnlichkeiten mit dem Tellur aufweist, ist Selen in seinen chemischen und physikalischen Eigenschaften dem Schwefel sehr viel ähnlicher. Selen besitzt die Ordnungszahl 34 mit der relativen Atommasse 78,96 g/mol. In Verbindungen kann es die Oxidationszahlen $+/-2$, 0, +4 und +6 annehmen. Außerdem kommt Selen in mehreren Modifikationen vor: einer roten, einer schwarzen und einer metallisch grauen Form. Selen hat im Gegensatz zu Schwefel eine deutlich größere Atomhülle und besitzt dadurch eine höhere Nukleophilie.

In der chemischen Industrie wird es als hitze- und lichtbeständiger roter Pigmentfarbstoff verwendet [Holleman et al., 1985]. Außerdem sind die Halbleiterherstellung, Herstellung von Belichtungstrommeln für Kopierer und Drucker und die Verwendung in Anti-Schuppen-Haarshampoos nur Einzelbeispiele für die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von Selen.

Lange Zeit galt Selen als toxisch, bis es 1957 als essentielles Spurenelement für Mensch und Tier erkannt wurde [Schwarz und Foltz, 1957]. Selen kann sowohl aus anorganischen als auch aus organischen Verbindungen im Gastrointestinaltrakt gut metabolisiert werden. Je nach Selenanreicherung im Boden [Oldfield, 1999/2002] können starke Schwankungen bei der Versorgung der Bevölkerung mit Selen auftreten. Skandinavische Regionen als auch Gebiete in Nord- und Ostasien sind als Selenmangelgebiete anzusehen.

Als relativ selenreich kann man z.B. die Rocky Mountains bezeichnen. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. empfiehlt eine Selenaufnahme von 30-70 µg pro Tag [Deutsche Gesellschaft für Ernährung, 2000]. Neben Fleisch, Getreide und Gemüse dient auch Seefisch als Selenquelle. Menschen nehmen Selen in anorganischer Form als Natriumselenit (Na_2SeO_3) und Natriumselenat (Na_2SeO_4), oder als organische Verbindungen wie Selenomethionin und Selenocystein auf [Oster, 1992; Oster et al., 1989]. Selenomethionin wird im Körper viel schneller umgesetzt als anorganische Selenverbindungen [Vendeland et al., 1992], es wird allerdings teilweise unspezifisch an Stelle von Methionin in Proteine eingebaut. Im Selenstoffwechsel des Menschen stellt Selenwasserstoff H_2Se den zentralen Knotenpunkt dar. Wie Abb.1 zeigt werden anorganische Selenverbindungen nichtenzymatisch über instabile Zwischenprodukte wie Selendiglutathion (Oxidationsstufe: +/- 0) zu Selenwasserstoff (Oxidationsstufe -2) reduziert. Dieses kann entweder zu Selenophosphat aktiviert werden und schließlich in Form der 21. Aminosäure Selenocystein in Proteine eingebaut werden oder nach sequentieller Methylierung als Dimethyl-Selen über den Urin bzw. als Trimethyl-Selen durch die Atmung ausgeschieden werden [Ganther, 1999; Ogasawara et al., 2001].

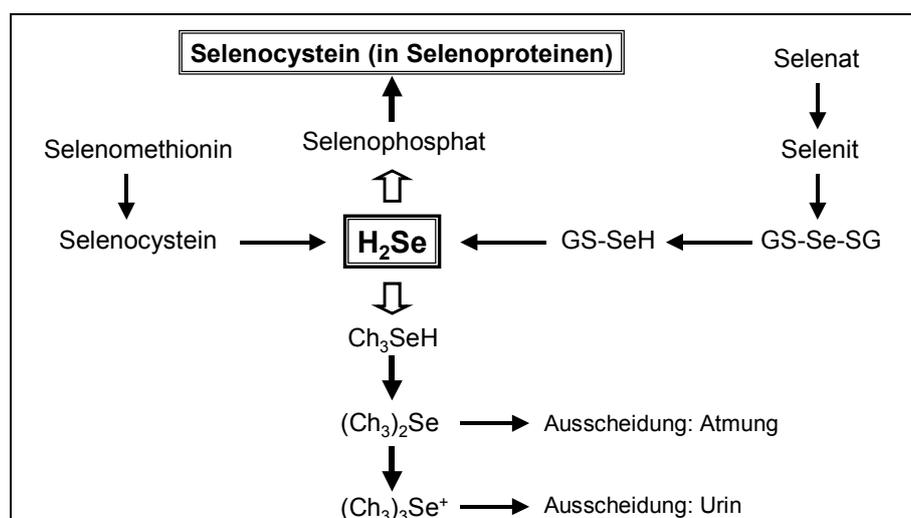


Abbildung 1: Stoffwechselwege von Selenverbindungen (modifiziert nach Ip 1998)

Wie wichtig eine ausreichende Selenversorgung ist, zeigen verschiedene mit Selenmangel assoziierte Krankheitsbilder. In China treten aufgrund der Unterversorgung zwei verschiedene Erkrankungen auf [Levander, 1987]. Die Keshan-Krankheit tritt hauptsächlich im Nordosten Chinas auf und betrifft hauptsächlich junge Frauen und Kinder. Häufig geht die Krankheit mit einer Infektion mit dem Coxsackie-Virus (CVB3) einher und führt zu Herzmuskelentzündungen (Kardiomyopathie). Sie ist nicht mit einer normalen Kardiomyopathie vergleichbar [Ge et al., 1983], dies ist in einer Studie mit Mäusen genauer untersucht worden [Beck et al., 2003]. Aus CVB3-infizierten Selen-defizienten Mäusen wurde das Virus isoliert und auf Selen-supplementierte Mäuse übertragen. Diese Mäuse entwickelten schließlich auch eine Myokarditis. Durch Untersuchung des Genoms der infektiösen Coxsackie-Viren wurden sechs Punktmutationen identifiziert, welche durch den Selenmangel des ersten Wirtes induziert worden waren. Bei der Kashin-Beck Erkrankung handelt es sich um eine degenerative Gelenkentzündung (Osteoarthropathie), die meistens Kinder im pubertären Alter betrifft [Yang et al., 1993; Moreno-Reyes et al., 1998]. Sie wird im Norden Chinas, Nordkorea und Sibirien beschrieben [Levander, 1987]. Zu Beginn der Krankheit kann eine Selensupplementierung zu einer deutlichen Besserung des Krankheitsbildes führen.

Neben diesen Erkrankungen kann Selenmangel auch zu nicht so gravierenden Symptomen, wie Müdigkeit, Haarausfall und Nagelveränderungen führen. Eine wesentliche Rolle spielt Selen in der männlichen Fruchtbarkeit. Es wird einerseits zur Bildung von Spermatozoen als auch zur Testosteron-Biosynthese verwendet [Behne et al., 1996]. Auch bei einer parenteralen Ernährung sollte darauf geachtet werden, dass genügend Selenzusatz erfolgt [Gramm et al., 1995].

Allerdings ist die Überdosierung mit Selen schnell erreicht und kann ebenso zu erheblichen Gesundheitsproblemen führen. Schon eine 3-4 fache Überschreitung der angegebenen täglichen Höchstdosis kann reversible toxische Effekte verursachen.

Es kann zu Haut- (Rötung, Schwellung), Haar- und Nagelveränderungen, als auch zu Neurotoxizität (cerebrale Anfälle, Lähmungen, motorische Unruhe) kommen. Pro Tag liegt die toxische Grenze also bei 800 µg Selen [Holben et al., 1999; Combs et al., 1986; Bähr et al., 1999; Foster et al., 1997].

1.2 Biosynthese und biologische Funktionen von Selenoproteinen

Erst im Jahre 1973 konnte mit der Entdeckung des antioxidativ wirksamen Enzyms der cytosolischen Glutathion-Peroxidase (cGPx, GPx-1) gezeigt werden, dass Selen einen essentiellen Bestandteil von Selenenzymen darstellt [Rotruck et al., 1973; Flohé et al., 1973].

Man unterscheidet drei Klassen von Proteinen, die Selen enthalten: spezifische und unspezifische Selenoproteine als auch Selen-bindende Proteine. In den spezifischen Selenoproteinen ist Selen in Form von Selenocystein enthalten und für deren biologische Funktionen unabdingbar. Die unspezifischen Selenoproteine enthalten Selen vorwiegend als Selenomethionin, aber auch als Selenocystein, welche unspezifisch in Proteine eingebaut werden und lediglich die schwefelhomologen Aminosäuren Methionin und Cystein ersetzen. Die Selen-bindenden Proteine bilden die dritte Gruppe der selenhaltigen Enzyme. Es wird angenommen, dass sie Transport- und Speicherfunktionen für das Element übernehmen.

Die spezifischen Selenoproteine sind die eigentlichen Selenoproteine. Sie werden genetisch codiert und physiologisch reguliert. Die unspezifischen Selenoproteine inkorporieren zwar Selen, haben allerdings keinerlei Selen-spezifische Funktion im menschlichen Organismus [Reilly, 1996; Behne et al., 2001; Ganther et al., 1997].

Seit den 70er Jahren war bekannt, dass 61 Basen-Triplett-Kombinationen für die 20 Aminosäuren codieren (Sinn-Codon) und 3

Basen-Triplets die Termination der Translation veranlassen (Stop-Codon). Der genetische Code wurde durch die Identifizierung der spezifischen tRNA^{[ser]^{sec}} [Diamond et al., 1981; Hawkes et al., 1982] und durch die Entdeckung der zusätzlichen Funktion des Stop-Codons UGA als Codon für Selenocystein [Chambers et al., 1986] erweitert.

Selenocystein wird auch als 21. proteinogene Aminosäure bezeichnet [Lee et al., 1990; Böck et al., 1991]. Bei physiologischen pH-Werten weist die Selenolgruppe des Selenocysteins im Vergleich zur Thiolgruppe des Cysteins ein höheres Redoxpotential auf, daher hat der Einbau von Selenocystein anstelle von Cystein eine höhere Reaktivität der Selenenzyme zur Folge [Axley et al., 1989; Stadtman, 1996]. Zudem weist die Selenolgruppe des Selenocysteins einen geringeren pKa-Wert (pKa 5,2) auf, als die Thiolgruppe des Cysteins, und besitzt dadurch eine höhere Reaktivität [Stadtman, 1996].

Lange Zeit war der Mechanismus des Einbaus von Selenocystein in die Polypeptidkette von Selenoproteinen unbekannt. Die Tatsache, dass eines der Stoppcodons, das UGA-Codon, für Selenocystein codieren kann, wurde erst im Jahre 1986 herausgefunden [Chambers et al., 1986].

Die Biosynthese von eukaryotischen Selenoproteinen ist schematisch in Abb. 2 gezeigt. Die mRNAs von Selenoproteinen enthalten ein oder mehrere UGA-Codons, welche üblicherweise zum Abbruch der Proteinsynthese führen würden. Wesentlich für den Einbau des Selenocysteins während der Translation sind die haarnadelförmigen Sekundär-Strukturen in der nicht-translatierten Region am 3'-Ende der mRNA, die sogenannten Selenocystein-Insertionssequenzen (SECIS) [Hill et al., 1993]. Lediglich wenn diese Strukturen vorhanden sind, kann das Stoppcodon UGA für ein Selenocystein codieren.

Durch die Beladung der Selenocystein-tRNA (tRNA^{Sec}) mit einem Serylrest beginnt die Biosynthese von Selenoproteinen. Mit Hilfe der Selenocystein-Synthase und aktivem Selenophosphat wird aus der Seryl-tRNA^{Sec}, die Selenocysteyl-tRNA^{Sec} (Sec-tRNA^{Sec}) synthetisiert.

Für die Synthese von Selenoproteinen benötigen Eukaryonten mindestens fünf weitere Proteine, von denen das SECIS-bindende Protein (SBP2) [Copeland et al., 2000] und ein Selenocystein-spezifischer Elongationsfaktor eSelB [Tujebajeva et al., 2000] in Abb.2 ebenfalls dargestellt sind. SBP2 bindet an die Haarnadelstruktur der mRNA und bildet einen Komplex mit dem Elongationsfaktor eSelB der die Selenocysteyl-tRNA gebunden hat. Dieser Gesamtkomplex sorgt dann bei Vorliegen des UGA-Codons in der mRNA für den Einbau von Selenocysteinen in das Protein. Noch nicht so lange bekannt sind das ribosomale Protein L30, das 43 kDa RNA-bindende Protein Secp43 und das lösliche Leberantigen (soluble liver antigen) SLA als Komponenten des Selenoprotein-Biosynthese-Komplexes [Chavatte et al., 2005; Xu et al. 2005].

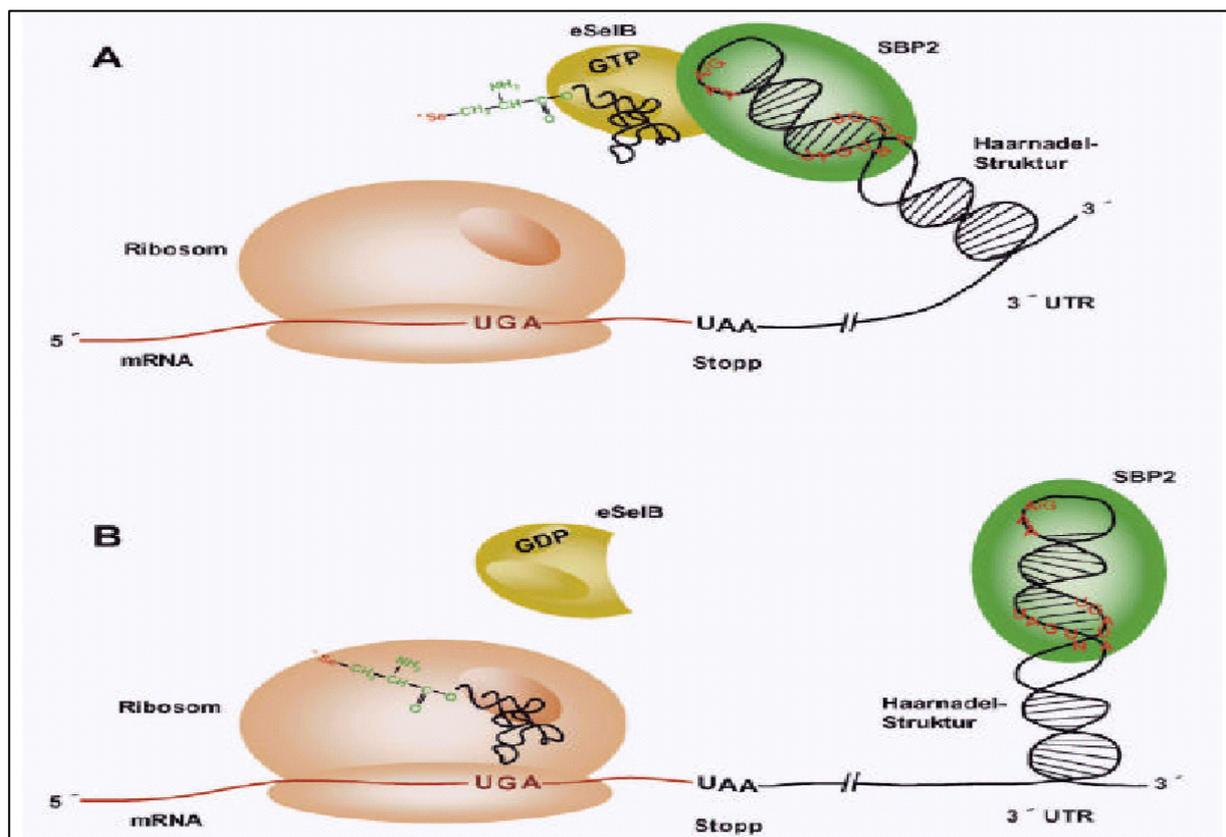


Abbildung 2: Einbau von Selenocystein in Proteine [Thanbichler et al., 2001]

- A)** Die Haarnadelstruktur am 3'-untranslatierten Ende der mRNA im Komplex mit dem SBP2-Protein und dem eSelB liefert die Selenocysteyl-tRNA an das Ribosom
B) Nach Abgabe der beladenen tRNA an das Ribosom dissoziiert der Komplex

Beim Menschen wurden bisher 25 Selenoproteine identifiziert [Kryukov et al., 2003], allerdings fehlen bei etwa der Hälfte der Proteine genaue Angaben zu ihrer biologischen Funktion. Die Funktionen der Selenenzymfamilien der Glutathion-Peroxidasen (GPx), Thioredoxin-Reduktasen (TR) und Iodothyronin-Deiodasen (Dio) sind am besten erforscht. Die vier GPx-Enzyme, sowie die drei TR-Enzyme sind in den antioxidativen Schutz von Zellen (durch Katalyse der Entgiftung von Hydroperoxiden) sowie in die Regulation der zellulären Redox-Homöostase und der Redox-sensitiven Transkription von Genen involviert [Brigelius-Flohé, 1999; Grömer et al., 1999], während die drei Dio-Isoenzyme Aktivierung und Inaktivierung von Thyroidhormonen katalysieren [Köhrle, 2005].

Ein Überblick über Expression und Funktionen der bisher charakterisierten eukaryotischen Selenoproteine ist in Tab. 1 gegeben.

Tabelle 1: Eukaryotische Selenoproteine und deren diskutierte Funktionen im Organismus [modifiziert nach: Kyriakopoulos und Behne, 2002; Papp et al., 2007]

	Lokalisation (human)	Funktion
Glutathion-Peroxidasen (GPx)		
GPx-1 (cGPx)	ubiquitär (Cytosol, Mitochondrien)	Antioxidans (Abbau von Hydroperoxiden)
GPx-2 (GI-GPx)	Gastrointestinaltrakt (Cytosol)	lokaler Oxidationsschutz
GPx-3 (eGPx)	Plasma (von Nieren sezerniert)	Oxidationsschutz im Plasma
GPx-4 (PH-GPx)	ubiquitär (Cytosol und membran-assoziiert)	Antioxidans, Membranschutz, Strukturprotein in Spermien
Thioredoxin-Reduktasen (TR)		
TR-1	ubiquitär (Cytosol)	Reduktion von Thioredoxin
TR-2	ubiquitär (Mitochondrien)	Lokaler Oxidationsschutz
TR-3	Testis	Unbekannt
Iodothyronin-Deiodasen		
Dio-1	Leber, Niere, Schilddrüse, Hypo-physe (Plasmamembran)	Triiodthyronin (T3)-Synthese aus Thyroxin (T4), T3- und T4-Abbau
Dio-2	Schilddrüse, Herz, ZNS, braunes Fettgewebe, Plazenta	Triiodthyronin (T3)-Synthese aus Thyroxin (T4)
Dio-3	ZNS, Haut, Plazenta (Plasmamembran)	T3- und T4-Abbau
Selenophosphat-Synthetase 2	ubiquitär	Synthese von Selenoproteinen
Methionin-Reduktase B	Leber, Niere, Hirn	Reduktion von Methioninsulfoxid
Selenoprotein P	Plasma (von Leber sezerniert), ubiquitäre mRNA Expression	Selen-Transportprotein, Antioxidans
Sep 15	Ubiquitär (ER)	Qualitätskontrolle von Glykoproteinen

1.3 Selenoprotein P

Selenoprotein P wurde als zweites Selenoprotein 1977 im Blutplasma entdeckt [Herrman, 1977] und nach seiner hauptsächlichen Lokalisation benannt (P für Plasma). Weitere Untersuchungen zeigten, dass im Selenoprotein P (SeP) Selen in Form von Selenocystein gebunden ist [Burk et al., 2001]. Im humanen Blutplasma ist es das häufigste Selenoprotein mit einer Konzentration von 40 nmol/l [Akesson et al., 1994]. SeP enthält 60% des gesamten Selens im humanen Blutplasma [Burk et al., 1994].

Humanes SeP besteht aus 381 Aminosäuren. Während die meisten der bisher bekannten Selenoproteine pro Polypeptidkette einen Selenocysteinrest enthalten, bildet Selenoprotein P eine Ausnahme, es besitzt (beim Menschen) 10 Selenocysteinreste [Hill et al., 1991]. Ein Selenocystein befindet sich als 59. Aminosäure im N-Terminus und die übrigen neun Selenocysteine im C-Terminus (AS 300-381) des Proteins, vier davon unter den letzten 15 Aminosäuren (AS 367-381) [Burk et al., 1994; Hill et al., 1993] (siehe Abb. 3). Neben dem humanen SeP sind auch die von der Maus (10 SeC), vom Rind (12 SeC) [Saijoh et al., 1995] und Zebrafisch (17 SeC) erforscht [Kryukov et al., 2003; Thisse et al., 2003].

Die Aminosäurenanalyse von humanem SeP ergab einen SeC-Gehalt von sieben bis acht pro Polypeptidkette, was im Widerspruch zu den aus der Aminosäuresequenz erwarteten zehn Selenocysteinen steht. Eine Zerstörung der Selenocysteine während der Präparation und Modifikation bzw. ein vorzeitiger Abbruch an einem UGA-Codon werden als Ursache hierfür diskutiert [Burk et al., 1994; Hill et al., 1991; Hill et al., 1993; Himeno et al., 1996; Read et al., 1990].

Aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften (siehe Abb. 3) erfüllt SeP die Voraussetzungen für eine Doppelrolle als antioxidatives Enzym und Selentransportprotein. SeP kann als antioxidatives Enzym Phospholipidhydroperoxide reduzieren [Takebe et al., 2002], sowie die Oxidation und Nitrierung von Plasmaproteinen inhibieren [Arteel et al., 1998].

In einer *in vivo* Studie schützte SeP Ratten vor oxidativen Leberschäden, die durch das Herbizid Diquat generiert wurden [Burk et al., 1995].

Die N-terminale Domäne von SeP, welche ein Selenocystein, eine Heparinbindestelle sowie zwei Histidin- und Lysinreiche Regionen (AS 204-217 und AS 244-253 in humanem SeP) enthält, besitzt *in vitro* enzymatische Aktivität und bindet an Zellmembranen. Sie sind wahrscheinlich auch für dessen Fähigkeit verantwortlich, Schwermetallionen wie z.B. Kadmium oder Quecksilber [Yoneda et al., 1997] zu komplexieren.

Die C-terminale Domäne von SeP mit bis zu neun Selenocysteinen ist demgegenüber für den Transport von Selen verantwortlich [Motsenbocker et al., 1982; Saito et al., 2004]. Versuche an SeP-Knockout-Mäusen, in deren peripheren Organen stark verminderte Selenkonzentrationen beobachtet wurden, unterstützen diese Theorie [Hill et al., 2003; Schomburg et al., 2003].

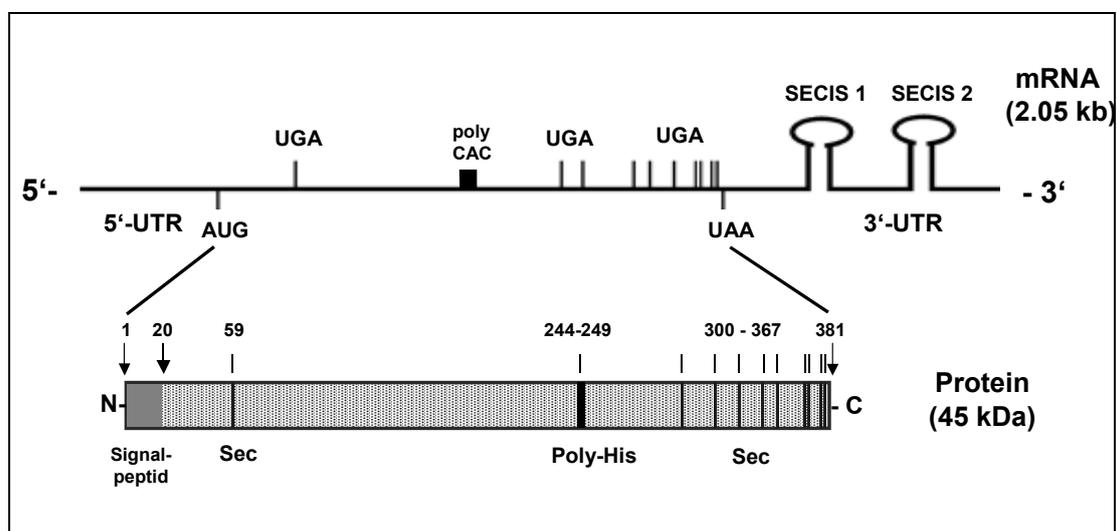


Abbildung 3: Schematische Darstellung des humanen Selenoprotein P

SeP wird hauptsächlich von der Leber produziert und in Form zweier hochglykosylierter Isoformen mit Molekulargewichten von 51 bzw. 61 kDa sezerniert [Mostert et al., 1998]. Biosynthese und Sekretion von SeP durch die Leber sind von einer adäquaten Versorgung mit Selen abhängig,

so dass die SeP Konzentration im Blutplasma als ein Marker für den Selen-Ernährungsstatus von Menschen genutzt werden kann [Hill et al., 1996]. Die Leber produziert etwa 75% des im Plasma befindlichen Selenoprotein P [Carlson et al., 2004] und ist damit hauptsächlich für die Regulation des Selenkreislaufs im Organismus verantwortlich. Abgesehen von der *in vivo* Regulation der SeP-Biosynthese durch das mit der Nahrung aufgenommene Selen wurde in humanen Leberzellen *in vitro* eine Inhibition der Transkription und Sekretion von SeP durch das Zytokin Transformierender Wachstumsfaktor Beta1 (TGF- β 1) beobachtet. Da in Reporterassays auch die proinflammatorischen Zytokine Interferon gamma (IFN- γ), Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und Interleukin 1beta (IL-1 β) inhibitorisch auf die Transkription von SeP in kultivierten Leberzellen wirkten, wurde SeP als ein negatives Akutphase-Protein postuliert [Mostert et al., 1999]. Allerdings wurden diese *in vitro* Versuche mit Zytokinen bisher nicht *in vivo* verifiziert. Eine mRNA Expression von SeP wurde nicht nur in der Leber, sondern auch in einer Vielzahl von anderen Organen und in kultivierten Zellen beobachtet, wobei Nieren und Herz besonders hohe Konzentrationen an SeP mRNA aufwiesen [Burk et al., 1994; Dreher et al., 1997].

Bei Ratten liegt die Halbwertszeit von SeP im Plasma bei 3-4 Stunden; besonders gut wird das im SeP gebundene Selen durch Hoden und Hirn aufgenommen [Burk et al., 1991]. Immunhistochemisch wurde eine Assoziation von SeP mit Endothelzellen in Leber, Nieren und Hirn nachgewiesen [Burk et al., 1997], an deren Membranen SeP vermutlich mittels seiner Heparin-Bindungsstelle, eines Clusters von Histidin- und Lysinresten, bindet [Arteel et al., 2000; Hondal et al., 2001]. Aufgrund der Bindungscharakteristika von SeP an seine Zielzellen wurde außerdem ein spezifischer Rezeptor für SeP postuliert [Wilson et al., 1993], der vor kurzem als Apolipoproteinrezeptor ApoER-2 identifiziert werden konnte [Olson et al., 2007].

Die Bindung von SeP an Heparin ist im physiologischen Bereich pH-sensitiv und wird mit zunehmendem pH-Wert schwächer. Daher wurde

vermutet, dass SeP bei Entzündungsreaktionen (z.B. im Endothel), wenn die pH-Werte typischerweise niedrig sind, besonders gut an seine Zielzellen binden und zu deren antioxidativen Schutz beitragen kann, sollte es in diesen zu einer Zunahme der Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies kommen.

1.4 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species: ROS) entstehen sowohl endogen in biologischen Systemen des oxidativen Zellstoffwechsels bei der oxidativen Phosphorylierung (Atmungskette) als auch exogen z.B. durch UV-, Röntgen- oder γ -Strahlung und Chemikalien. Einige Studien beschreiben die Wachstumsfaktor-/Zytokin-vermittelte Bildung von ROS während physiologischer Signalkaskaden durch membranlokalisierte Oxidasen, wie zum Beispiel die NADPH-Oxidase [Jones et al., 1994; Hiran et al., 1997; Bayraktutan, 1998].

Bei Sauerstoff-verstoffwechselnden Organismen sind die Mitochondrien eine Hauptquelle für die Entstehung von ROS. Bei aeroben Organismen wird Sauerstoff während der oxidativen Phosphorylierung durch Elektronentransferreaktionen über die Atmungskettenkomplexe zu H_2O reduziert. Durch Ein-Elektronen-Reduktion des molekularen Sauerstoffs unter Bildung von Ubisemichinon kann in der Atmungskette Superoxid entstehen. ROS können in freie Radikale, wie zum Beispiel das Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxylradikale ($HO\cdot$), Peroxylradikale ($ROO\cdot$), Alkoxylradikale ($RO\cdot$) und nicht-radikalische Verbindungen wie das Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Singulett-Sauerstoff (1O_2) und organische Peroxide ($ROOH$), eingeteilt werden [Brenneisen et al., 2002]. Freien Radikalen werden wichtige Funktionen in der zellulären Signaltransduktion, Induktion von Wachstum und Apoptose sowie als Effektormechanismen immunkompetenter Zellen [Fehrenbach et al., 2001; Salganik, 2001] zugeschrieben. Entscheidend ist, an welchem Ort und in welcher Dosis ROS auftreten. In angemessener Menge erfüllen sie

physiologische Aufgaben und können durch antioxidative Schutzsysteme der Zelle antagonisiert werden. Dieses Gleichgewicht zwischen Entstehung und Neutralisierung der Radikale kann aus dem Gleichgewicht geraten; dann überwiegen die schädigenden Effekte und es kommt zum „oxidativen Stress“ [Sies et al., 1985; Sies, 1986; 1997]. ROS spielen bei der Mutagenese und Karzinogenese eine bedeutende Rolle [Loeb et al., 2001; Jackson et al., 1998]. Angriffspunkte dieser potentiell toxischen, mutagenen und kanzerogenen Radikale sind alle biologischen Makromoleküle, neben Membranlipiden und Proteinen vor allem auch die DNA an verschiedenen Stellen.

Allerdings ist die Zelle den ROS nicht schutzlos ausgeliefert. Es wurden verschiedene Mechanismen identifiziert, die die Entstehung von ROS vermindern, sie enzymatisch oder nicht-enzymatisch „entgiften“, aber auch entstandene Schäden an der DNA reparieren können [Arteel et al., 2001]. Nicht-enzymatisch wirken z.B. Ascorbinsäure (Vitamin C), α -Tocopherol (Vitamin E) und verschiedene Carotinoide. Zu den antioxidativ wirkenden Enzymen zählen die Superoxid-Dismutase (SOD) ($2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$), die Katalase ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) und die Glutathion-Peroxidase, die H_2O_2 in H_2O reduziert. Oxidativer Stress wird mit humanen Erkrankungen, wie kardiovaskulären und neurodegenerativen Krankheiten, aber auch mit Krebs in Verbindung gebracht [Sies, 1991].

Durch ROS induzierte Ereignisse in der Zelle können mit Hilfe von Antioxidantien verringert oder sogar verhindert werden. Selenverbindungen werden schützende Eigenschaften zugeschrieben, vor allem durch Vermittlung der Glutathion-Peroxidase, welche Selen enthält [Schrauzer, 2000]. Die Glutathion-Peroxidase schützt die DNA und andere zelluläre Komponenten vor Schädigungen durch Oxidantien. Auch die Thioredoxin-Reduktase und andere Selenoproteine, die über Selen in Form von Selenocystein verfügen, sind von großer Bedeutung im Zusammenhang mit der antioxidativen Funktion von Selen. In frühen unabhängigen Studien konnte gezeigt werden, dass in Regionen der

Vereinigten Staaten mit hohem Verbrauch an Selen die Todesraten durch Krebserkrankungen niedriger sind als in Regionen mit niedrigerem Selenverbrauch [Schamberger et al., 1969; Schrauzer et al., 1971]. Dies wurde durch eine kürzlich publizierte Meta-Analyse von insgesamt 68 Humanstudien mit fünf einzeln bzw. in Kombination verabreichten Antioxidantien (Beta-Carotin, Selen, Vitamin A, Vitamin C und Vitamin E) bestätigt. Lediglich Vitamin C und Selen führten zur erwünschten positiven Wirkung auf die menschliche Gesundheit [Bjelakovic et al., 2007].

1.5 Bedeutung von Selen für das Gehirn

Das menschliche Gehirn ist die Steuerzentrale des gesamten Körpers. Im Vergleich zu anderen Organen kommt das Gehirn mit nur zwei verschiedenen Zelltypen aus; die Nervenzellen oder Neuronen, die eine elektrische Erregung erzeugen und weiterleiten können, und die Gliazellen, die für die Ernährung der Nervenzelle sorgen, das Gehirn durch Ausbildung der sogenannten Blut-Hirn-Schranke abschotten und eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr spielen. Hier soll ein Überblick über die Funktionen der in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen gegeben werden.

Die Hauptaufgabe von Neuronen ist die Aufnahme und Weiterleitung von elektrischen Erregungen. Sie werden bei der Ausführung ihrer Funktion in mehreren Gesichtspunkten von Gliazellen unterstützt [Pfrieger et al., 1996; Tsacopoulos et al., 1996; Deitmer, 2000]. Das humane Gehirn enthält im Durchschnitt etwa 100 Milliarden Nervenzellen. Jedes Neuron steht seinerseits über Synapsen mit mehreren tausend anderen Nervenzellen in Verbindung. So entsteht ein Geflecht von ungeheurer Komplexität. Jede Nervenzelle besitzt außerdem vielfach verzweigte Nervenzellfortsätze (Dendriten), die darauf spezialisiert sind, an den Kontaktstellen zu anderen Neuronen Botenstoffe (Neurotransmitter) zu binden. Neben den chemischen Synapsen können Neuronen auch durch

elektrische Synapsen (Gap Junctions) über Ionen Signale übertragen [Siegal et al., 1999].

Zwischen Nervenzellen und der weichen Hirnhaut bzw. der Außenwand von Blutgefäßen spannen sich große, sternförmige Gliazellen, vorwiegend Astrozyten auf [Kettenmann, 1999]. Sie sind ganz entscheidend dafür verantwortlich, ein Milieu aufrecht zu erhalten, indem Nervenzellen gut funktionieren können, sie erhöhen die Anzahl an Synapsen und fördern deren Stabilität [Ullian, 2001]. Im Bereich von Blutgefäßen bilden Astrozytenfortsätze starke Kontakte aus, die bestimmten Stoffen den Übertritt aus dem Blut unmöglich machen, sie induzieren und erhalten die Funktion der Blut-Hirn-Schranke.

Sie setzen die aus dem Blut aufgenommene Glukose bis zum Laktat um und geben es dann wieder ab, so dass es von den benachbarten Nervenzellen aufgenommen werden kann [Tsacopoulos et al., 1996; Deitmer, 2000]. Neben der Regulation der Immunantwort im zentralen Nervensystem, wirken Astrozyten vorwiegend anti-inflammatorisch und sezernieren zudem verschiedene Zytokine und Chemokine [Dong et al., 2001; Merrill et al., 1996; Gimsa et al., 2004].

Das Gehirn wird bevorzugt mit Selen versorgt und kann im Unterschied zu den meisten anderen Organen selbst während längerer Perioden von Selen-Mangelernährung hohe Selenkonzentrationen aufrechterhalten [Behne et al., 1988]. Unter normalen physiologischen Bedingungen liefert SeP den größten Teil des benötigten Selens an das Gehirn [Schomburg et al., 2003]. Bei SeP- Knockout-Mäusen führt eine Unterversorgung des Gehirns mit Selen zu neurologischen Schäden, die sich in Bewegungsstörungen und epileptischen Anfällen manifestieren [Hill et al., 2004]. Allerdings kann bei den SeP- Knockout-Mäusen die normale Funktion des Gehirns durch Supplementierung mit niedermolekularen Selenverbindungen bewahrt werden [Hill et al., 2003; Schweizer et al., 2005]. Für neuronale, *in vitro* kultivierte Zellen stellt exogen zugesetztes SeP einen lebensnotwendigen Faktor dar, der von den Zellen besser verwendet werden kann als anorganisches Selenit [Yan et al., 1998].

Auch im Gehirn wurde eine endogene Expression von SeP mRNA nachgewiesen [Dreher et al., 1997]. Primäre, aus Rattenhirnen isolierte Astrozyten produzieren und sezernieren SeP [Yang et al., 2000]. In Purkinje-Zellen des menschlichen Kleinhirns wurde ebenfalls SeP detektiert [Schweizer et al., 2004]. Als eine mögliche physiologische Funktion dieses endogen im Gehirn produzierten SeP wird derzeit eine Rolle als lokales Speicher- und Recyclingprotein für Selen diskutiert [Schweizer et al., 2004; Richardson, 2005].

Trotz einer Vielzahl von Studien, die eine antioxidative Schutzfunktion von Selen in Hirnzellen belegen, existieren bisher aber nur wenige klinische Daten zu einer möglichen protektiven Rolle von Selen bei neurologischen Erkrankungen [Kawakubo et al., 1994]. Patienten, die über längere Zeit künstlich ernährt werden, können eine progressive Enzephalopathie entwickeln, die durch schwere Selen-Defizienz verursacht wird [Ramaekers et al., 1994].

Eine Form von epileptischen Anfällen bei Kindern, die mit niedrigen Selenwerten im Blutplasma assoziiert ist, wurde durch Supplementierung mit Selen behandelbar [Zafar et al., 2003].

In Tiermodellen des Morbus Parkinson wurden durch Zusatz von Selen zur Nahrung die dopaminergen Neuronen vor oxidativen Schäden geschützt und die Progression der Krankheit verlangsamt [Kim et al., 2000]. Ein besseres Verständnis des Selenmetabolismus im Gehirn könnte die Basis für einen preventiven und/oder therapeutischen Einsatz von Selen bei ROS-vermittelten neurologischen Erkrankungen, in deren Pathogenese oxidativer Stress involviert ist (z.B. Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer), bilden [Chen et al., 2003].

1.6 Fragestellung

Selen ist für den Menschen ein essentielles Spurenelement. Ein Großteil des in humanem Blutplasma zirkulierenden Selens liegt in Form des Plasmaproteins Selenoprotein P (SeP) vor. SeP wird hauptsächlich von der Leber als hochglykosyliertes Protein produziert und sezerniert. Außer in der Leber wird SeP mRNA auch in vielen anderen Organen exprimiert, wobei die Funktion in extrahepatischen Organen bisher ungeklärt ist. Neben seiner Rolle als Transportprotein für die Versorgung von peripheren Zielorganen mit Selen wird auch eine direkte Schutzfunktion von SeP gegen oxidativen Stress diskutiert. Da Zellen des zentralen Nervensystems potentielle Zielstrukturen von SeP darstellen, sollte in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung von SeP für den Schutz von Astrozyten und Neuronen gegen oxidativen Stress untersucht werden.

Daraus ergeben sich einzelne Unterpunkte:

I) Die konventionelle Methode der Aufreinigung von SeP aus Blutplasma ist sehr aufwendig. Daher sollte die Eignung der humanen Hepatoma-Zelllinie HepG2 als alternative Bezugsquelle für SeP getestet werden.

II) In Astrozytoma- und Neuroblastoma-Zellen sollte eine mögliche protektive Wirkung von exogen zugegebenem SeP nach der Induktion von oxidativem Stress untersucht und mit der Wirkung anderer Selenverbindungen verglichen werden. Unter Verwendung einer spezifischen SeP-siRNA-basierten Knockout-Strategie sollte eine mögliche antioxidative Funktion des endogenen SeP nachgewiesen werden.

III) Außerdem sollte die endogene Expression von SeP in humanen Hirnzellen (Astrozyten sowie Astrozytoma- und Neuroblastoma-Zelllinie) geprüft werden.

VI) In einem Ko-Kultursystem sollte untersucht werden, ob Astrozytoma-Zellen in der Lage sind, Neuroblastoma-Zellen vor oxidativem Stress zu schützen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Agarose	Invitrogen, Carlsbad
APS	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Albumin from bovine serum 98%	Sigma, Deisenhofen
tert.-Butylhydroperoxide	Sigma, Deisenhofen
Bromphenol Blau	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau R250	Merck, Darmstadt
DAPI	Molecular Probes, Karlsruhe
DMEM	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Roth, Karlsruhe
DNA-Molekulargewichtsmarker	Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland
dNTP-Mix	Qiagen, Hilden
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Deisenhofen
EDTA	ICN Biomedicals, Ohio USA
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Molecular Probes, Karlsruhe
FCS	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Fettfreies Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Fluoromount C	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Gentamycin solution	Sigma, Deisenhofen
Glutamax	Invitrogen, Carlsbad
Glutathion Reduktase	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Merck, Darmstadt

Glycin \geq 99,9% p.A.	Roth, Karlsruhe
Glutathion reduzierte Form (GSH)	Sigma, Deisenhofen
HCl	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
Kontroll siRNA BLOCK-iT	Invitrogen, Carlsbad
L-Glutamin f. biochemische Zwecke	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Mercaptosuccinat	Sigma, Deisenhofen
Methanol p.A.	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Invitrogen, Carlsbad
MTT 98% (TLC)	Sigma, Deisenhofen
NaCl pro analysi	Merck, Darmstadt
NADH	Boehringer, Mannheim
NADPH	Roche, Mannheim
Na ₂ HPO ₄ pro analysi	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
NaN ₃	Sigma, Deisenhofen
N,N-Dimethylformamide	Sigma, Deisenhofen
Natriumselenit	Merck, Darmstadt
PCR-Primer	Invitrogen, Carlsbad
pdT ₁₅ -Primer	Roche, Mannheim
OptiMEM Medium	Invitrogen, Carlsbad
Penicillin	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
Prestained Proteinmarker	Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland
Pyruvat	Boehringer, Mannheim
Reagenz A, B, S	BioRad, München
RPMI-1640	Sigma, Deisenhofen
Reverse Transkriptase	Invitrogen, Carlsbad
Rotiphorese Gel 40	Roth, Karlsruhe

SDS Ultra Pure $\geq 99\%$	Roth, Karlsruhe
Selenomethionin	Sigma, Deisenhofen
SeP siRNA	Qiagen, Hilden
Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Super Signal West Pico (Chemilumineszent Substrat)	Pierce, Rockford
Taq Polymerase	Qiagen, Hilden
Temed p.A. 99%	Roth, Karlsruhe
tert-Buthylhydroperoxid	Sigma, Deisenhofen
Tris Pufferan [®] $\geq 99,9\%$	Roth, Karlsruhe
Triton X-100 (für Immunhistochemie)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100 (für Gpx-Assay-Puffer)	Roth, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
X-tremeGENE siRNA (Transfektionsreagenz)	Roche, Mannheim
Ziegennormalserum	Sigma, Deisenhofen
Zitronensäure	Sigma, Deisenhofen

2.1.2 Puffer und Lösungen

Anodenpuffer I	0,3 M Tris	
	10% (v/v) MeOH	pH 10,4
Anodenpuffer II	25 mM Tris	
	10% (v/v) MeOH	pH 10,4
Blockierlösung (1x)	3% Ziegennormalserum in TBST	
Carnoy´s Fixativ	Methanol/Eisessig, 3:1	

DAPI-Färbelösung	0,05 µg/ml, Verdünnung: 1/500 in McIlvaine-Puffer
Einfriermedium	DMEM-Medium mit 20% FCS und 10% DMSO
GPx-Assay Puffer	100mM Tris (ph=7.6) 5mM EDTA 1mM NaN ₃ 0.1% (v/v) Triton X-100
Kathodenpuffer	25 mM Tris 10% (v/v) MeOH 40 mM Glycin pH 9,4
LDH-Assay Puffer	4.92g Tris 5.95g in 500ml dest. Wasser ph=7.2
McIlvaine-Puffer	50 mM Zitronensäure 100 mM Na ₂ HPO ₄
MTT-Lösung	5 g MTT/ml PBS
PBS	2,6 mM KCl 1,4 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 6,4 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4
Ponceau S-Lösung	0,1% PonceauS (w/v) 5% (v/v) Essigsäure

Trenngel für SDS-Page	4,8 ml dH ₂ O	
5 ml für kleine Gele 8x9 cm:	2,5 ml Rotiphorese Gel 40	
	2,5 ml 1,5 M Tris, pH 8,8	
	100 µl SDS 10% (w/v)	
	100 µl APS 10% (w/v)	
	4 µl Temed	
Trypsin-EDTA: PBS (1:1)	0,5 g/L Trypsin	
	0,2 g/L Na-EDTA	
	PBS	
10x-Puffer für PCR	200 mM Tris-HCl	
	500 mM KCL	
	15 mM MgCl ₂	pH 8,3

2.1.3 Antikörper

Primäre Antikörper

SeP	Auftragssynthese Eurogentec, Belgien
α-Tubullin	Santa Cruz Biotechnolgy, Heidelberg
Cytochrom c	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
cGPx	Lab Frontier, Südkorea
PH-GPx	Lab Frontier, Südkorea
TR-1	Lab Frontier, Südkorea
PARP	Roche, Mannheim

Sekundäre Antikörper

Alexa-488-gekoppeltes α-Maus IgG	Molecular Probes, Karlsruhe
Goat-α-mouse-HRP-gekoppelt	DAKO, Schweden
Goat-α-rabbit-HRP-gekoppelt	Dianova, Hamburg

2.1.4 Assays/Kits

Caspase Glow 3/7 assay	Promega, Madison
ProteoExtract Subcellular	Merck Biosciences, Bad Soden
Proteome Extraction Kit	
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.1.5 Primer für die PCR

SeP-sense	5'-CTTGGTTTGCCTTTTTTCCTTCCTA-3'
SeP-antisense	5'-TTGCTGGCATATCTCGGTTCTCT-3'
cGPx-sense	5'-GACCGACCCCAAGCTCATCACC-3'
cGPx-antisense	5'-ATCAACAGGACCAGCACCCATCTC-3'
PH-GPx-sense	5'-TGTGCGCGCTCCATGCACGAGT-3'
PH-GPx-antisense	5'-AAATAGTGGGGCAGGTCCTTCTCT-3'
TR1-sense	5'-CTAAAAATGAACGGCCCTGA-3'
TR1-antisense	5'-GGTCTTTCACCAGTGGCAAT-3'
HPRT-sense	5'-ATTCTTTGCTGACCTGCTGGATT-3'
HPRT-antisense	5'-CTTAGGCTTTGTATTTTGCTTTTC-3'

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Vivaspin 15R Concentrator	Vivascience, Hannover
Zellkultureinsätze	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkultur-Materialien	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Deckgläschen	Assistent
Kryotubes	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einmal-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrozellulose-Membran	Amersham Biosciences, Freiburg
Whatman-Filterpapiere	Roth, Karlsruhe
Bio-Max-Film	Kodak, Stuttgart
Filmkassette BAS Cassette 2040	FujiFilm Photo Film GmbH, Düsseldorf
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde

2.1.7 Geräte

Analysenwaage AB 204-S	Mettler Toledo, Schweiz
Elektro-Blot-Apparatur	Roth, Karlsruhe
CCD Kamera (ORCA II) Digital Kamera	Hamamatsu, Japan
Centrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Clean Air Sterilbank	Thermo Life Sciences, Egelsbach
Criterion Electrophorese-Kammer	Bio-Rad, München
Diana III Raytest-Kamera	Raytest, Straubenhardt
Fluoreszenz-/Lichtmikroskop Axiovert 100 TV	Carl Zeiss, Oberkochen
Heraeus Inkubator	Kendro, Langenselbold

Magnet-Rührer	Janke+Kunkel IKAMAG [®] RCT Staufen
Mikrowelle	Braun, Melsungen
Milli-Q Anlage	Millipore, Eschborn
Neubauer-Zählkammer	Brand, Göttingen
Photometer Ultrospec 1000	Pharmacia Biotech, Freiburg
Powersupplier Power Pac Basic [™]	Bio-Rad, München
Primus 96 plus PCR-Maschine	MWG AG Biotech, Schweden
RM-5-Assistant Rollschüttler	Braun, Melsungen
Schüttler Rotamax 120	Heidolph-Instruments, Schwabach
Ultrasonic Disintegrater No. 7100	M.S.E., Lorch
Victor 1420 Multilabel Counter	PerkinElmer Wallac, Freiburg
Vortexer	Janke+Kunkel Labortechnik, Staufen
Wasserbad	Köttermann, Düsseldorf

2.1.8 Software

AIDA Image Analyzer v.3.1

Prism 3.0

Diana III Camera Control

Aqua Cosmos

2.1.9 Verwendete Zelllinien

HepG2

HepG2-Zellen sind humane Hepatomzellen aus einem gut differenzierten hepatozellulären Karzinom eines 15-jährigen weißen Jungen. Für die Experimente wurden die Zellen zwischen den Passagen 12 bis 40 verwendet. Die Zellen stammen aus der European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK (ECACC No.: 85011430) und wurden uns freundlicherweise von Dr. J. Bode (Heinrich-Heine Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

MOG-G-CCM

MOG-G-CCM-Zellen sind humane Astrozytomzellen aus einem anaplastischen Astrozytom eines Erwachsenen. Für die Experimente wurden die Zellen zwischen den Passagen 3 bis 30 verwendet. Die Zellen stammen aus der European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK (ECACC No.: 86022702).

SH-SY5Y

SH-SY5Y-Zellen sind humane Neuroblastomzellen. Aus einer Knochenmarksbiopsie der Zelllinie SK-N-SH (ECACC No.: 86012802) konnten durch dreimaliges Klonen SH-SY5Y-Zellen hergestellt werden. Für die Experimente wurden die Zellen zwischen den Passagen 17 bis 35 verwendet. Die Zellen stammen aus der European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK (ECACC No.: 94030304).

Primäre Astrozyten

Normale humane Astrozyten (NHA)-Zellen wurden für die Experimente bis zur Passage 3 verwendet. Die Zellen stammen von Cambrex, Walkersville (Part Code: CC-2565).

2.2 Methoden

2.2.1 Stammhaltung und Kultivierung der Zellen

HepG2-Zellen wurden in RPMI-Medium, das mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamax und Penicillin/Streptomycin (Komplettmedium) supplementiert wurde, in einer wasserdampfgesättigten, auf 37°C temperierte Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid kultiviert. Bei Abwesenheit von FCS wurde dieses Komplettmedium als serumfreies Medium bezeichnet.

Die MOG-G-CCM-Zellen wurden unter gleichen Bedingungen in DMEM: Ham's F10 (1:1) mit 10% FCS, und Penicillin/Streptomycin (Komplettmedium) kultiviert. Auch die SH-SY5Y-Zellen wurden unter gleichen Bedingungen allerdings mit Ham's F12 kultiviert.

Die primären Astrozyten wurden in Astrocyte Basal Medium (ABM) unter Zusatz von 0,1% rhEGF, 0,25% Insulin, 0,1% Ascorbinsäure, 0,1% GA-1000, 2 mM L-Glutamax und 3% FCS kultiviert.

Nach Erreichen einer 70-80%-igen Konfluenz wurden alle Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin-EDTA:PBS Lösung (1:1) von den Kulturflaschen abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde nach 10 bis 15 Minuten durch Zugabe von FCS-haltigem Medium abgestoppt, die Zellen resuspendiert, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und auf die entsprechende Anzahl Kulturflaschen oder -schalen überführt.

Zur Kontrolle des Zellwachstums wurde die kummulative Populationsdichte bestimmt. Diese errechnet sich wie folgt:

$$PD = \frac{\ln(\text{Zellzahl der geernteten Zellen}) - \ln(\text{eingesäte Zellzahl})}{\ln 2}$$

$$\rightarrow CPD = \Sigma PD$$

2.2.2 Mykoplasmentest

In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen auf Kontaminationen mit Mykoplasmen untersucht. Bei Mykoplasmen handelt es sich um kleine, zellwandlose, von einer Zytoplasmamembran umgebene Bakterien, welche parasitär Zellen befallen. Mykoplasmen können das geregelte Zellwachstum beeinflussen bzw. die Reaktionen von Zellen auf bestimmte Stimuli verändern. Da sie lichtmikroskopisch nicht zu sehen sind, bleiben sie ohne eine geeignete Detektionsmethode unerkannt. Die Zellkultur wurde mit Hilfe des fluoreszierenden Farbstoffes Bisbenzimid kontrolliert. Zellen wurden mit einer Dichte von etwa 1000 Zellen/cm² auf einem Deckgläschen kultiviert. Nach 2 Tagen Inkubation wurden die subkonfluenten Zellen auf dem Deckgläschen mit 2 ml PBS gewaschen und für 10 Minuten in 1 ml Carnoy's Fixativ fixiert. Danach erfolgte zweimaliges Waschen der Zellen mit McIlvaine-Puffer und eine 15-minütige Inkubation in 1 ml DAPI-Lösung. Nach zweimaligem Waschen mit dest. Wasser konnte das Deckgläschen mit den Zellen auf einen Objektträger mit 20 µl Einbettmedium (Fluoromount C) fixiert werden. Innerhalb der nächsten 20 Minuten wurden die gefärbten Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm auf Mykoplasmen kontrolliert. Durch den Farbstoff Bisbenzimid (DAPI) wird selektiv DNA angefärbt. Nicht kontaminierte Kulturen zeigen eine hellblaue Fluoreszenz, welche ausschließlich auf den Zellkern beschränkt ist. Zellkulturen mit Mykoplasmen zeigen neben dem fluoreszierenden Zellkern eine deutliche Fluoreszenz im Bereich der äußeren Zellmembran und zwischen den Zellen. Die Mykoplasmen erscheinen entweder als gleichmäßig über die Zytoplasmamembran verteilte Partikel oder sie bilden Aggregate auf der Zelloberfläche und/oder zwischen den Zellen. Kontaminierte Zellen wurden autoklaviert und entsorgt.

2.2.3 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen

Alle Zellen wurden zuerst mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin-EDTA:PBS (1:1) Lösung abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde nach 10 bis 15 Minuten durch Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt. Danach wurde die Zellsuspension zentrifugiert und das Zellpellet in Einfriermedium (DMEM-Medium mit 20% FCS und 10% DMSO) aufgenommen. Die Zellen wurden mit einer Dichte von ca. 10^6 Zellen/ml in speziellen Kryotubes bei -80°C eingefroren.

Eingefrorene Zellen wurden schnell aufgetaut und in eine 75 cm^2 Kulturflasche mit Kompletmedium überführt. Um den DMSO-Gehalt des Mediums auf unter 1% zu reduzieren und dadurch einer Membranschädigung vorzubeugen, wurde nach 24 Stunden ein Mediumwechsel vorgenommen.

2.2.4 Allgemeine Versuchsbedingungen

Verwendete Lösungen wurden mit Reinstwasser aus einer Milli-Q Anlage (Millipore, Eschborn) hergestellt. Alle im Ergebnisteil gezeigten Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Signifikanzen wurden nach Student's T-Test ermittelt. Alle verwendeten Substanzen wurden vor Verwendung mittels MTT-Test auf Toxizität überprüft. Die Zellen wurden ausschließlich mit Konzentrationen behandelt, die nach 48 Stunden Inkubation eine Überlebensrate von $>80\%$ erzielten. Bis zum Zeitpunkt des Experiments befanden sich alle Zellen in Vollmedium. Alle Experimente wurden in serumfreien Medium durchgeführt.

2.2.5 Vitalitätsbestimmung (MTT-Test)

Der nachfolgend beschriebene MTT-Test dient dazu, die Vitalität von Zellen in der Zellkultur insbesondere nach der Applikation bestimmter Stressfaktoren wie Inkubation mit chemischen Agenzien zu bestimmen. Bei diesem Test wird das wasserlösliche Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) von lebenden, metabolisch aktiven Zellen durch eine mitochondriale Dehydrogenase in ein blaues, unlösliches Formazansalz umgewandelt. Die Absorption des Formazansalz wird als Maß für die Vitalität der Zellen angesehen und kann photometrisch bestimmt werden [Green et al., 1984].

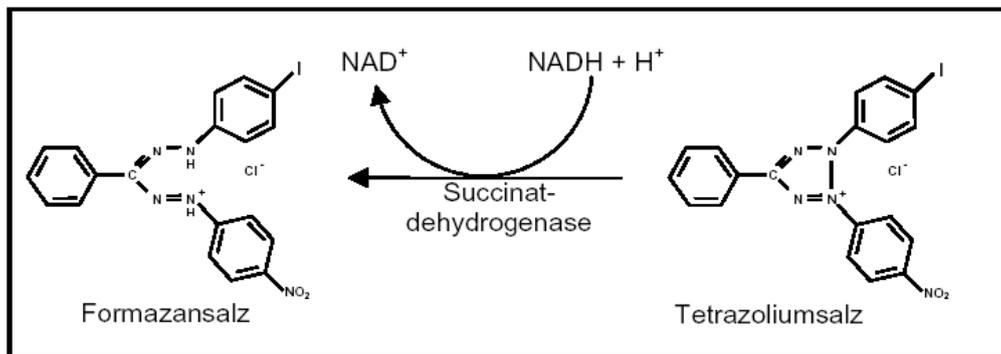


Abbildung 4: Bildung von Formazansalz aus Tetrazoliumsalz durch die Succinat-Dehydrogenase als Parameter für die Vitalität von Zellen

Zur Aufnahme des Tetrazoliumsalzes wurden die Zellen mit einer 10%-igen MTT-Lösung in DMEM für 1 bis 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Aufnahme wird das Tetrazoliumsalz von einer mitochondrialen Succinatdehydrogenase chemisch modifiziert. Es werden Wasserstoffionen von dem Enzym auf das Tetrazoliumsalz übertragen, wodurch der Tetrazoliumring gespalten wird und ein blaues, unlösliches Formazansalz entsteht (s. Abb. 4). Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen mit DMSO solubilisiert. Das in DMSO gelöste Formazan wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm mit einer Referenzwellenlänge von 690 nm quantifiziert. Der Nullabgleich erfolgte dabei durch Messung von reinem DMSO.

Die Vitalität der Zellen bzw. die Zytotoxizität einer Behandlung wurde als Prozent der Formazan-Bildung der behandelten Zellen, verglichen mit der Formazan-Bildung unbehandelter Zellen bestimmt:

$$\% \text{ Vitalität} = \frac{\text{OD (behandelte Zellen)}}{\text{OD (Kontroll - Zellen)}} \cdot 100$$

$$\% \text{ Zytotoxizität} = \left[1 - \frac{\text{OD (behandelte Zellen)}}{\text{OD (Kontroll - Zellen)}} \right] \cdot 100$$

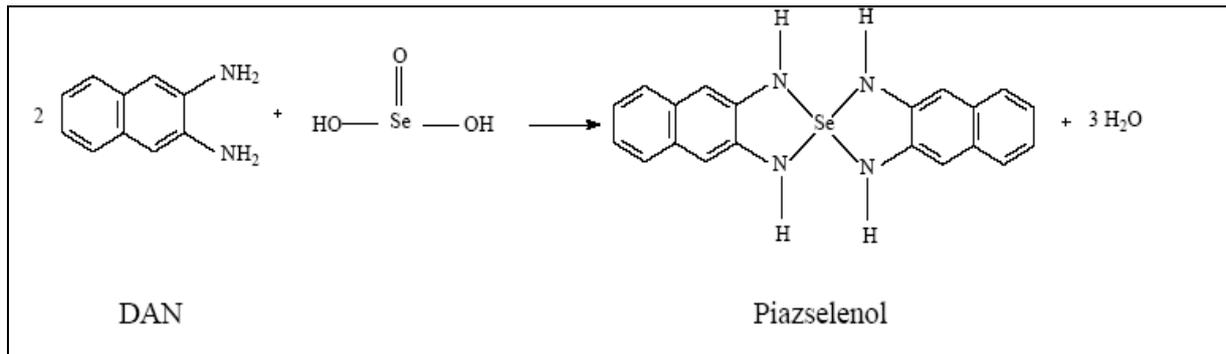
Abbildung 5: Berechnung der Vitalität von behandelten Zellen, um die Zytotoxizität von Agenzien zu testen

2.2.6 Anreicherung von Selenoprotein P aus HepG2-Zellkulturüberständen

HepG2-Zellen wurden bis zur Konfluenz in serumhaltigem Medium in 750 ml Zellkulturflaschen kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde das serumhaltige Medium gegen 20 ml serumfreies Medium ausgetauscht. Nach 24 Stunden wurde das Medium entfernt und durch 20 ml serumfreies Medium supplementiert mit 100 nM Natriumselenit (Na_2SeO_3) ersetzt. 48 Stunden später wurde der Zellkulturüberstand, der sezerniertes Selenoprotein P enthielt, abgenommen und bei 1000xg für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde schließlich durch Ultrazentrifugation mit Hilfe von Vivaspin 15R Concentrator Säulen 40-fach konzentriert. Die Membran dieser Säulen besitzt eine Ausschlußgröße von 30 kDa, d.h. kleinere Moleküle wie z.B. nicht verbrauchtes Selenit werden entfernt.

2.2.7 Fluorometrische Bestimmung der Selenkonzentration

Die Se-Bestimmung wurde leicht modifiziert nach Sheehan durchgeführt [Sheehan et al., 1990]. Dabei wird die Fluoreszenz der organischen Verbindung Piazselenol gemessen, die aus Se IV und 2,3-Di-Amino-Naphthalin (DAN) gebildet wird.



Bei diesem Assay wurden 100 µl Zellkulturüberstand, Medium bzw. Blutprobe als Dreifachbestimmung mit 500 µl Säuremix (1:4 HNO₃ (65%) / HClO₄ (70%)) zur Freisetzung des Se bei 190° C für mind. 2 h inkubiert. Dabei wird Se zu Se (VI) oxidiert und die Proben erscheinen farblos. Nach Abkühlung auf RT, wurden jeweils 500 µl HCl (37%) zu den Ansätzen gegeben (Reduktion des Se (VI) zu Se (IV)), gemischt und die Röhrchen ca. 30 min bei 150° C offen inkubiert, bis die Entweichung bräunlicher nitroser Gase nicht mehr wahrnehmbar war. Anschließend erfolgte bei RT die Zugabe von 2 ml EDTA Lösung (2,5 mM; pH 8,0) und 600 µl DAN Reagenz (6,3 mM in 0,1 M HCl). Die Ansätze wurden 30 min bei 55° C inkubiert und das Piazselenol mit 1 ml Cyclohexan bei RT extrahiert. Nach einer Phasentrennung ü.N. wurde die Fluoreszenz der organischen Phase im Fluorimeter (LS50B, PerkinElmer; λ_{Anregung}: 364nm; λ_{Emission}: 520 nm) in Glas-Mikro-Fluoro-Küvetten bestimmt. Zur Erstellung der Standardkurve dienten Natriumselenit-Verdünnungen in Wasser (0, 5, 10, 25, 50 and 100 µg Se/Liter).

2.2.8 Subzelluläre Fraktionierung der Proteine

Um die Expression von Selenoprotein P näher zu charakterisieren, wurde eine sequentielle Fraktionierung der MOG-G-CCM Zellen durchgeführt. Hierfür wurde das ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit von Merck Biosciences verwendet. Es kamen vier verschiedene Extraktionspuffer zum Einsatz, wodurch eine Fraktionierung der Zellen in eine zytosolische Fraktion, Zell- und Organellenmembran Fraktion, Zellkern Fraktion und Zytoskelett Fraktion erfolgte.

Die Zellen für diesen Versuch wurden in 10cm Petrischalen kultiviert. Das Kulturmedium wurde vorsichtig entfernt und die Zellen wurden zweimal mit 2ml eiskaltem Waschpuffer für 10 Minuten unter Schütteln bei 4°C gewaschen. Nach vorsichtigem Entfernen des Waschpuffers, wurde 1ml eiskalter Extraktionspuffer-1, versetzt mit 5µl Protease-Inhibitor-Cocktail, hinzugefügt und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und auf Eis gelegt. Mit diesem Schritt wurde die zytosolische Fraktion gewonnen.

Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit eiskaltem Extraktionspuffer-2, versetzt mit 5µl Protease-Inhibitor-Cocktail, für 40 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend der Überstand abgenommen, in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und auf Eis gelegt. Mit diesem Schritt wurde die Zellmembran- und Organellenmembran Fraktion gewonnen.

Für die Gewinnung der Zellkernprotein Fraktion wurden die Zellen nun mit 500µl eiskaltem Extraktionspuffer-3, versetzt mit 5µl Protease-Inhibitor-Cocktail und 1.5µl Benzonase (>375U), für 15 Minuten bei 4°C inkubiert, der Überstand abgenommen, in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und auf Eis gelegt.

Zum Schluss wurden 500µl Extraktionspuffer-4, versetzt mit Protease-Inhibitor-Cocktail, hinzugegeben bis sich die letzten Zellbestandteile ablösten. Mit diesem Schritt wurde die Zytoskelettale Fraktion gewonnen.

Nach der Proteinbestimmung der 4 Fraktionen wurden 20µg Protein von jeder Fraktion auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Selenoprotein P

Expression mit Hilfe des Western Blots untersucht. Als Kontrollmarker für die zellulären Fraktionen wurde die Expression von α -Tubullin und Cytochrom c mit dargestellt.

2.2.9 Deglykosylierung von Selenoprotein P

HepG2-Zellkulturüberstände und Lysate der Astrozytoma-Zelllinie MOG-G-CCM wurden vor dem enzymatischen Verdau mit 1% SDS und 1% Mercaptoethanol für drei Minuten bei 96 °C denaturiert. Anschließend wurden die vorbehandelten Proben im Reaktionspuffer mit rekombinanter N-Glykosidase F (30 U/ml, Endkonzentration) für drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Veränderung wurde durch den immunologischen Nachweis (Western Blot) überprüft.

2.2.10 Transfektion mit siRNA

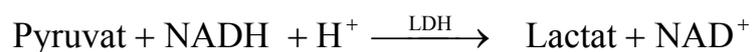
Die Astrozytoma-Zellen MOG-G-CCM wurden in \varnothing 3,5-cm Petrischalen bis zur 70%igen Konfluenz kultiviert und mit 2,5 μ l X-tremeGENE siRNA Transfektionsreagenz und 50 pmol spezifischer SeP siRNA (5'-GGAAUCUCUUCUCGAUUAA -3') oder unspezifischer Kontroll siRNA (BLOCK-iT; Invitrogen) in 1 ml OptiMEM Medium transfiziert. Nach 14 Stunden wurde das Medium abgesaugt und durch MOG-G-CCM Medium ersetzt. Weitere 10 Stunden später (24 Stunden nach der Transfektion), wurden die Zellen in 1%igen SDS lysiert. Durch den immunologischen Nachweis (Western Blot), wurde die Inhibition der SeP-Expression bestimmt. In einem parallelen Ansatz wurde die metabolische Aktivität der siRNA-transfesziierten Zellen mit Hilfe des MTT-assays bestimmt.

2.2.11 Enzymassays

2.2.11.1 LDH-Assay

Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein Enzym, welches die Oxidation von Laktat zu Pyruvat bei gleichzeitiger Reduktion von NAD^+ zu NADH katalysiert. LDH findet man in praktisch allen lebenden, intakten Zellen, gelöst im Zytoplasma. Kommt es zu einer Gewebsschädigung, wird es in den Zellkulturüberstand abgegeben. Für die Beurteilung der Unversehrtheit der Zellmembran wurde der LDH-Assay durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in einer 24-well-Platte kultiviert, mit Selen-Verbindungen vorinkubiert, danach mit tert-Buthylhydroperoxid behandelt und der Überstand für die Bestimmung der LDH-Aktivität verwendet. Zur Bestimmung der LDH-Aktivität wurden 200 μl des Reaktionsgemisches (2mM Pyruvat und 0.4mM NADH in LDH-Assaypuffer) mit 14 μl vom Überstand gut vermischt und bei folgender Reaktion (siehe Reaktionsgleichung) die NADH -Abnahme photometrisch gemessen [Racher, 1998].

Reaktionsgleichung:



Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz wird die Enzymaktivität [A] wie folgt berechnet:

$$A = \frac{\Delta E / \text{min} \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot v}$$

A : in mol/l · min

$\Delta E/\text{min}$: Extinktionsabnahme durch NADH -Verbrauch

ε : Extinktionskoeffizient von NADH bei 340nm in l/mol · cm

(hier: $\varepsilon = 6.2 \text{ l/mmol} \cdot \text{cm}$)

d : Schichtdicke der Küvette in cm

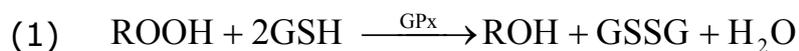
V : Gesamtvolumen des Testansatzes

v : Probevolumen im Testansatz

2.2.11.2 Glutathionperoxidase-Assay

Die GPx-Aktivität in den MOG-G-CCM Zellen wurde nach der von Brigelius-Flohé et al. [Brigelius-Flohé et al., 2002] beschriebenen Methode bestimmt. Dabei wird die NADPH-Abnahme bei der durch die Glutathion-Reduktase (GR) katalysierten Reaktion des oxidierten Glutathions (GSSG) zum reduzierten Glutathion (GSH) durch einen indirekten optischen Test gemessen (siehe Reaktionsgleichung).

Reaktionsgleichung:



Hierfür wurden Zellen in 10 cm Petrischalen kultiviert und mit verschiedenen Selen-Komponenten behandelt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, in 1ml PBS aufgenommen und für 5 Minuten bei 1000g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200µl GPx-Puffer lysiert. Nach 10 sekundiger Sonifizierung des Zelllysates, wurde nochmals für 5 Minuten bei 8000g zentrifugiert, um die letzten Zelltrümmerreste zu beseitigen.

Für die Messung wurden in eine Quarzküvette 750µl GPx-Puffer, 100µl 0.2mM NADPH, 100µl 3mM GSH und 50µl vom Zelllysate pipettiert und gut gemischt.

Um die Reaktion zu starten, wurde zuletzt 10µl tert-Butylhydroperoxid hinzugegeben, gut gemischt und anschließend die NADPH-Abnahme bei 340nm mit dem Lambda25 Spectrophotometer gemessen.

Für die Auswertung wurde ebenfalls das Lambert-Beer'sche Gesetz angewendet.

$$A = \frac{(\Delta E / \text{min} - 0,005) \cdot 1000 \mu\text{l}}{0,0062 \text{ ml/nmol} \cdot 50 \mu\text{l}} \quad \text{in nmol/ml} \cdot \text{min}$$

Um die spezifische GPx-Aktivität in mU/mg zu erhalten, wurde der laut Gleichung ermittelte Wert durch die Proteinkonzentration (mg/ml) der Proben dividiert.

2.2.11.3 Caspase 3/7 Aktivitätsassay

Caspasen sind Cystein-Aspartatsäure-Proteasen mit Cystein im aktiven Zentrum, die Proteine nach der Aminosäure Aspartat schneiden. Sie sind die wichtigsten Enzyme bei der Einleitung des programmierten Zelltodes. Für die Einleitung der Apoptose werden Initiator-Caspasen (z.B. Caspase-8 und 9) aktiviert, die wiederum Effektor-Caspasen (u.a. Caspase-3,-6,-7) aktivieren, wodurch es letztlich zur Apoptose kommt. Die Effektor-Caspasen aktivieren DNasen, unterdrücken die DNA-Reperatur und sind selber aktiv am Abbau des Zytoskeletts (Lamin- und Aktin- Abbau) beteiligt.

Mit dem Caspase Glo 3/7 Assay von Promega sollte die Aktivität der Caspase 3 und 7 in den MOG-G-CCM Zellen bestimmt werden, nachdem die Zellen mit tert-Butylhydroperoxid behandelt wurden.

Hierfür wurden die Zellen in einer undurchsichtigen weißen 96-well-Platte kultiviert (20000 Zellen pro well).

Dann wurden, nach Behandlung der Zellen mit tert-Butylhydroperoxid, 100µl Reagenzvolumen (bestehend aus Caspase-Glo 3/7 Puffer gemischt mit dem luminogenen Caspase-Glo 3/7 Substrat bei Raumtemperatur) zu 100µl Zellmedium pipettiert, gut gemischt und für 60 bis 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lumineszenz mit dem VICTOR 1420 Multilabel Counter gemessen.

Durch Zugabe des Reagenzgemisches, werden die Zellen lysiert und damit das Prolumineszent Caspase-3/7-Substrat von der Caspase der Zellen gespalten. Die gemessene Lumineszenz ist proportional zur Aktivität der Caspase 3 und 7.

2.2.12 Immunologischer Nachweis von Proteinen

2.2.12.1 Konzentrationsbestimmungen von Proteinen

Proteinbestimmungen erfolgten auf Basis der Methode nach Lowry unter Einsatz kommerziell erhältlicher Lösungen (BioRad, DC) gegen Standards aus Rinderserumalbumin (BSA) nach Angaben des Herstellers. 100 µl des Reagent A wurden mit 20 µl des Reagenz S gemischt und zu 20 µl einer Probe dazugegeben und für 1 Minute inkubiert. Zu dem Gemisch wurden anschließend 750 µl des Reagent B pipettiert und für weitere 5 Minuten inkubiert. Danach wurde die OD photometrisch bei 750 nm gemessen. Aus den Daten des BSA-Proteinstandards wurde eine Standardkurve erstellt und durch lineare Regression der Proteingehalt der Proben berechnet. In Diagramm 1 ist ein Beispiel für einen BSA-Standard dargestellt.

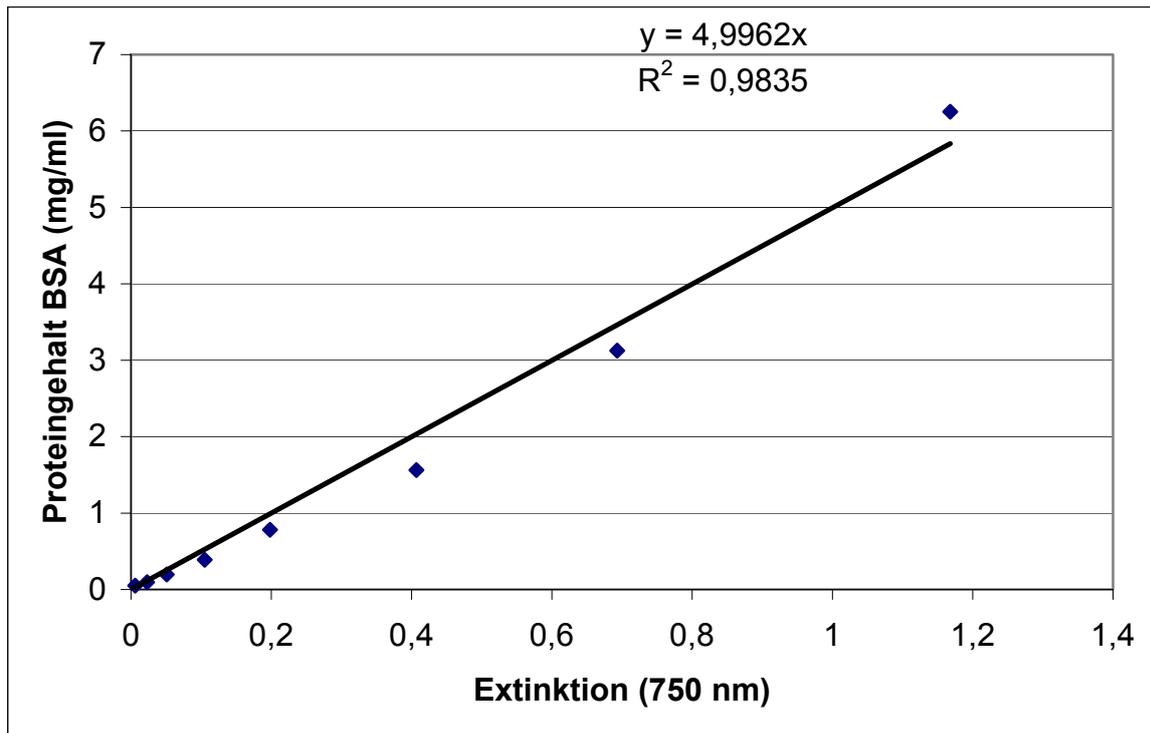


Diagramm 1: Graphische Darstellung eines BSA-Standards zur Berechnung des Proteingehaltes einer Probe

2.2.12.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In einem SDS-PAGE wandern Proteine in einem elektrischen Feld durch ein dreidimensionales Netzwerk aus Acrylamid und Bis-Acrylamid. Durch den Zusatz des amphiphilen Detergenz SDS, das sich stöchiometrisch an die Proteine anlagert, bilden sich Micellen mit konstant negativer Ladung pro Masseneinheit. Es erfolgt eine Auftrennung der Proteine aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts. Bei der Probenvorbereitung wurden die Proteine mit einem Überschuss an SDS auf 95° C erhitzt, um die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine zu zerstören. Zusätzlich wurden Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT) reduziert und damit aufgebrochen. Nach Auftrennung der Proteine ist das Gel für eine Fülle weiterer Bearbeitungen zugänglich: Färbung, immunologische Nachweise (Blotting) oder, bei radioaktiven

Proteinproben, der Autoradiographie. Man kann die Proteine auch im Gel verdauen und wieder herauseluieren.

Die chemische Kopolymerisierung der Acrylamidmonomere wurde durch Zugabe von APS und Temed gestartet, wobei Temed die Bildung freier Persulfatradikale katalysiert. Die Porengröße der Gelmatrix ist abhängig von der Konzentration der Acrylamidmoleküle. Es werden in der Regel Gele mit einer Acrylamid-Konzentration zwischen 6-15% verwendet. Über das Trenngel (pH 8,8) wird ein weitporiges Sammelgel mit pH 6,8 (Zusammensetzung der Gele in Material und Methoden: 2.1.2) gesetzt, um das zeitgleiche Einlaufen der Proteinsuspension in das Trenngel zu erreichen und somit eine präzisere Auftrennung der Proteinbanden zu erreichen. Die folgende Tabelle zeigt die Auftrennung der Proteine bei verschiedenen Acrylamid-Konzentrationen:

Tabelle 2: Auftrennung der Proteine bei verschiedenen Acrylamid-Konzentrationen:

Proteingröße [kDa]	Acrylamid-Konzentration [% (w/v)]
12-43	15
16-68	10
36-94	7,5
57-212	5

2.2.12.3 Immunologischer Nachweis (Western-Blot)

Der Western-Blot wurde für den Nachweis verschiedener Proteine z.B. Selenoprotein P, eingesetzt.

Bei dieser Methode werden Proteine aufgrund eines elektrischen Feldes aus einem SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und anschließend mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen.

In dieser Arbeit wurden ein diskontinuierliches Puffersystem für die Übertragung der Proteine auf die Membran (Blotten), und zum Nachweis

HRP-gekoppelte Sekundärantikörper sowie ein Chemilumineszenzsystem verwendet.

Zu Beginn wurden pro Gel vier Whatman Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembran in Größe des Trenngels zurechtgeschnitten. Je ein Blatt Filterpapier wurde in Anodenpuffer I und Anodenpuffer II, zwei Blatt Filterpapier in Kathodenpuffer getränkt. Die Blotmembran wurde zur Aktivierung in Anodenpuffer II gelegt. Die Graphitelektroden der Blotkammer wurden befeuchtet. Auf die Anode wurde ein Blatt Filterpapier getränkt in Anodenpuffer I, ein Blatt Filterpapier getränkt in Anodenpuffer II, die Nitrozellulose-Membran, das Trenngel und zwei Blatt Filterpapier getränkt in Kathodenpuffer platziert. Nach Auflegen der Kathode wurde für eine Stunde ein Strom von 65 mA angelegt.

Die Nitrozellulosemembran wurde nach dem Blotten in PonceauS-Lösung gefärbt, um sicherzustellen, dass die Proteinbanden vollständig übertragen wurden. Die PonceauS-Färbung wurde mit PBS wieder entfernt und anschließend wurde die Membran über Nacht zur Absättigung (Blockierung unspezifischer Bindungsstellen) in 5% (w/v) fettfreiem Milchpulver / TBST geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Membran 2 Stunden mit dem Primärantikörper (Verdünnung: 1/1000 (v/v) in TBST mit 1% (w/v) fettfreiem Milchpulver) inkubiert und anschließend viermal für je 15 Minuten mit TBST gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung: 1/20.000 (v/v) in TBST) und erneutes Waschen für 1 Stunde. Zum Nachweis der Bindung wurden die beiden Nachweisreagenzien (Luminol-Lösung, Verstärker-Lösung; Pierce Biotechnology, Rockford IL) im Verhältnis 1:1 vermischt und auf die Membran gegeben. Die Membran wurde in Folie eingeschweißt und mit einem Bio-Max-Film in einer Filmkassette platziert. Der Film wurde etwa zwei Minuten exponiert und anschließend in der Dunkelkammer entwickelt und fixiert. Densitometrische Analysen der Western Blots wurden mit Hilfe einer Scion Image Software durchgeführt.

2.2.12.4 Immunzytochemie

Mit Hilfe dieser Methode konnte Selenoprotein P durch fluoreszierende sekundäre Antikörper in fixierten Zellen nachgewiesen werden.

Auf Glasplättchen kultivierte Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und für 5 Minuten mit kaltem Methanol (-20°C) fixiert. Anschließend wurde das Methanol entfernt und die Zellen weitere zwei Mal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit einer Blockierlösung für 60 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper (Verdünnung: 1:1000 (v/v) in TBST mit 1% Ziegennormalserum) über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach viermaligem Waschen für je 15 Minuten mit TBST wurden die fixierten Zellen mit Alexa 488-gekoppelten IgG-Sekundärantikörpern aus der Maus (Verdünnung: 1:1000 (v/v) in TBST) für 2 Stunden bei RT inkubiert. Danach wurde erneut viermal je 15 Minuten mit TBST gewaschen. Anschließend wurden die Zellen einer DAPI-Färbung unterzogen. Dafür wurden die Zellen für 10 Minuten in DAPI-Färbelösung (Verdünnung: 1/500 in McIlvaine-Puffer) inkubiert und anschließend für weitere 30 Minuten mit TBST gewaschen. Im letzten Schritt wurden die Glasplättchen mit einem Tropfen Fluoromount C auf einem Objektträger fixiert und mit einem Zeiss Axiovert Fluoreszenzmikroskop, das mit einer CCD Kamera (ORCA II) verbunden war, ausgewertet.

2.2.13 RT-PCR

2.2.13.1 Isolierung und reverse Transkription der mRNA

Die Isolierung der Total-RNA aus den Zellen wurde unter Verwendung des RNeasy Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden nach Waschen mit PBS in 350 µl Buffer RLT (Lysepuffer) lysiert und in eine QIASHredder-Säule überführt. Das Lysat wurde 3 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.

Anschließend wurden 350 µl Ethanol (70%) zu dem Lysat pipettiert und dann auf eine RNeasy Mini-Säule überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 10.000 rpm für 15 Sekunden. Zu dem Überstand wurden 700 µl Buffer RW1 (Waschpuffer) zugefügt und erneut für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde ein zweites Mal mit 500 µl Buffer RPE durchgeführt. Die Total-RNA wurde im letzten Schritt mit 30 µl RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert und konnte anschließend für die Revertasereaktion eingesetzt werden.

Für die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die optische Dichte (OD) mit einem Spektrophotometer gemessen. Die RNA wurde 1:50 in TE-Puffer verdünnt und die OD bei 260nm und 280nm nach Kalibrierung des Photometers mit TE-Puffer gemessen.

Das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ ermöglicht eine Beurteilung der Reinheit der isolierten RNA. Die RNA-Konzentration wurdenach folgender Formel berechnet:

$$\text{RNA-Konzentration}(\text{ng}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{260\text{nm}} \times 40 \times \text{Verdünnung}$$

Die Revertasereaktion (Umschreibung der RNA in cDNA) erfolgte unter Einsatz von 1 µg Total-RNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl. Die Umschreibung erfolgte in 60 Minuten bei 42°C.

Das Reaktionsgemisch enthielt neben der RNA:

- 100 Einheiten (Units) SuperscriptII Rnase H-Reverse Transcriptase in 50 mM Tris/HCl (pH 8,3)
- 75 mM KCl,
- 10 mM Dithiothreitol (DTT)
- 3 mM MgCl₂
- 1 mM dNTP
- oligo(dT)-Primer (0.5 mg/20 ml)

2.2.13.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

100ng cDNA (2 µl) wurden für die PCR-Reaktion eingesetzt. Der PCR-Ansatz enthielt:

- 10x-Puffer
- 5 mM dNTP (dNTP-Mix)
- 5 mM Sense-Primer
- 5 mM Anisense-Primer
- 500 U/ml Taq Polymerase

Das Reaktionsvolumen betrug 20µl.

Die folgende Tabelle stellt das verwendete Pipettierschema dar:

Tabelle 3: Pipettierschema für den PCR-Ansatz. Das Endvolumen beträgt 20 µl.

Lösungen	Volumen (µl)
10x-PCR-Puffer	2
dNTP-Mix	0,4
α-SMA sense-Primer	0,2
α-SMA antisense-Primer	0,2
Template	2
Taq-Polymerase	0,1
H ₂ O	15,1
Gesamtvolumen	20

Im Vorfeld wurde die PCR für alle untersuchten Gene optimiert, um die optimale Zyklenzahl sowie die optimale Primer-Annealingtemperatur für die PCR zu ermitteln.

Die PCR für SeP wurde nach folgendem Modus durchgeführt:

95°C → 3 Minuten
 94°C → 20 Sekunden
 58°C → 30 Sekunden
 72°C → 35 Sekunden
 72°C → 5 Minuten

} 31 Zyklen

Die PCR für HPRT wurde nach folgendem Modus durchgeführt:

95°C → 3 Minuten
 94°C → 30 Sekunden
 55°C → 30 Sekunden
 72°C → 1 Minute
 72°C → 5 Minuten

} 31 Zyklen

Für die anderen getesteten Gene wurden die Primer Annealing Temperaturen und die Zyklenzahlen verändert (s.Tab.4)

Tabelle 4: Annealing-Temperaturen und Zyklenzahlen der Astrozytoma-Zelllinie stellvertretend für verschiedene Selenenzyme

	Annealing-Temperatur	Zyklenzahl
cGPx	60°C	21
PH-GPx	68°C	24
TR1	57°C	23

cGPx: cytosolische Glutathionperoxidase, TR1: Thioredoxinreduktase, PH-GPx: Phospholipidhydroperoxid- Glutathionperoxidase

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe eines 1%-igen Agarosegels. Die Banden der PCR-Produkte konnten mit Ethidiumbromid (0,3 µg/ml Endkonzentration) sichtbar gemacht werden.

2.2.13.3 Agarose-Gelelektrophorese

Durch die Agarose-Gelelektrophorese ist es möglich, DNA der Größe nach aufzutrennen und anschließend zu visualisieren. Agarose bildet nach dem Erhitzen ein dreidimensionales Polymer aus Polysacchariden. Durch Anlegen einer Spannung wandert die negativ geladene DNA zur Anode und wird durch die Agarose-Gelmatrix der Größe nach aufgetrennt. Die Porengröße der Gelmatrix wird durch die Agarosekonzentration bestimmt. Die Agarosekonzentration muss an die Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente angepasst sein.

Die folgende Tabelle zeigt die Auftrennung der DNA-Fragmente bei verschiedenen Agarose-Konzentrationen:

Tabelle 5: Auftrennung der DNA-Fragmente bei verschiedenen Agarose-Konzentrationen:

Agarosekonzentration [% (w/v)]	Optimaler Trennbereich [kb]
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Durch Zugabe des Interkalators Ethidiumbromid in die Gelmatrix konnte die DNA nach erfolgter Elektrophorese unter ultraviolettem Licht betrachtet werden.

Die benötigte Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer gelöst und in einer Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlen auf unter 60°C wurde das Ethidiumbromid hinzugefügt (0,3 µg/ml Endkonzentration). Die noch flüssige Lösung wurde in ihr Bett gegossen und der Kamm aufgesetzt.

Nach dem Erstarren, wurde das Gel in die Elektrophoresekammer überführt. Nach Auftragen der Proben, wurde eine Spannung von 80V für 30 Minuten angelegt. Die Gele wurden mittels der Diana III Raytest-Kamera unter UV-Licht betrachtet. Auswertung und Quantifizierung der DNA-Banden erfolgte durch die Diana III Camera Control-Software.

2.2.14 Statistik

Für die statistische Analyse der Signifikanz wurden parametrische Tests wie der Student's t-Test und der ANOVA Dunnett's Test durchgeführt. Vor der Studie wurden $P < 0.05$, $P < 0.01$ und $P < 0.001$ als Maß für die Signifikanz festgelegt. $P > 0.05$ deutete auf keine Signifikanz hin.

3 Ergebnisse

3.1 Die humane Hepatoma-Zelllinie HepG2 als Bezugsquelle für Selenoprotein P

Der Großteil des im Plasma zirkulierenden SeP wird von der Leber produziert [Carlson et al., 2004]. Hepatoma-Zelllinien des Menschen und der Ratte sezernieren *in vitro* ebenfalls SeP [Burk et al., 1994]. Daher sollte untersucht werden, ob die humane Hepatoma-Zelllinie HepG2 ausreichend SeP in den Zellkulturüberstand abgibt, um als Bezugsquelle für SeP verwendet werden zu können.

Zunächst wurden HepG2-Zellen mit Natriumselenit (Na_2SeO_3) verschiedener Konzentrationen (10 nM-100 μM) behandelt. Natriumselenit war bis zu einer Dosis von 1 μM MTT-Assay nicht zytotoxisch für HepG2-Zellen. Die weiteren Experimente zur Synthese und Sekretion von SeP wurden schließlich mit Natriumselenit-Konzentrationen von 10-200 nM durchgeführt. Die RNA wurde isoliert und die mRNA von Selenoprotein P, dem SECIS-bindenden Protein (SBP2) und dem Selenocystein-spezifischen Elongationsfaktor (eEFsec) mittels RT-PCR untersucht (s. Abb. 6).

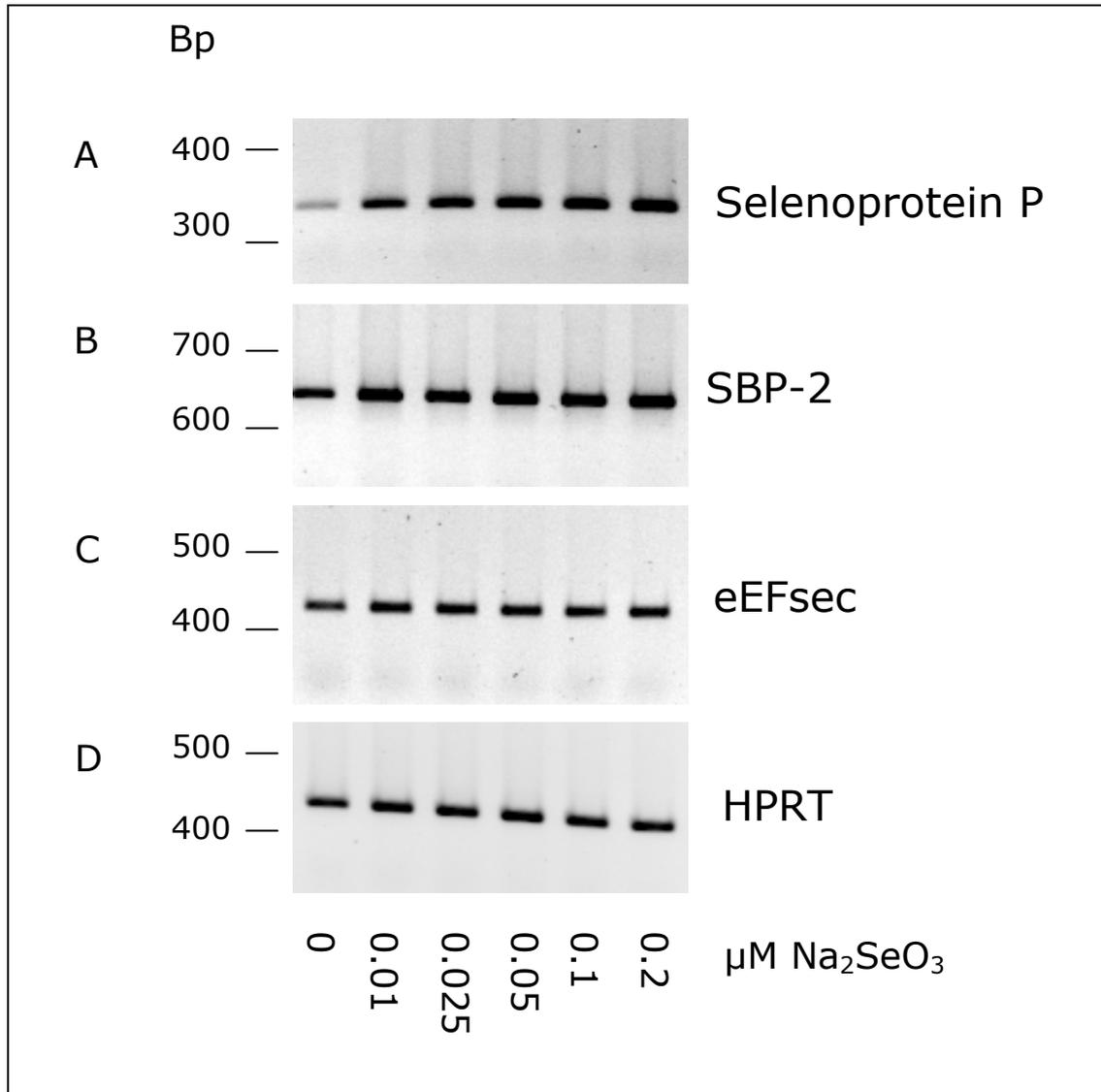


Abbildung 6: Modulation des mRNA-Gehaltes in der Hepatoma-Zelllinie HepG2. Die Abbildung zeigt das inverse Bild des Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegels einer RT-PCR-Reaktion nach Behandlung mit verschiedenen Natriumselenit-Konzentrationen. **A)-C)** mRNA-Gehalt (SeP, SBP2 und eEFsec) von unbehandelten HepG2-Zellen (0) und nach Inkubation mit Natriumselenit (0,01-0,2 μM) für 48 Stunden. **D)** HPRT-mRNA (Haushaltsgen) als Ladekontrolle. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

In Abbildung 7 ist die dazugehörige densitometrische Auswertung der drei unabhängigen RT-PCR-Versuche zur dosisabhängigen Stimulation der SeP-mRNA Expression durch Natriumselenit dargestellt.

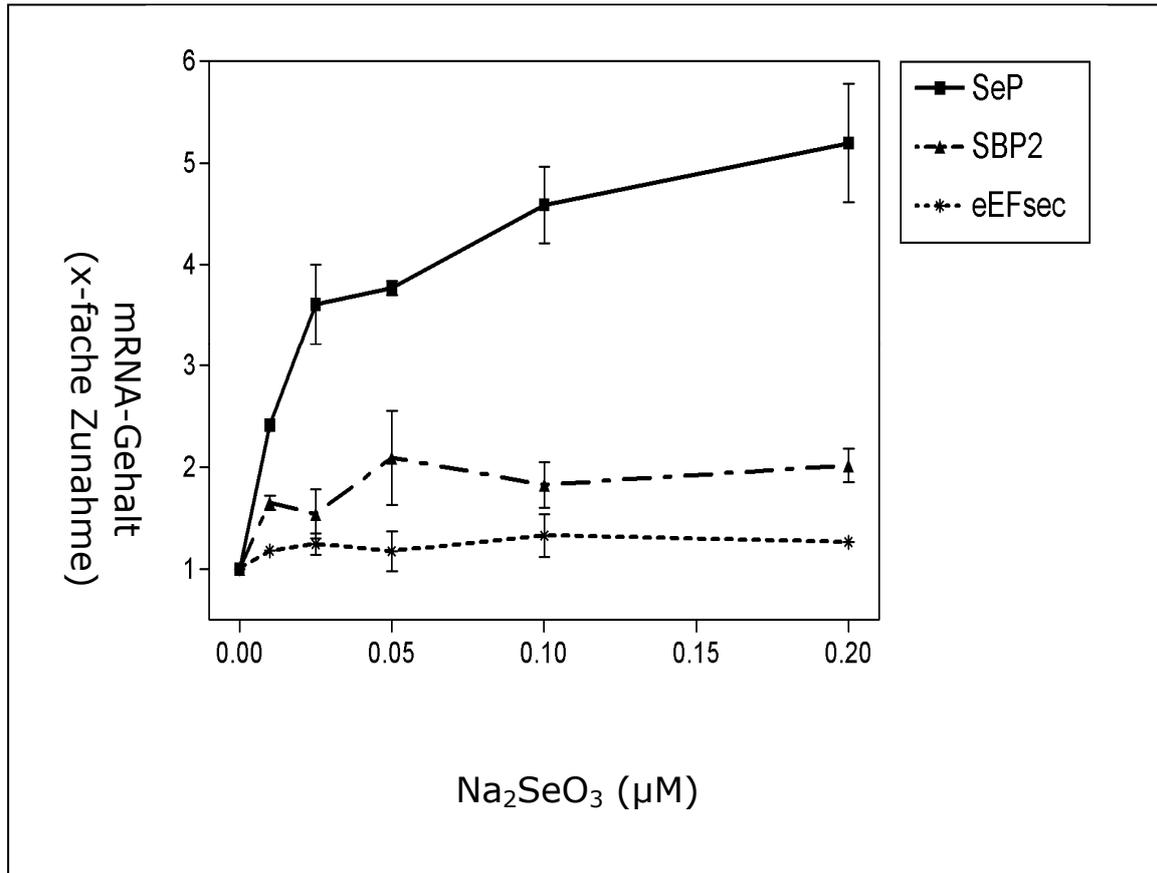


Abbildung 7: Densitometrische Analyse des mRNA-Gehaltes der PCR (s. Abb. 6). Die Analyse gibt die x-fache Zunahme des mRNA-Gehaltes wieder.

HepG2-Zellen, die für 48 Stunden unter Selenmangelbedingungen kultiviert wurden, wiesen eine basale mRNA-Expression von SeP, SBP2 und eEFsec auf. Nach 48 Stunden Behandlung mit Natriumselenit (0,01-0,2 μM) war die SeP mRNA-Expression der HepG2-Zellen dosisabhängig stimuliert. Die densitometrische Analyse zeigt den stärksten Effekt (fünffache Stimulation im Vergleich zu Selen-defizienten Zellen) bei einer Konzentration von 200 nM Natriumselenit. Im Gegensatz zum SeP war die mRNA Expression von zwei für die Biosynthese von Selenoproteinen benötigten Faktoren (Selenocystein-spezifischer Elongationsfaktor eEFsec sowie SECIS-bindendes Protein-2 (SBP-2) durch Natriumselenit nur marginal erhöht (SBP-2) bzw. unverändert (eEFsec).

Selenoprotein P wird von Hepatozyten als glykosyliertes Protein sezerniert [Burk et al., 1994]. HepG2-Zellen sezernieren Selenoprotein P als zwei Isoformen mit molekularen Massen von 51 und 61 kDa [Mostert et al., 1998]. Um die Stimulation der SeP-Sekretion durch Selenverbindungen zu untersuchen, wurden Zellkulturüberstände von HepG2-Zellen mittels Western Blot auf SeP getestet. Für den immunologischen Nachweis von SeP wurde ein Antikörper verwendet, der SeP im humanen Plasma spezifisch erkennt [Traulsen et al., 2004; Mostert et al., 1998].

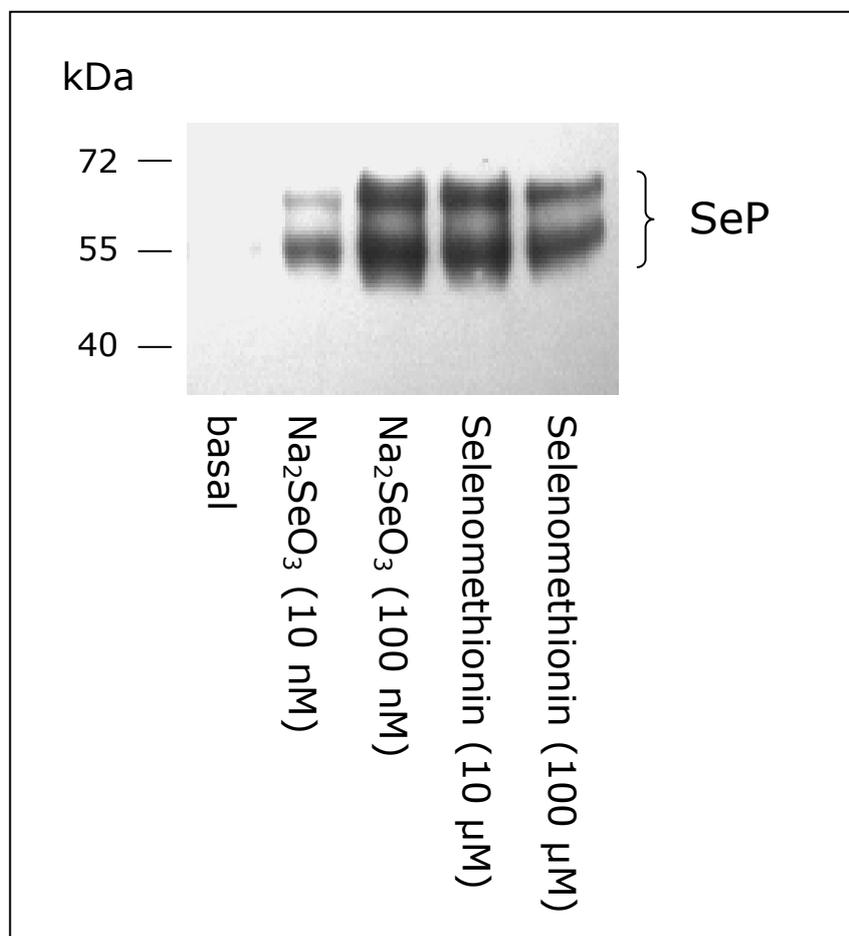


Abbildung 8: Konzentrationsabhängige Stimulation der Sekretion von SeP. Die Zellen wurden mit Natriumselenit (10 nM, 100 nM) oder Selenomethionin (10 μM, 100 μM) für 48 Stunden behandelt. Mittels Western Blotting wurde SeP in den Zellkulturüberständen bestimmt. Es wurden je drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

In Kulturüberständen von HepG2-Zellen, die für 48 Stunden ohne Selen kultiviert wurden, war kein SeP nachweisbar. Inkubation der Zellen mit Natriumselenit oder Selenomethionin führte zu einer dosisabhängigen Stimulation der SeP-Sekretion. In Übereinstimmung mit früheren Studien [Mostert et al., 1998] erscheint SeP als Doppelbande von 51 und 61 kDa.

Die antioxidative Wirkung von SeP wird diskutiert [Takebe et al., 2002; Arteel et al., 1998]. Experimente mit SeP werden jedoch dadurch erschwert, dass SeP bisher nicht als rekombinantes Protein überexprimiert und produziert werden konnte [Tujebajeva et al., 2000]. Bisher wurde SeP daher sehr zeitaufwendig durch drei Chromatographieschritte aus humanen Plasma isoliert [Mostert et al., 1998]. Selenomethionin stimulierte ebenso wie Natriumselenit in HepG2-Zellen dosisabhängig mRNA Expression und Sekretion von Selenoprotein P. Da Selenomethionin jedoch auch unspezifisch anstelle von Methionin in Proteine eingebaut werden kann [Whanger et al., 1988], wurden die HepG2-Zellen für die Experimente zur Aufreinigung von Selenoprotein P nur mit Natriumselenit stimuliert. Selenoprotein P ist bei Stimulation mit Natriumselenit das einzige von HepG2-Zellen sezernierte Selenoprotein [Tujebajeva et al., 2000], was eine Aufreinigung des SeP aus Kulturüberständen der HepG2-Zellen erleichtert. Um die Verluste bei der Aufreinigung von SeP möglichst gering zu halten sowie Denaturierungs- und Oxidationsprozesse zu minimieren, wurde nach Vorversuchen als geeignete Aufreinigungsmethode eine Aufkonzentrierung der Kulturüberstände von HepG2-Zellen mittels Ultrafiltration gewählt [Steinbrenner et al., 2005]. Zum Einsatz kamen Vivaspin 15R Konzentratorsäulen mit einer Hydrosart-Membran, an die Selenoprotein P nur marginal bindet. Durch die Ultrafiltration wurde das SeP in den Kulturüberständen 40fach konzentriert. Gleichzeitig wurden Moleküle mit einem Molekulargewicht von weniger als 30 kDa aus den Kulturüberständen entfernt, zum Beispiel nicht verbrauchtes Natriumselenit.

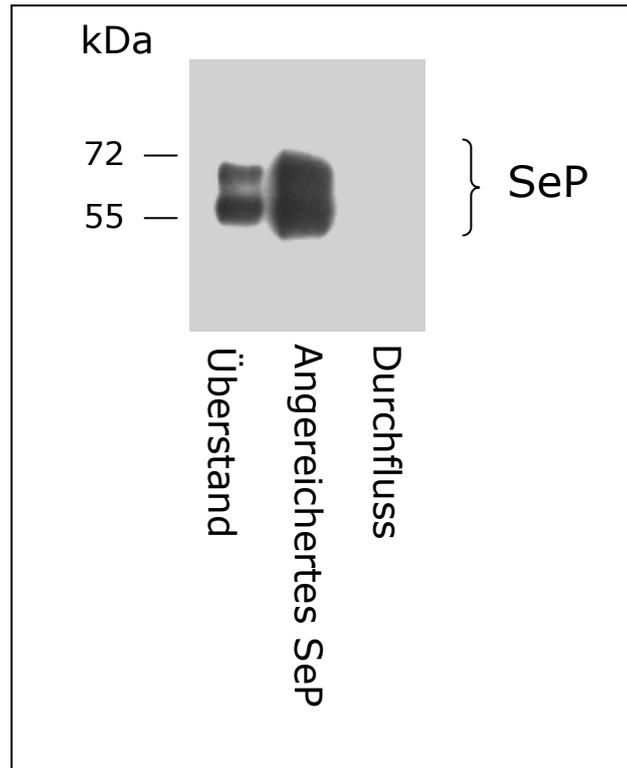


Abbildung 9: HepG2-Zellen sezernieren SeP. Die Zellen wurden für 48 Stunden mit Natriumselenit behandelt; dieser Zellkulturüberstand wurde mit Konzentratorsäulen, welche eine 30 kDa Membran enthalten, durch Ultrazentrifugation angereichert. Der Durchfluss enthält alle Proteine kleiner 30 kDa und somit kein SeP. Es wurden je drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Die Anreicherung des HepG2-Zellkulturüberstandes wurde durchgeführt, um eine höhere Konzentration an SeP zu erreichen, welches schließlich auf seine Schutzfunktion untersucht werden sollte. Außerdem sollte dadurch auch sichergestellt werden, dass der eventuelle Schutz nur durch SeP induziert wird und nicht durch das vorher zugegebene Natriumselenit.

Bevor die angereicherten HepG2-Zellkulturüberstände auf ihre Schutzfunktion getestet wurden, sollte zunächst der Selengehalt bestimmt werden. Hierzu wurden die Proben mit Hilfe eines fluorometrischen Assays [Sheehan et al., 1990] vermessen. Zellkulturüberstände von HepG2-Zellen, die sowohl mit als auch ohne Natriumselenit (100 nM) behandelt wurden und Serumproben wurden als Kontrolle mitgeführt.

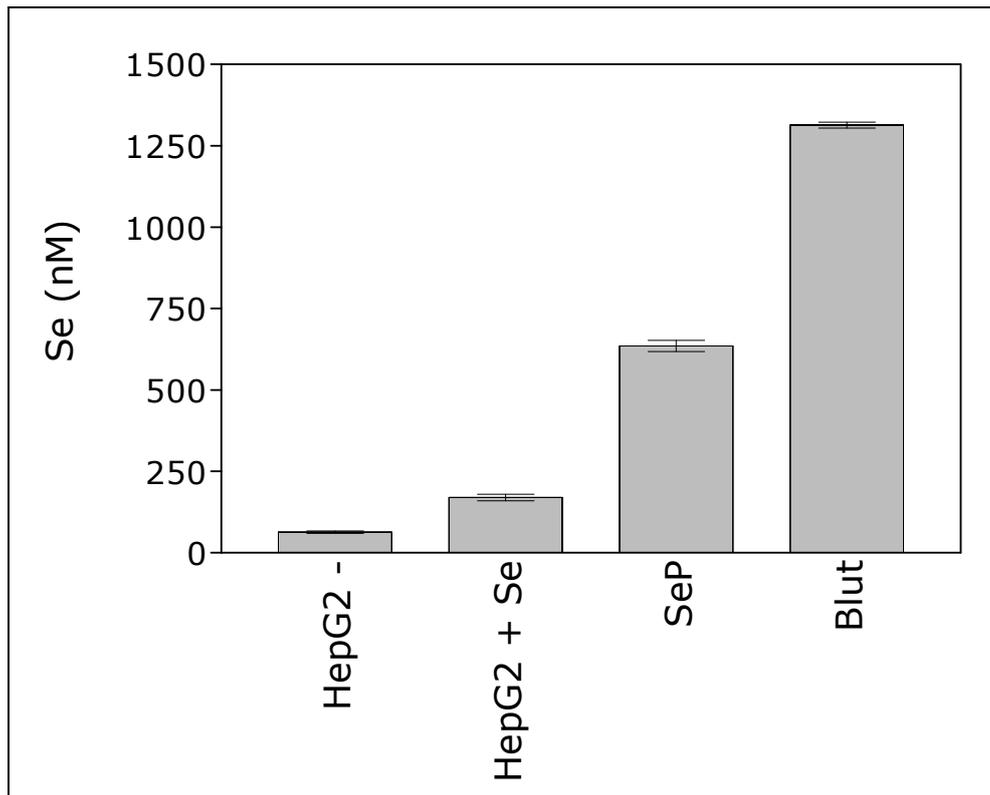


Abbildung 10: Selen-Konzentrationen in Zellkulturüberständen von HepG2-Zellen. Die Zellen wurden ohne (HepG2 -) und mit 100 nM Natriumselenit (HepG2 +Se) inkubiert. Anschließend wurde in diesen Zellkulturüberständen und in angereicherten HepG2-Zellkulturüberständen (SeP) die Selen-Konzentration bestimmt. Serumproben von freiwilligen Probanden aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I (Blut) dienten als Positivkontrolle. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Die Linearität dieses Assays ist bis zu 2000 $\mu\text{g/l}$ (25,3 μM) gegeben und die Nachweisgrenze für Selen liegt bei 10 $\mu\text{g/l}$ (126 nM).

Zellkulturüberstände von HepG2-Zellen, die für 48 Stunden Selen- und Serum-defizient kultiviert wurden, wiesen eine Selenkonzentration von ungefähr 60 nM auf. Zellkulturüberstände von HepG2-Zellen, welche für 48 Stunden mit 100 nM Natriumselenit inkubiert wurden, hatten demgegenüber eine Selenkonzentration von 170 nM.

Als Positivkontrolle dienten Serumproben, deren Selengehalt mit 1300 nM bestimmt wurde, was dem dem Literaturwert entspricht. Die durchschnittliche Vollblutselenkonzentration der Einwohner Deutschlands,

wird vom Umweltbundesamt (2002) mit 79-130 µg/l bzw. 0,94-1,77 µM angegeben. Oster nennt als durchschnittlichen Selengehalt im Vollblut westdeutscher Einwohner 92,125 µg/l [Oster et al., 1988].

Die angereicherten HepG2-Zellkulturüberstände (SeP) wiesen einen Selengehalt von ungefähr 600 nM auf. Selenoprotein P besitzt 10 Selenocysteinreste, daraus ergibt sich eine SeP-Konzentration von 60 nM in den angereicherten Proben, wenn man als Berechnungsgrundlage die maximale Anzahl (10) von Selenatomen pro Molekül SeP verwendet. Die Versuche zur Untersuchung der Schutzfunktion von angereicherten HepG2-Zellkulturüberständen (SeP) wurden mit einer Konzentration von 0.6 nM durchgeführt [Steinbrenner et al., 2005].

3.2 Expression von SeP in kultivierten Hirnzellen

3.2.1 SeP mRNA-Gehalt nach Stimulation mit verschiedenen Selenverbindungen

Die Expression von SeP mRNA wurde nicht nur in der Leber, sondern auch in vielen anderen Organen, z.B. auch im Gehirn, nachgewiesen [Dreher et al., 1997].

Bevor der mRNA-Gehalt von SeP in Astrozytoma- und Neuroblastoma-Zellen untersucht wurde, sollten zunächst die PCR-Bedingungen etabliert werden (Abb. 11).

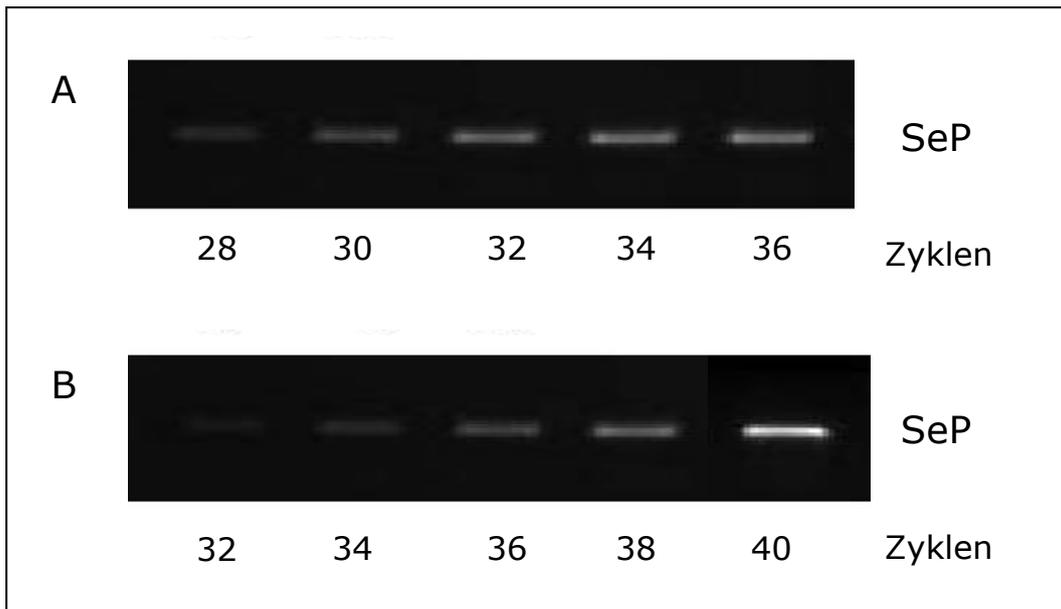


Abbildung 11: Optimierung der PCR-Zyklenzahl für die SeP mRNA. Die mRNA-Expression von SeP in **A)** humanen Astrozytoma (MOG-G-CCM) und **B)** in Neuroblastoma-Zellen (SH-SY5Y) wurde durch RT-PCR in Abhängigkeit von der Zyklenzahl während der PCR-Amplifikation nachgewiesen.

Abbildung 11 zeigt den SeP mRNA-Gehalt von A) unbehandelten Astrozytoma- und B) Neuroblastoma-Zellen nach verschiedenen Zyklenzahlen. Daraus folgt die optimale Zyklenzahl für unbehandelte (Selen-defizient kultivierte) Astrozytoma-Zellen von 31, die von unbehandelten Neuroblastoma-Zellen wurde auf 38 festgelegt, um eine mögliche Stimulation durch Behandlung mit verschiedenen Selenverbindungen nachweisen zu können.

In den folgenden Versuchsansätzen wurde der Einfluss von Natriumselenit, Selenomethionin und SeP auf die Transkription von SeP in primären Astrozyten, in der Astrozytoma-Zelllinie MOG-G-CCM und in der Neuroblastoma-Zelllinie nach jeweils 24 Stunden untersucht.

Als Ladekontrolle diente das Haushaltsgen HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase), dessen Expression durch Selenverbindungen nicht beeinflusst wird.

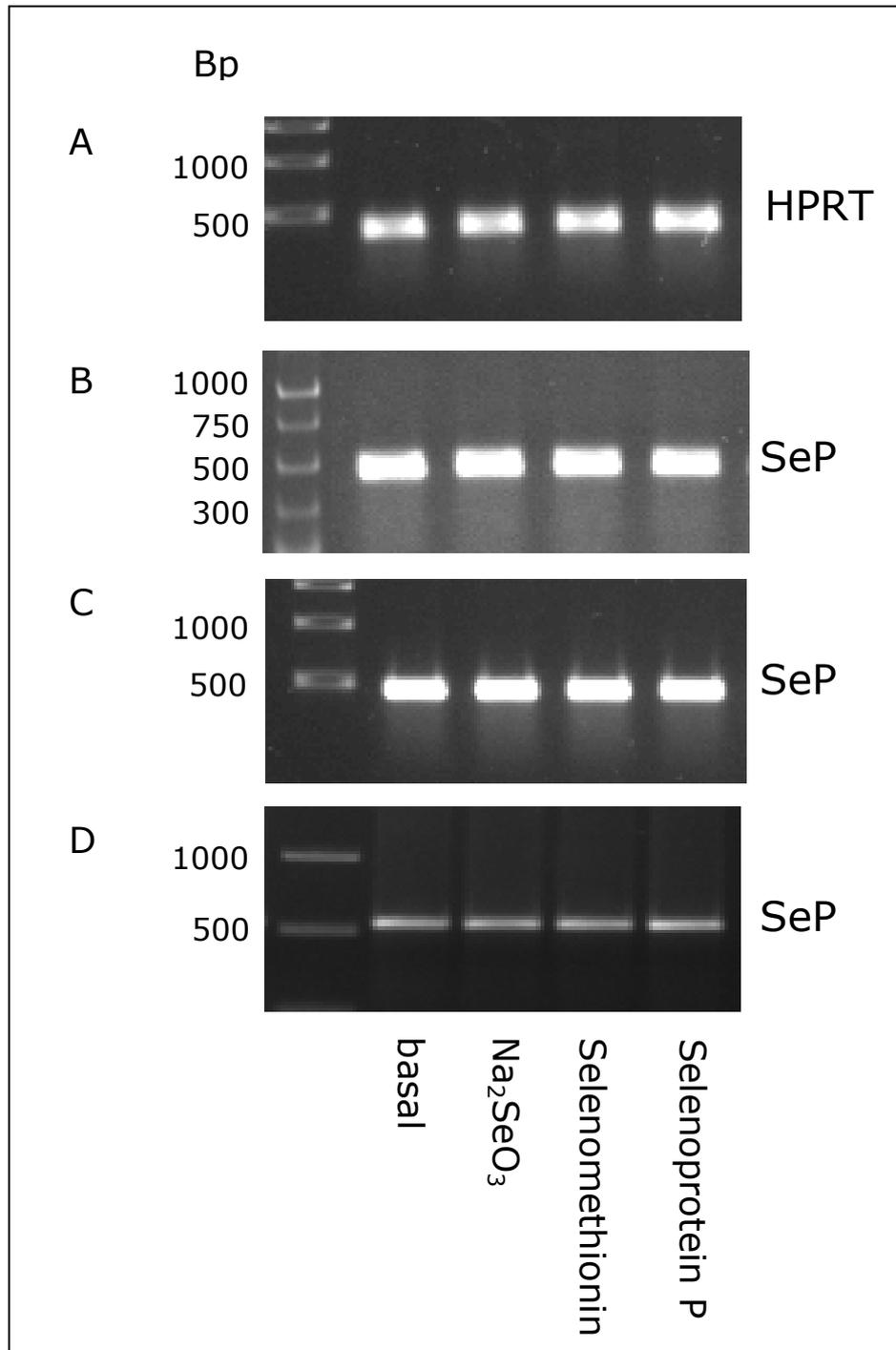


Abbildung 12: SeP-mRNA-Gehalt nach Stimulation verschiedener Hirnzellen mit Selenverbindungen. Die Abbildung zeigt das Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegel einer RT-PCR-Reaktion. **A)** HPRT-mRNA (Haushaltsgen) als Ladekontrolle, SeP-mRNA-Gehalt von **B)** primären Astrozyten, **C)** Astrozytoma-Zellen und **D)** Neuroblastoma-Zellen vor und nach Stimulation mit Na₂SeO₃ (100 nM), Selenomethionin (10 µM) und exogen zugesetzten SeP (0.6 nM) aus konzentrierten HepG2-Überständen für 24 Stunden. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Mittels RT-PCR war sowohl in humanen primären Astrozyten als auch in der humanen Astrozytoma-Zelllinie MOG-G-CCM und der Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y eine konstitutive SeP mRNA-Expression detektierbar. In allen drei verwendeten Zellen konnte SeP mRNA auch unter Selenmangelbedingungen nachgewiesen werden. Durch Zugabe von Selenverbindungen wurde die SeP mRNA-Expression nicht stimuliert.

3.2.2 Expression von SeP in immortalen MOG-G-CCM- und SH-SY5Y-Zellen

Nachdem in allen verwendeten Hirnzellen eine mRNA-Expression von SeP detektiert werden konnte, sollte auch der SeP-Proteingehalt sowohl in Zellkulturüberständen als auch in Zelllysaten mittels Western Blotting untersucht werden.

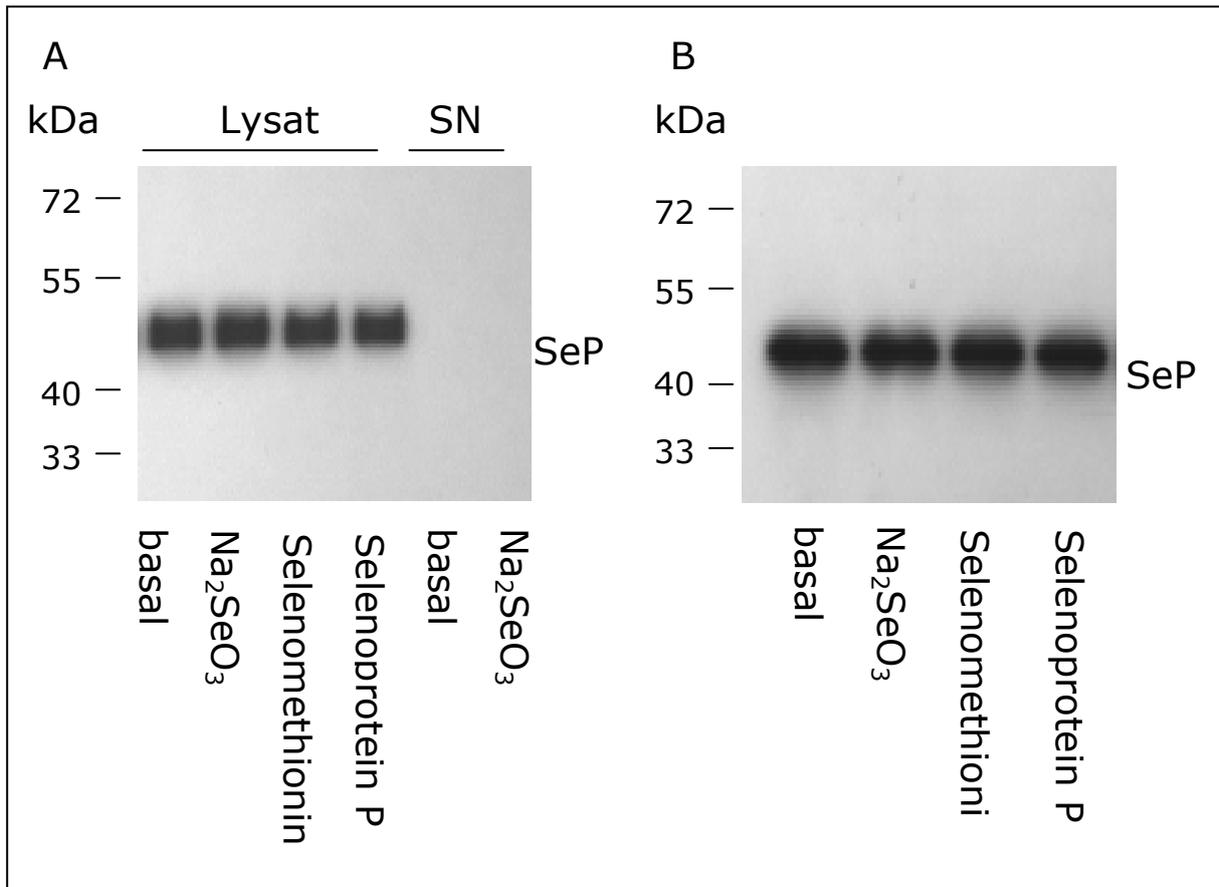


Abbildung 13: SeP-Expression in humanen Astrozyten. A) Lysat: SeP-Expression in Selen-defizienten (basal) primären humanen Astrozyten und nach Inkubation mit Na₂SeO₃ (100 nM), Selenomethionin (10 µM) und SeP (0.6 nM) für 24 Stunden. Überstand (SN): SeP-Sekretion von primären Astrozyten, basal (ohne Selen) und nach Inkubation mit Na₂SeO₃ (100 nM). B) Intrazelluläre SeP-Expression in Selen-defizienten (basal) humanen Astrozytoma-Zellen und nach Inkubation mit Na₂SeO₃ (100 nM), Selenomethionin (10 µM) und SeP (0.6 nM) für 24 Stunden. 20 µg Protein wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und schließlich durch Immunblotting auf SeP untersucht. Es wurden je drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Ein polyklonaler primärer Antikörper, der gegen ein Peptid aus dem humanen SeP gerichtet ist, wurde schon genutzt, um humanes SeP im Blutplasma [Traulsen et al., 2004; Mostert et al., 1998] und Kulturüberständen von HepG2-Zellen zu detektieren. Dieser wurde nun für die Detektion der SeP Expression in Zelllysaten und Zellkulturüberständen von primären humanen Astrozyten eingesetzt (Abb. 13 A). Im Gegensatz zur gezeigten SeP-Doppelbande in HepG2-Zellkulturüberständen wurde im

Zelllysate der Astrozyten eine einzelne Bande mit einer molekularen Masse von 45 kDa detektiert. Unter Selenmangelbedingungen (48 Stunden Kultivierung im Serum-freien Medium) konnte in den Astrozyten eine konstitutive SeP Expression gezeigt werden. Die SeP Expression ist zudem unabhängig von exogen zugegebenen Selenverbindungen (Na_2SeO_3 (100 nM), Selenomethionin (10 μM) und SeP (0.6 nM)). In den Zellkulturüberständen der primären Astrozyten konnte kein SeP detektiert werden. Die SeP-Expression in der humanen Astrozytoma-Zelllinie MOG-G-CCM ist ebenfalls konstitutiv und unabhängig von exogen zugegebenen Selenverbindungen (Abb. 13 B) [Steinbrenner et al., 2005].

Da sowohl unter Selenmangel als auch nach Selen-Zugabe die Selenoprotein P mRNA und die Proteinexpression in primären Astrozyten und in Astrozytoma-Zellen gleich ist, wurde die Astrozytoma-Zelllinie als Modell für die weiteren Experimente verwendet.

Zudem wurde die Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y auf intrazelluläres SeP untersucht. Die Zelllysate zeigten ebenfalls eine konstitutive SeP-Expression, außerdem führte eine Inkubation mit den Selenverbindungen Na_2SeO_3 (100 nM), Selenomethionin (10 μM) und SeP (0.6 nM) zu keiner Änderung der SeP-Expression (Abb. 14).

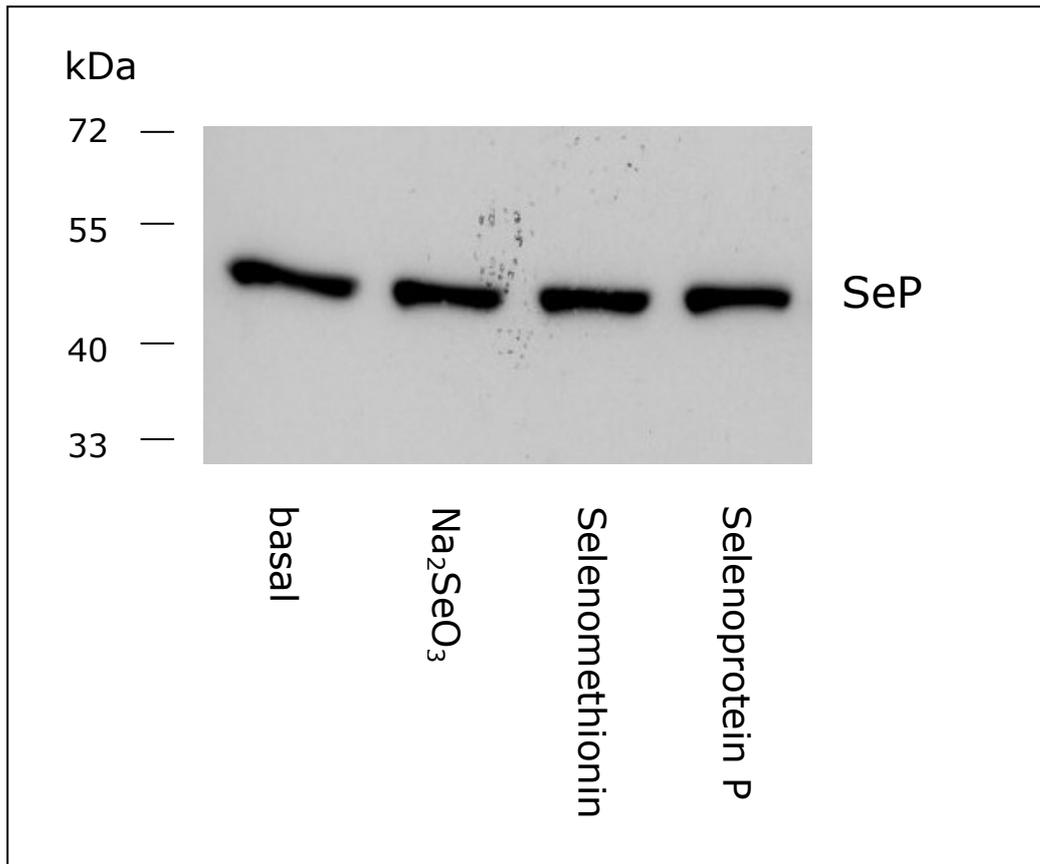


Abbildung 14: SeP-Expression der humanen Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y. SeP-Expression in unbehandelten (basal) SH-SY5Y-Zellen und nach Inkubation mit Na₂SeO₃ (100 nM), Selenomethionin (10 µM) und SeP (0.6 nM) für 24 Stunden. 20 µg Protein wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und schließlich durch Immunblotting auf SeP untersucht. Es wurden je drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Die hochdifferenzierte humane neuronale Zelllinie SH-SY5Y exprimiert demnach ebenfalls intrazellulär SeP, allerdings in geringeren Mengen als Astrozytoma-Zellen (s. Abb. 15).

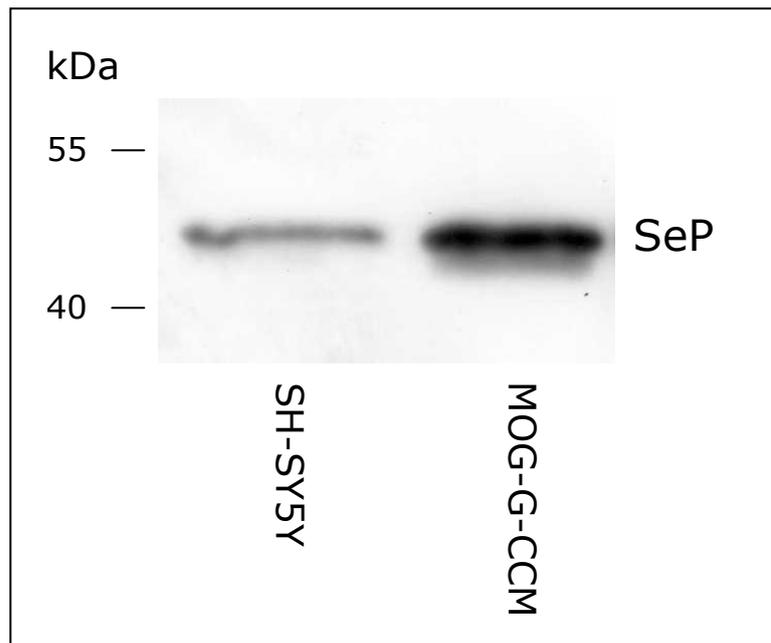


Abbildung 15: Vergleich der SeP-Expression in verschiedenen Hirnzellen. SeP-Expression in unbehandelten humanen Astrozytoma-Zellen im Vergleich zu unbehandelten humanen Neuroblastoma-Zellen. 20 µg Protein wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und schließlich durch Immunblotting auf SeP untersucht. Es wurden je drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

3.2.3 Glykosylierung von Selenoprotein P

Um herauszufinden, ob die unterschiedlichen molekularen Massen von SeP in Astrozytoma (MOG-G-CCM)- und Leberzellen (HepG2) durch verschiedene Glykosylierungszustände hervorgerufen werden, wurde ein enzymatischer Verdau mit N-Glykosidase F durchgeführt.

N-Glykosidase F spaltet die N-Glykan-Bindung zwischen dem Asparagin, der Polypeptidkette und dem ersten Mannoserest des Zuckermoleküls. Durch einen vollständigen Verdau mit Glykosidase F kann theoretisch der gesamte Zuckeranteil an N-gebundenem Zucker vom Protein entfernt werden.

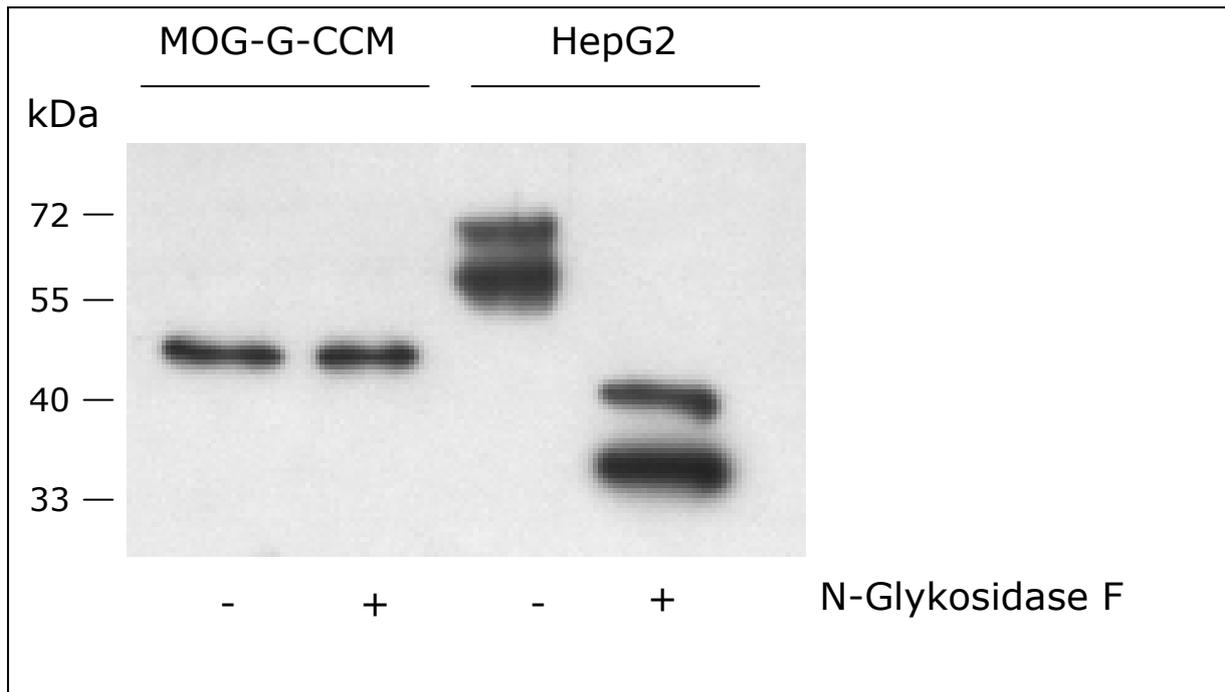


Abbildung 16: Deglykosylierung von Selenoprotein P. Nachweis von SeP in Lysaten von Astrozytoma-Zellen und im Überstand von HepG2-Zellen vor und nach dem *in vitro* Verdau mit N-Glykosidase F. Es wurden je drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Die Behandlung mit N-Glykosidase F von HepG2-Zellen führte zu einer erheblichen Veränderung der elektrophoretischen Mobilität des sezernierten SeP im Polyacrylamidgel (Abb. 16). Dies zeigt, dass beide SeP-Isoformen im Kulturüberstand von HepG2-Zellen glykosyliert vorliegen. Die Molekülmasse der größeren Isoform entspricht nach der Deglykosylierung dem vollständigen SeP core Protein mit zehn Selenatomen. Im Gegensatz dazu war die Molekülmasse des (nichtsezernierten) SeP in den Astrozytoma-Lysaten nach der Deglykosylierung nicht verändert.

Aus diesem Befund ergibt sich, dass SeP in MOG-G-CCM Astrozytoma-Zellen in nicht-glykosilierter Form vorliegt.

3.2.4 Immunzytochemischer Nachweis von SeP in Astrozytomazellen

Die Lokalisation von SeP in der Astrozytoma-Zelllinie sollte zuerst immunzytochemisch untersucht werden. Die MOG-G-CCM-Zellen wurden auf Glasplättchen in Serum-haltigem Medium ausgesät, das nach 24 Stunden durch Serum-freies Medium ersetzt wurde. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Astrozytoma-Zellen immunzytochemisch auf die SeP Lokalisation untersucht (Abb. 17).

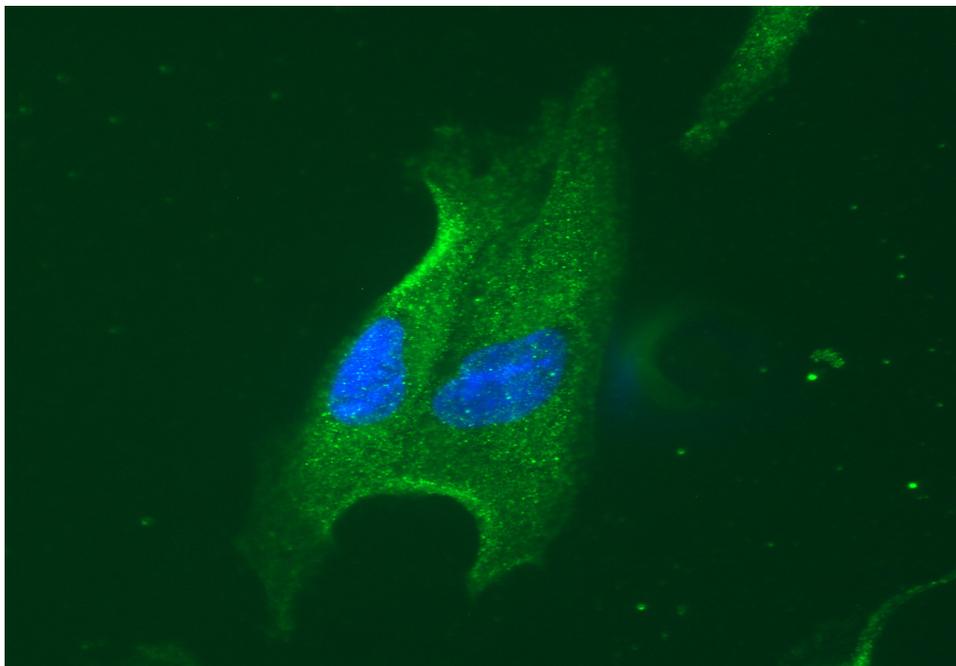


Abbildung 17: Immunzytochemischer Nachweis von Selenoprotein P in Astrozytomazellen. In blau wurden die DAPI-gefärbten Zellkerne als Superpositionsbild überlagert. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Die immunzytochemisch gegen SeP gefärbten Astrozytoma-Zellen zeigen eine starke Verteilung des Proteins. Es ist nicht ersichtlich, ob das SeP im Zytosol oder in intrazellulären Membranen lokalisiert ist. Hierfür wurde anschließend eine Zell-Fraktionierung durchgeführt.

3.2.5 Subzelluläre Verteilung von Selenoprotein P in humanen Astrozytoma-Zellen

Durch eine Detergenz-Fraktionierung [Ramsby et al., 1994; s. Material und Methoden: 2.2.8] erhielt man verschiedene subzelluläre Fraktionen von Astrozytoma-Zellen. Im Einzelnen wurden die zytosolische, die Membran/Organellen und die nukleäre Proteinfraction präpariert. SeP konnte durch Immunblotting fast ausschließlich in der Membran/Organellen-Fraktion detektiert werden (Abb. 18 A).

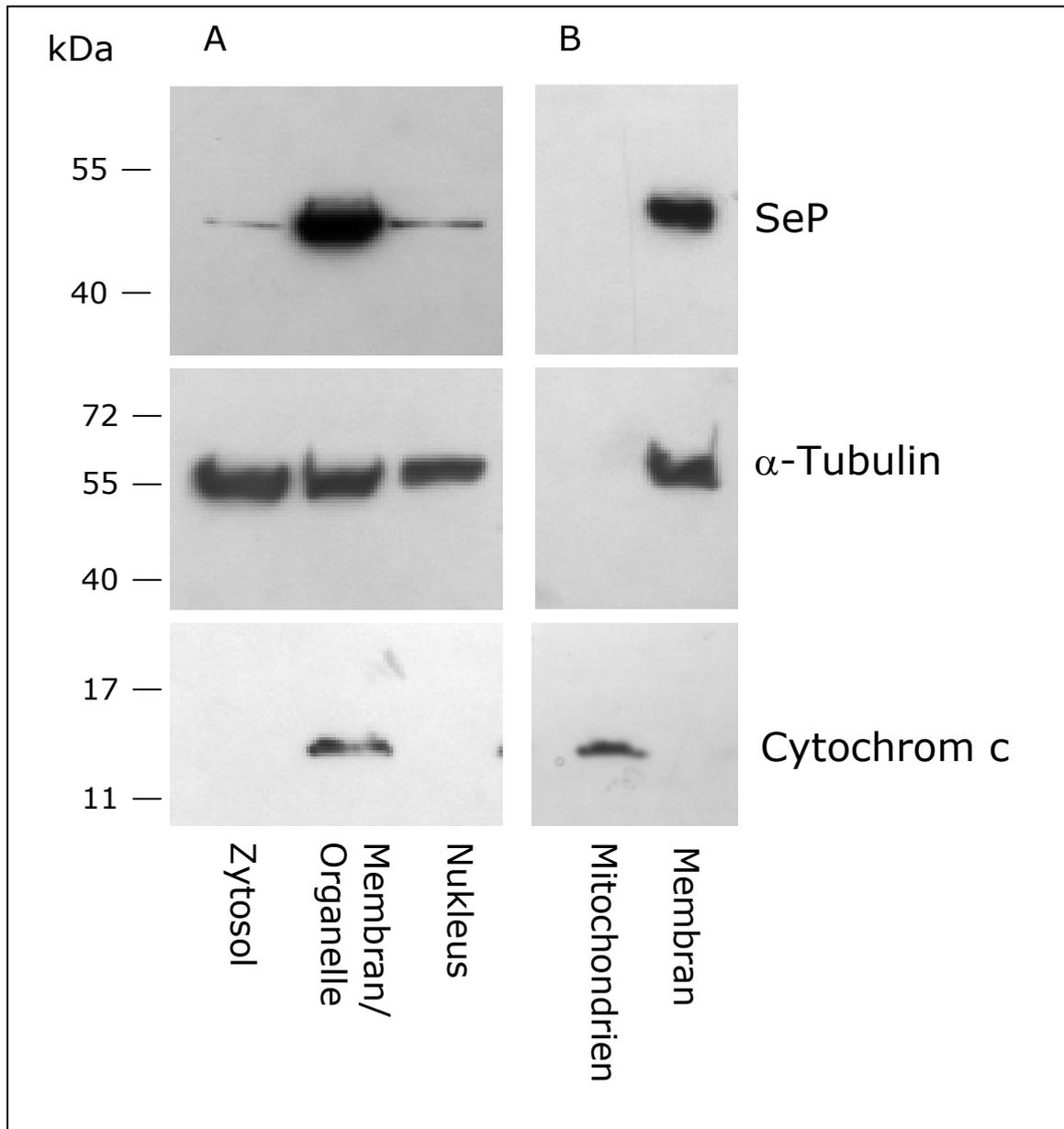


Abbildung 18: Lokalisation von SeP in Astrozytoma Zellen (MOG-G-CCM). Aus den Zellen wurden durch aufeinanderfolgende Inkubation mit verschiedenen Detergenzien unterschiedliche subzelluläre Proteinfractionen isoliert. 20 μ g Protein von jeder subzellulären Fraktion wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und schließlich durch Immunblotting auf SeP untersucht. **A)** Aus der Membran/Organellen-Fraktion wurde durch Zentrifugation bei 100000xg für eine Stunde die mitochondriale Fraktion abgetrennt. Sowohl membran- als auch Mitochondrienfraktion wurden anschließend auf SeP untersucht. **B)** α -Tubulin- und Cytochrom c wurden nachgewiesen, um die Auftragung einer gleichmäßigen Proteinmenge bzw. die Reinheit der mitochondrialen Fraktion zu gewährleisten. Es wurden je drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Durch Ultrazentrifugation wurde die Membran/Organellen Fraktion weiter separiert und man erhielt eine Mitochondrien- und eine Membran-Fraktion. Nach diesem Schritt wurde SeP in der Membran-Fraktion durch Immunblotting nachgewiesen (Abb. 18 B) [Steinbrenner et al. 2005].

Aus den Experimenten zur Immunzytochemie und Fraktionierung kann gefolgert werden, dass SeP vermutlich im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert ist.

3.3 Antioxidativer Schutz gegen ROS-induzierte Zytotoxizität

3.3.1 Humane Astrozytoma-Zellen (MOG-G-CCM)

Hirnzellen sind potentielle Zielzellen für SeP, welches von der Leber sezerniert und über das Blut transportiert wird. In diesem Zusammenhang sollte die Schutzwirkung von SeP auf humane Astrozyten gegen oxidativen Stress, induziert durch toxische Dosen von t-Butylhydroperoxid, H₂O₂ und das Superoxid-generierende Herbizid Paraquat, untersucht werden. Die Astrozytoma-Zelllinie MOG-G-CCM wurde als zelluläres Modell für Astrozyten verwendet.

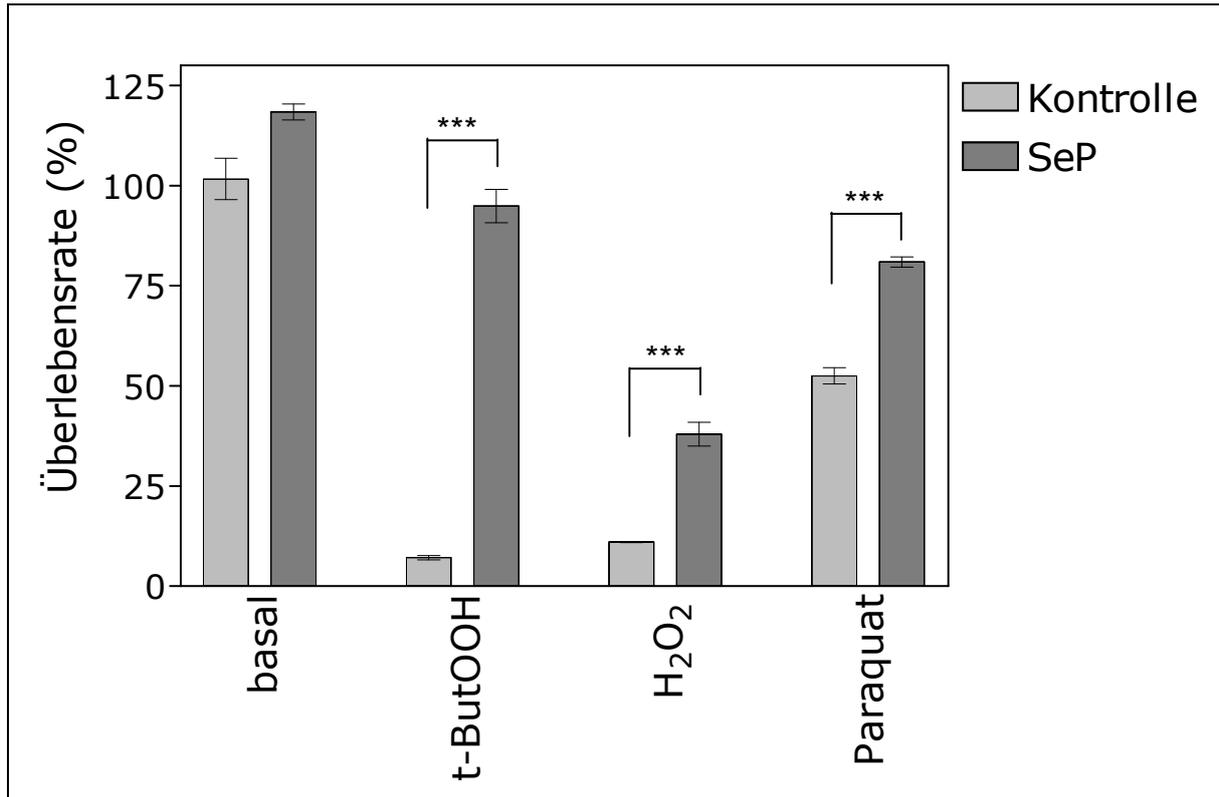


Abbildung 19: Vitalität von MOG-G-CCM-Zellen. Nach Kultivierung in Serum-freien Medium ohne (Kontrolle) und mit Vorbehandlung mit 0.6 nM SeP für 48 Stunden. Nach Stimulation mit 200 μ M t-Butylhydroperoxid, 1 mM H₂O₂ oder 300 μ M Paraquat für 24 Stunden wurde die Vitalität mit Hilfe des MTT-Assays gemessen. Die Vitalität ist prozentual zu den unbehandelten Kontroll-Astrozytoma (basal), deren Vitalität auf 100 % gesetzt wurde, berechnet. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe des Student's t-Tests bestimmt. *** $P < 0.001$ gegen Kontrolle. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Das organische Hydroperoxid t-Butylhydroperoxid (t-BHP) wurde bereits in einer Studie zur Induktion von oxidativem Stress in Ratten-Astrozyten verwendet [Abe et al., 1998]. Die Astrozytoma-Zellen, die mit 200 μ M t-BHP behandelt wurden, zeigten nach 24 Stunden eine Vitalität von ungefähr 10 % verglichen mit den unbehandelten (basal) Kontrollen. Eine Vorinkubation mit 0.6 nM SeP für 48 Stunden schützte die Zellen vor dem durch t-BHP induzierten oxidativen Stress. Die Überlebensrate blieb auf einem Wert von ungefähr 95%.

H₂O₂ und Paraquat waren ebenfalls zytotoxisch und führten zu einer Erniedrigung der Vitalität der Zellen auf 15% und 50% (nach 24 Stunden). Eine Vorinkubation mit SeP hatte zwar auch einen zytoprotektiven Effekt, der allerdings nicht so stark wie bei den mit t-BHP behandelten Zellen war [Steinbrenner et al., 2006]. Für weitere Experimente wurde schließlich das t-Butylhydroperoxid als Modellsubstanz zur Induktion von oxidativen Stress gewählt.

Dem Spurenelement Selen wird eine wesentliche Rolle beim Schutz von Hirnzellen gegen oxidativen Stress zugeschrieben [Chen und Berry, 2003]. Oxidativer Stress ist vermutlich in die Pathogenese von neurodegenerativen Krankheiten (z.B. Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer) und in akute Hirnschädigungen durch Ischämie oder Schlaganfall involviert [Halliwell, 2006]. Allerdings existieren bisher nur wenige klinische Studien zum Einsatz von Selen bei neurologischen Erkrankungen, während Selen in vitro kultivierte Zellen vor oxidativem Zelltod schützte. Daher wurden die niedermolekularen Selenverbindungen Natriumselenit und Selenomethionin auf ihre Schutzwirkung in Astrozytoma-Zellen untersucht.

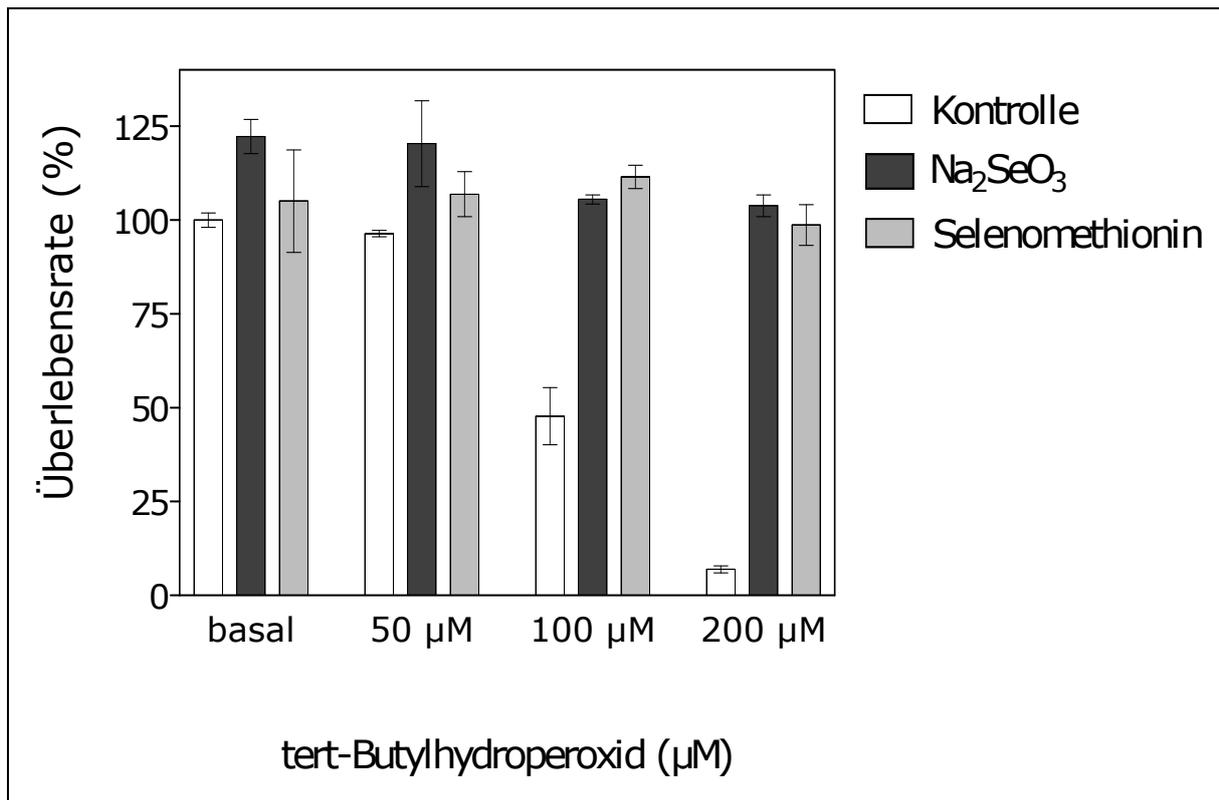


Abbildung 20: Vitalität von MOG-G-CCM-Zellen unter der Wirkung von niedermolekularen Selenverbindungen. Kultivierung in serumfreien Medium ohne (Kontrolle) und mit Vorbehandlung mit Natriumselenit (100 nM) oder Selenomethionin (10 µM) für 24 Stunden. Nach Stimulation mit verschiedenen t-Butylhydroperoxid-Konzentrationen (50, 100, 200 µM) für 24 Stunden wurde die Vitalität mit Hilfe des MTT-Assays vermessen. Die Vitalität ist prozentual zu den unbehandelten Kontroll-Astrozytoma (100%) berechnet. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche. basal: unbehandelte Zellen.

Die Behandlung von humanen Astrozytoma (MOG-G-CCM) mit t-BHP führte zu einer konzentrationsabhängigen Inhibierung der metabolischen Aktivität der Zellen, welche mit Hilfe des MTT-Assays gemessen wurde. Während 50 µM t-BHP für 24 Stunden die Zellen nur marginal schädigte, führten die höheren Konzentrationen zu einer erniedrigten Zell-Vitalität von nur noch 10-50%, im Vergleich zu unbehandelten Zellen (basal). Eine Vorinkubation der Zellen mit niedermolekularen Selenverbindungen, wie Natriumselenit (100 nM) und Selenomethionin (10 µM) für 24 Stunden, führte zu einer Aufhebung des zytotoxischen Effekts von t-BHP.

Derselbe Versuchsansatz wurde verwendet, um die Schutzwirkung von SeP näher zu charakterisieren (Abb. 21). Anstelle der niedermolekularen Selenverbindungen wurden SeP (0.6 nM) und eine (Negativ-) Kontrolle eingesetzt. Mit SeP werden hier und in den folgenden Abbildungen die durch Ultrafiltration konzentrierten Kulturüberstände von HepG2-Zellen, die mit Natriumselenit für 48 Stunden behandelt wurden, bezeichnet (s. Abb. 9). Die (Negativ-) Kontrolle bestand aus gleicherweise konzentrierten Kulturüberständen von HepG2-Zellen, welche unter Selenmangel-Bedingungen gewachsen waren und deswegen kein SeP sezernierten (s. Abb.8).

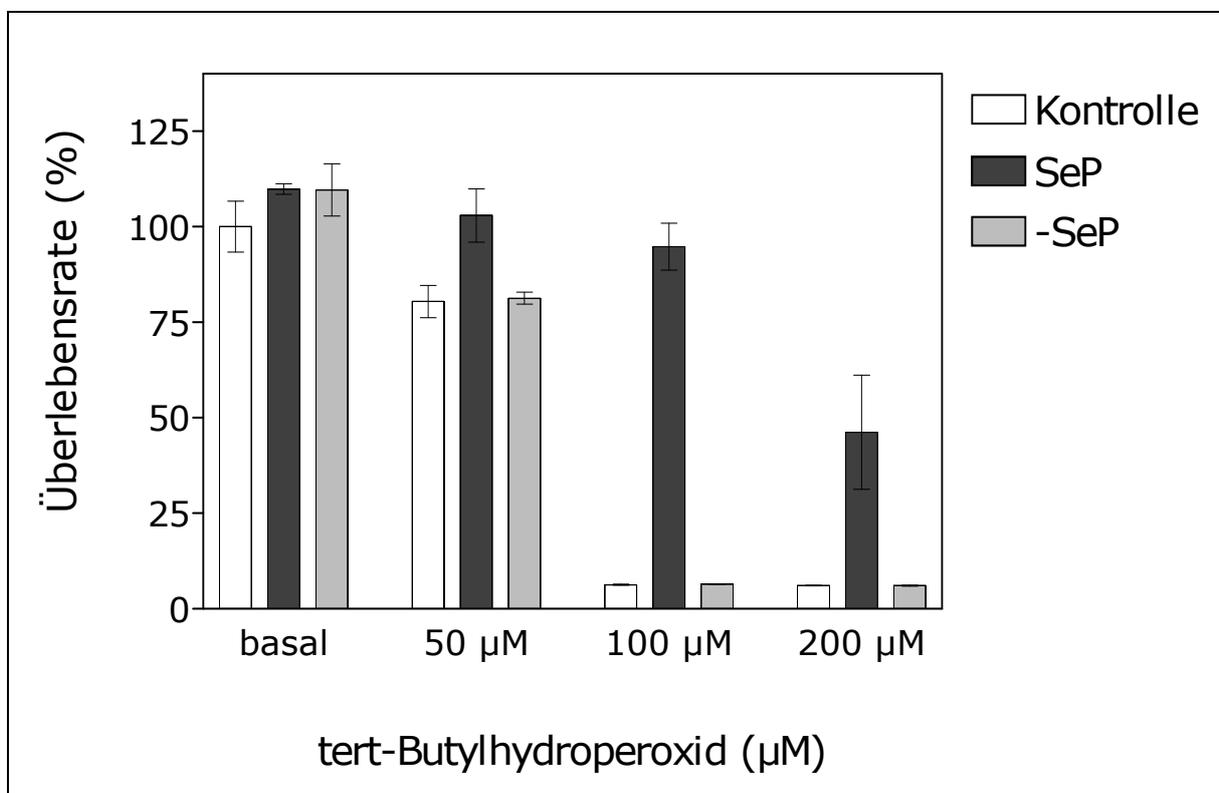


Abbildung 21: Vitalität von MOG-G-CCM-Zellen unter dem Einfluss von SeP. Kultiviert in serumfreien Medium ohne (Kontrolle) und mit Vorbehandlung mit SeP (0.6 nM) für 48 Stunden. Außerdem wurden die Kulturüberstände von HepG2-Zellen verwendet, welche unter Selenmangelbedingung kultiviert wurden und somit kein SeP sezernieren (-SeP) (s. Abb. 8). Nach Stimulation mit verschiedenen t-Butylhydroperoxid-Konzentrationen für 24 Stunden wurde die Vitalität mit Hilfe des MTT-Assays vermessen. Die Vitalität ist prozentual zu den unbehandelten Kontroll-Astrozytoma (100%) berechnet. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche. basal: unbehandelte Zellen.

Selenoprotein P hatte wie Natriumselenit und Selenomethionin einen protektiven Effekt, allerdings ist dieser zeitabhängig. Eine Inkubation mit angereichertem SeP für 48 Stunden schützte die Astrozytoma-Zellen vor durch t-BHP induzierter Zytotoxizität. Eine kürzere Inkubationszeit von 12 bzw. 24 Stunden mit SeP hatte keinen Schutzeffekt. Auch eine Prä-Inkubation mit SeP für 48 Stunden führte zu einem protektiven Effekt in Astrozytoma-Zellen vor der Stimulation mit t-BHP. Der konzentrierte Kulturüberstand von selendefizienten HepG2-Zellen, der kein SeP enthält, wurde als (Negativ-) Kontrolle mitgeführt. Die Astrozytoma-Zellen, die mit diesem Überstand vorinkubiert wurden, waren nicht vor der oxidativen Wirkung des t-BHP geschützt, wodurch ausgeschlossen ist, dass der Schutz durch einen unspezifischen Proteineffekt (z.B. Albumin) verursacht wird [Steinbrenner et al., 2005].

Um sicherzustellen, dass der Schutzeffekt tatsächlich durch SeP verursacht wird und nicht durch Restmengen von nichtverbrauchten und ebenfalls mitangereicherten Natriumselenit, wurde folgendes Kontroll-Experiment durchgeführt: HepG2-Zellen wurden für eine Stunde mit Brefeldin A (5 µg/ml) vorinkubiert und schließlich für 48 Stunden mit Natriumselenit inkubiert. Diese Zellkulturüberstände wurden genau wie die Zellkulturüberstände von nur mit Natriumselenit behandelten HepG2-Zellen (s. Abb. 9) angereichert und auf eine mögliche protektive Wirkung getestet.

Da Brefeldin A eine Akkumulation von sekretorischen Glykoproteinen im Endoplasmatischen Retikulum bewirkt [Fujiwara et al., 1988], sollte dieser angereicherte Zellkulturüberstand kein SeP enthalten (Abb. 22) sowie keinen Schutzeffekt vermitteln (Abb. 23).

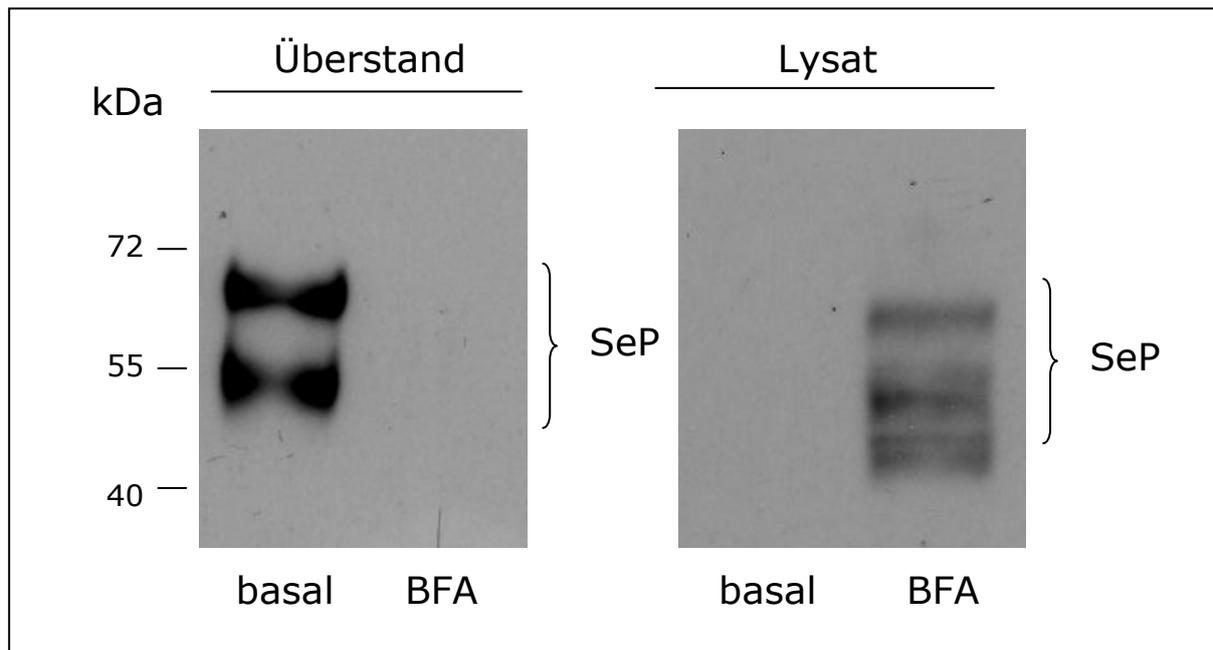


Abbildung 22: Nachweis von SeP in Zellkulturüberständen und Lysaten von HepG2-Zellen. HepG2-Zellen, die für 48 Stunden mit Natriumselenit behandelt wurden, sezernieren SeP (basal). Vorinkubation mit Brefeldin A (BFA, 5 $\mu\text{g/ml}$) für eine Stunde verhinderte die Sekretion von SeP in den Zellkulturüberstand. Mittels Western Blotting wurde SeP in den Zellkulturüberständen und Lysaten bestimmt. Es wurden je drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Wie bereits in Abb. 8 gezeigt, sezernieren HepG2-Zellen nach Inkubation mit Natriumselenit SeP. Eine Vorinkubation mit Brefeldin A (5 $\mu\text{g/ml}$) verhinderte die Sekretion von SeP und konnte nur noch im Zelllysat detektiert werden.

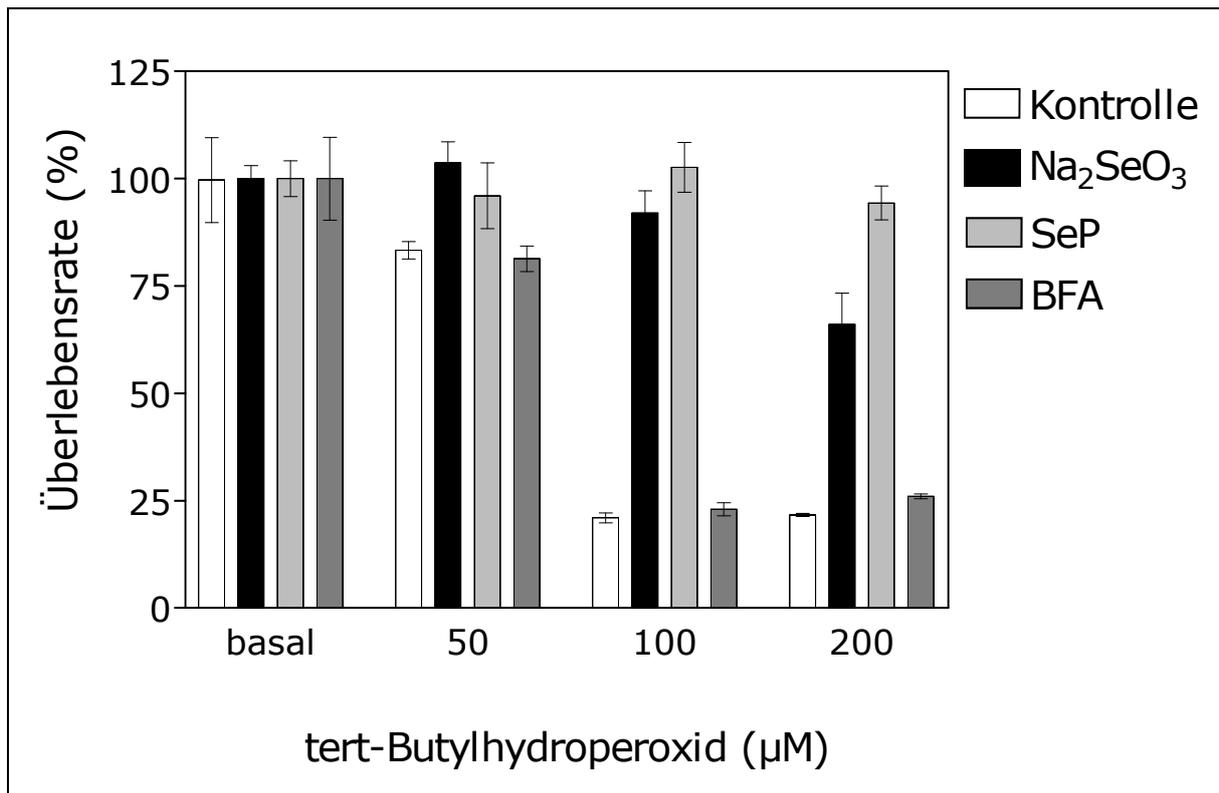


Abbildung 23: Vitalität von MOG-G-CCM-Zellen unter der Wirkung von Brefeldin A. Kultivierung in serumfreien Medium ohne (Kontrolle) und mit Vorbehandlung mit Natriumselenit (100 nM), SeP (0.6 nM) oder konzentrierten Überstand von HepG2-Zellen nach Stimulation mit Natriumselenit + Brefeldin A (5 µg/ml) (BFA) für 48 Stunden. Nach Stimulation mit verschiedenen t-Butylhydroperoxid-Konzentrationen (50, 100, 200 µM) für 24 Stunden wurde die Vitalität mit Hilfe des MTT-Assays gemessen. Die Vitalität ist prozentual zu den unbehandelten Kontroll-Astrozytoma (100%) berechnet. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche. basal: unbehandelte Zellen.

Wie bereits in Abb. 20 und 21 gezeigt, waren die Astrozytoma-Zellen durch Natriumselenit und SeP vor oxidativem Stress, induziert durch tert-Butylhydroperoxid, geschützt. Im Gegensatz dazu hatten die angereicherten Kulturüberstände von Natriumselenit-supplementierten HepG2-Zellen, die mit Brefeldin A behandelt worden waren, keinen protektiven Effekt für die Astrozytoma-Zellen. Daraus ergibt sich als Schlussfolgerung, dass der beobachtete Schutzeffekt von konzentrierten Kulturüberständen von HepG2-Zellen, die mit Natriumselenit stimuliert worden waren, nur durch das sezernierte SeP verursacht wird.

Eventuell nach der Ultrafiltration noch vorhandene geringe Restmengen von nichtmetabolisierten Natriumselenit sind demgegenüber nicht für den antioxidativen Schutz der MOG-G-CCM verantwortlich.

3.3.2 Humane Neuroblastoma-Zellen (SH-SY5Y)

Im Gehirn sind vor allem Neuronen anfällig für oxidativen Stress. Daher sollte die neuronale Zelllinie SH-SY5Y mit tert-Butylhydroperoxid stimuliert und die Schutzwirkung der verschiedenen Selenverbindungen untersucht werden.

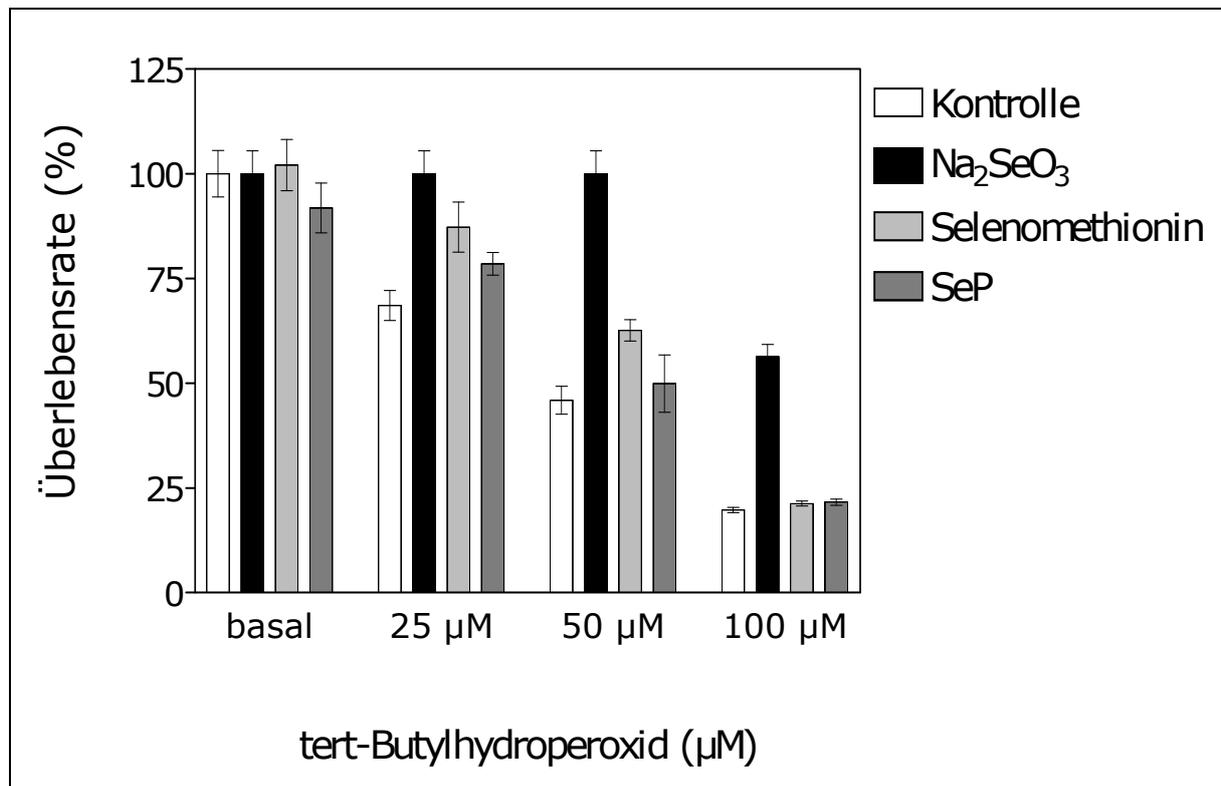


Abbildung 24: Vitalität von SH-SY5Y-Zellen unter der Wirkung von t-BHP. Kultivierung in serumfreien Medium mit und ohne Vorbehandlung mit Natriumselenit (100 nM), Selenomethionin (10 µM) und SeP (0.6 nM) für 48 Stunden. Nach Stimulation mit verschiedenen t-Butylhydroperoxid-Konzentrationen (25, 50, 100 µM) für 24 Stunden wurde die Vitalität mit Hilfe des MTT-Assays gemessen. Die Vitalität ist prozentual zu den unbehandelten Kontroll-Astrozytoma (100%) berechnet. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Die Behandlung von SH-SY5Y-Zellen mit t-BHP führte zu einem konzentrationsabhängigen Absterben der Zellen, welche mit Hilfe des MTT-Assays gemessen wurde. Es wird deutlich, dass Neuronen stressempfindlicher sind als Astrozyten. Eine Stimulation mit 50 μM t-BHP führt in unbehandelten (selendefizienten) Neuroblastoma-Zellen bereits zu einer Inhibierung der metabolischen Aktivität auf 50%, wohingegen die metabolische Aktivität in Astrozytoma-Zellen bei dieser t-BHP-Konzentration sich nur marginal erniedrigt (s. Abb. 20). Eine Vorinkubation mit Natriumselenit (100 nM) für 48 Stunden, führte zu einer Aufhebung des zytotoxischen Effekts von t-BHP. Eine kürzere Vorinkubation von 24 Stunden reichte im Unterschied zu den Astrozytoma-Zellen nicht aus, um einen Schutzeffekt zu erhalten. Die Selenverbindungen Selenomethionin (10 μM) und SeP (0.6 nM) wiesen keinen bzw. nur einen marginalen (nichtsignifikanten) protektiven Effekt auf.

3.3.3 Kokultursystem von MOG-G-CCM und SH-SY5Y

Es ist bekannt, dass Astrozyten Neuronen vor durch Hydroperoxid-induzierten Stress schützen [Desagher et al., 1996]. Dieser Aspekt sollte nun an den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien untersucht werden. Dazu wurde ein Kokultursystem mit Zellkulturinserts verwendet. Die Neuroblastoma-Zellen wurden in 24-well-Platten ausgesät, in welche Zellkulturinserts mit einer Porengröße von 4 μm eingebracht wurden. In diese konnten dann die Astrozytoma-Zellen eingesät werden. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium durch Serum-freies Medium ersetzt. Weitere 48 Stunden später folgte die Stimulation mit t-Butylhydroperoxid (25-100 μM) für 24 Stunden und die Bestimmung der Vitalität der neuronalen Zellen mit Hilfe des MTT-Assays.

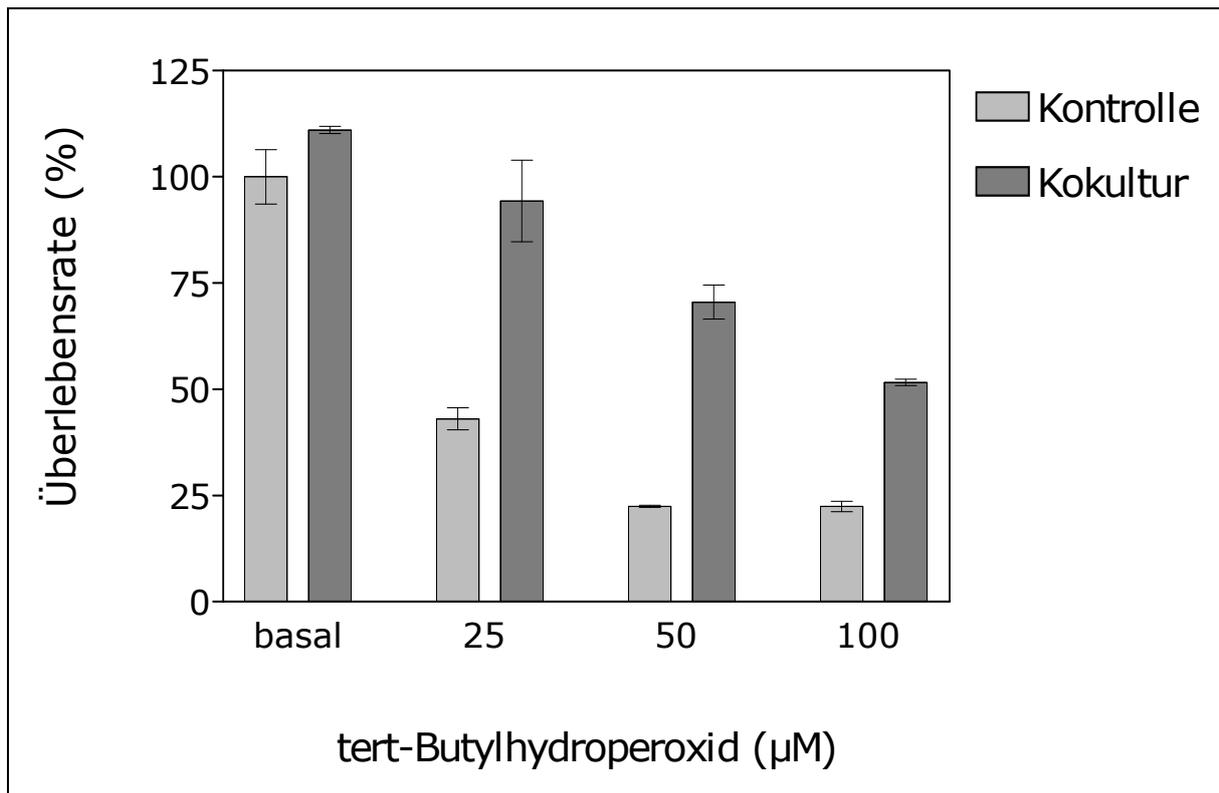


Abbildung 25: Vitalität von SH-SY5Y-Zellen im Kokultursystem mit MOG-G-CCM. Kultivierung in Serum-freien Medium allein (Kontrolle) oder in Kokultur mit Astrozytoma-Zellen (MOG-G-CCM) für 48 Stunden. Nach Stimulation mit verschiedenen t-Butylhydroperoxid-Konzentrationen (25, 50, 100 µM) für 24 Stunden wurde die Vitalität mit Hilfe des MTT-Assays vermessen. Die Vitalität ist prozentual zu den unbehandelten Kontroll-Astrozytoma (100%) berechnet. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche. basal: unbehandelte Zellen.

Abbildung 25 zeigt die konzentrationsabhängige Inhibierung der metabolischen Aktivität durch t-BHP in Selen-defizienten Neuroblastoma-Zellen, gemessen mit Hilfe des MTT-Assays. Während 25 µM t-BHP für 24 Stunden die Zellen zu 50% schädigte, führten die höheren Konzentrationen zu einer erniedrigten Zellvitalität von nur noch 25%, im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Eine Vorinkubation der SH-SY5Y-Zellen mit Astrozytoma-Zellen in den Zellkulturinserts für 48 Stunden, führte zu einer Aufhebung des zytotoxischen Effekts von t-BHP.

Es konnte also gezeigt werden, dass auch mit den hier verwendeten Zelllinien die Neuronen durch eine Kokultivierung mit Astrozyten besser vor oxidativem Stress geschützt sind.

Hydroperoxide können in humanen Zellen sowohl apoptotischen als auch nekrotischen Zelltod induzieren [Lorenz et al., 1998]. Durch Untersuchung verschiedener apoptotischer und nekrotischer Parameter sollte herausgefunden werden, welche Art von Zelltod eine t-BHP-Behandlung in den verwendeten Astrozytoma-Zellen induziert.

3.3.4 Die Lactatdehydrogenase als Nekrosemarker

Das Enzym Lactatdehydrogenase (LDH) ist in lebenden Zellen im Zytosol lokalisiert. Eine Freisetzung der Lactatdehydrogenase aus den Zellen wird als Parameter einer Nekrose und damit verbundener Zellmembranschädigung betrachtet. Daher wurde die LDH-Enzymaktivität in Zellkulturüberständen von Astrozytoma-Zellen photometrisch bestimmt.

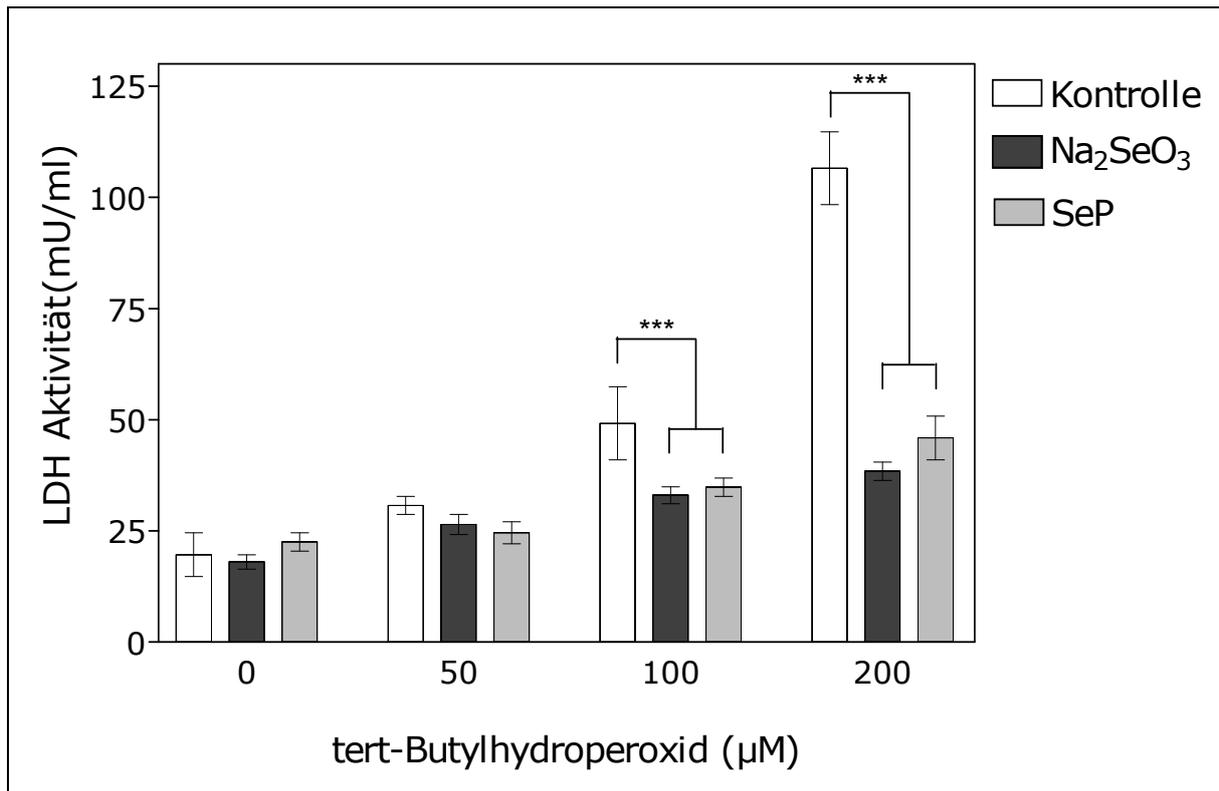


Abbildung 26: Enzymatische LDH-Aktivität von MOG-G-CCM-Zellen. In Zellkulturüberständen nach Kultivierung in Serum-freien Medium ohne (Kontrolle) und mit Vorbehandlung mit Natriumselenit (100 nM) und SeP (0.6 nM) für 48 Stunden gemessen. Nach Stimulation mit verschiedenen t-Butylhydroperoxid-Konzentrationen (50, 100, 200 µM) für 24 Stunden wurde die LDH-Aktivität vermessen. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe des Student's t-Tests bestimmt. $**P < 0.01$ $***P < 0.001$ gegen Kontrolle. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Stimulation von Astrozytoma-Zellen mit t-BHP führte zu einer konzentrationsabhängigen Freisetzung der Lactatdehydrogenase (LDH). Die LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand stieg bei Selen-defizienten, mit 200 µM t-BHP behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen um das vierfache an, was auf einen Verlust der Membranintegrität und damit einen nekrotischen Zelltod hinweist. Eine Vorinkubation mit SeP (0.6 nM) für 24 Stunden inhibierte die t-BHP induzierte LDH-Freisetzung. Natriumselenit (100 nM) wurde als Positivkontrolle verwendet [Miller et al., 2001] und zeigte einen ähnlichen Schutzeffekt wie SeP.

3.3.5 Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase als Apoptose-Marker

Neben spezifischen DNAsen werden auch bestimmte Proteasen in frühen Apoptosestadien aktiviert. Ein Zielprotein für die proteolytische Spaltung ist die (PARP), ein Reparaturenzym, das spezifisch an DNA-Strangbrüche bindet, wie sie unter anderem durch die Einwirkung der Nukleasen bei beginnender Apoptose entstehen. PARP wird durch Proteasen in zwei Bruchstücke von 89 und 24 kDa gespalten. Diese für die Apoptose spezifische Spaltung kann man mit Antikörpern gegen PARP in einem Western Blot nachweisen.

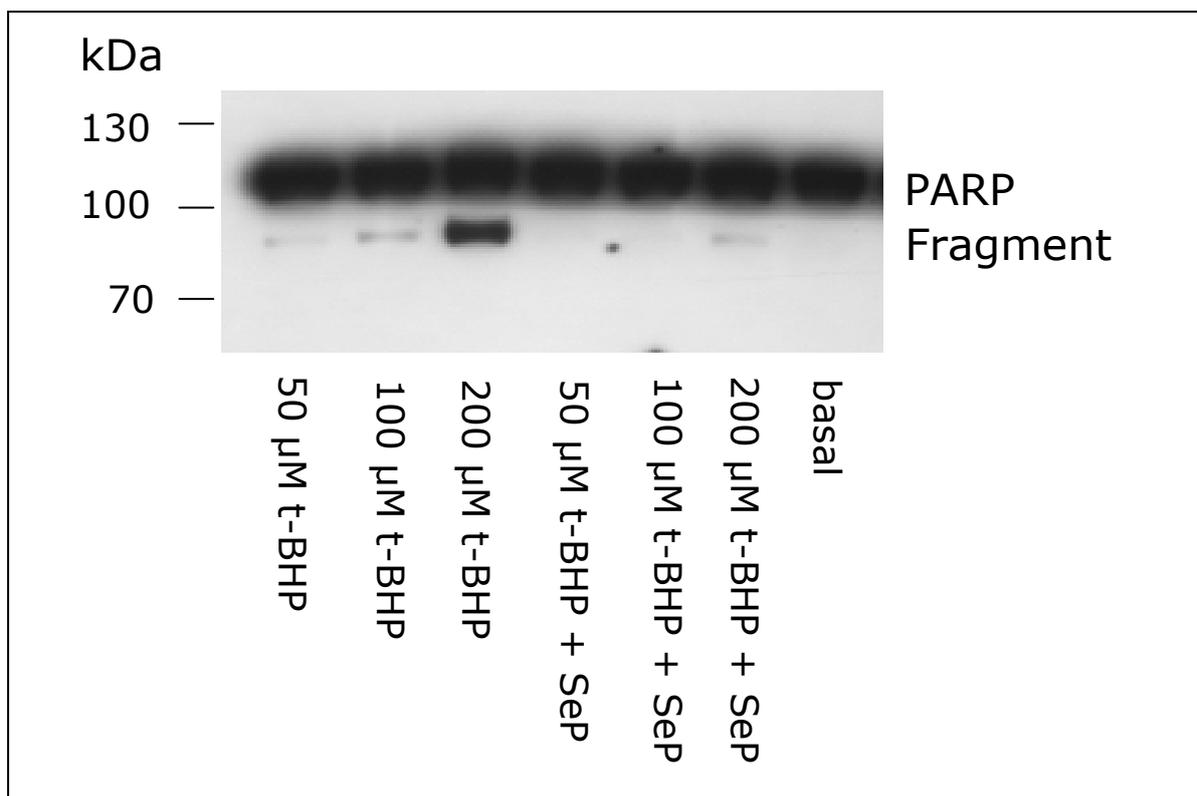


Abbildung 27: Proteolytische Spaltung von Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP). In MOG-G-CCM-Zellen in Serum-freien Medium mit und ohne Vorinkubation mit SeP (0.6 nM) für 48 Stunden wurden durch Western Blot nachgewiesen. PARP (116kDa) und das bei der proteolytischen Spaltung von PARP entstehende Proteinfragment (85kDa) wurden mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Es wurden je drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Stimulation von Astrozytoma-Zellen mit t-BHP führte zu einer konzentrationsabhängigen Spaltung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP). Eine Vorinkubation mit SeP (0.6 nM) für 24 Stunden inhibierte die t-BHP induzierte PARP-Spaltung und verhinderte somit den apoptotischen Zelltod in Astrozytoma-Zellen.

3.3.1 Caspase 3/7 Aktivitätsbestimmung

Apoptose wird von einer Kaskade von Enzymen schrittweise initiiert. Die wichtigsten dieser Enzyme sind die Caspasen. Caspasen sind Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Proteine nach der Aminosäure Aspartat schneiden (Cysteinyln-Aspartasen). Die aktivierte Caspase triggert eine zur Apoptose führende Signalkaskade. Beim Menschen sind bisher 11 verschiedene Caspasen bekannt [Degterev et al., 2003], die in Signalkaskaden angeordnet sind. Die Procaspase-9 wird proteolytisch aktiviert und freigesetzt. Sie aktiviert wiederum die Procaspasen 3, 6 und 7, die schließlich Enzyme aktivieren die Reaktionen einleiten, welche zwingend zum apoptotischen Zelltod führen.

Mit dem Caspase Glo 3/7 Assay sollte die Aktivität der Caspase 3 und 7 in den MOG-G-CCM Zellen bestimmt werden, nachdem die Zellen mit t-Butylhydroperoxid behandelt wurden.

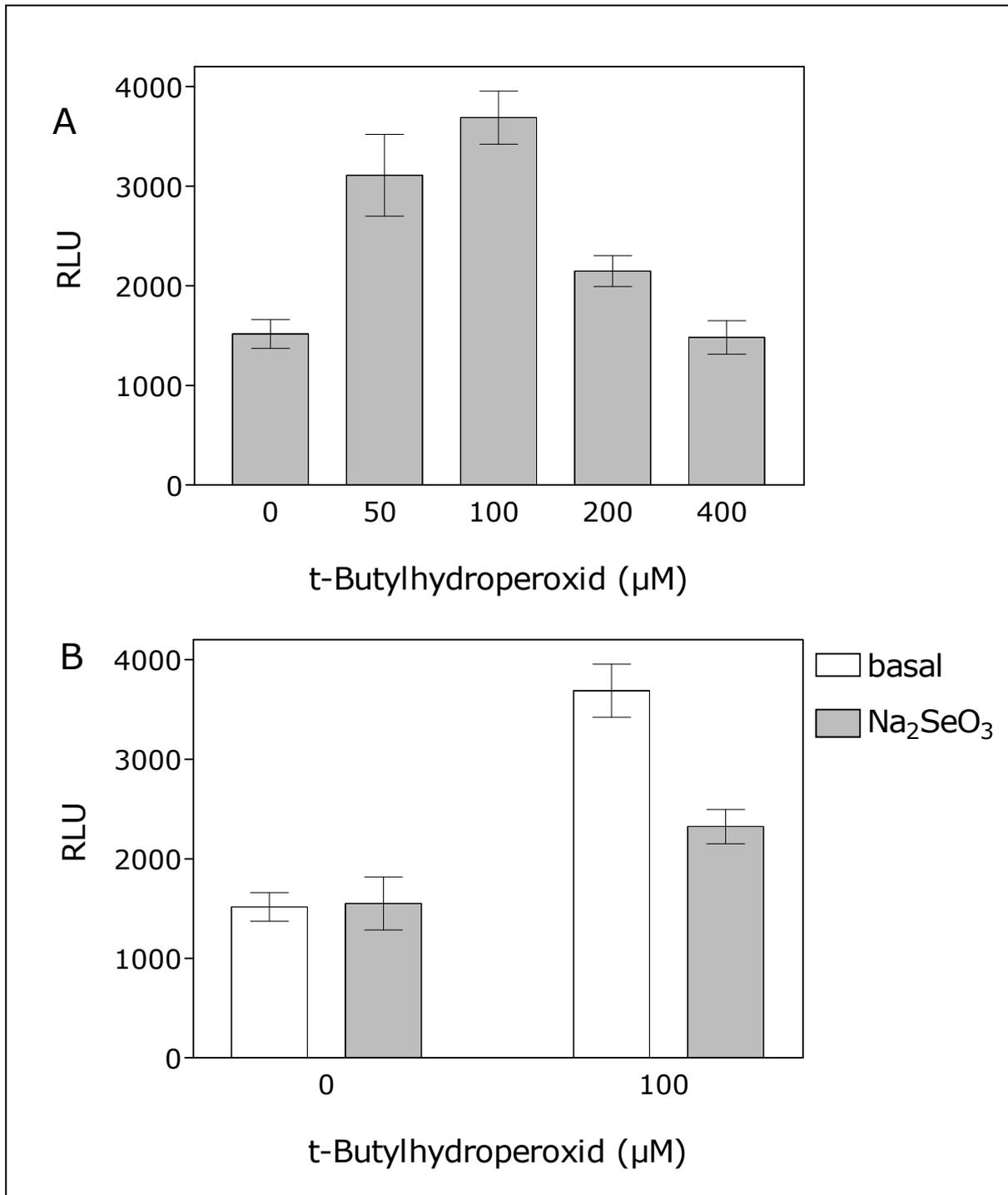


Abbildung 28: Caspase 3/7 Aktivitätsassay in MOG-G-CCM –Zellen. **A)** Stimulation mit verschiedenen t-BHP-Konzentrationen (0-400 μM) in Selen-defizienten Zellen und **B)** Stimulation mit 100 μM t-BHP nach Vorinkubation mit Natriumselenit (100 nM). Die gemessene Lumineszenz (RLU) ist proportional zur Aktivität der Caspasen 3 und 7. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche. RLU: Relative Lumineszenz Einheit.

Abbildung 28 A zeigt eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Aktivität der Caspasen 3 und 7 nach Stimulation mit 50 und 100 μM t-BHP. Die Caspase-Aktivität stieg bei Selen-defizienten, mit 100 μM t-BHP behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen um das Dreifache an, was auf einen apoptotischen Zelltod hinweist. Höhere Konzentrationen von t-BHP (200-400 μM) führten gleich zu einem nekrotischen Zelltod, d.h. es kommt nicht zu einer Erhöhung der Aktivität der Caspasen 3 und 7. Eine Vorinkubation mit Natriumselenit (100 nM) für 24 Stunden inhibierte die t-BHP (100 μM) induzierte Caspasen-Aktivierung.

Aus diesen Untersuchungen ist zu schlussfolgern, dass t-BHP in Astrozytoma-Zellen sowohl Apoptose als auch Nekrose auslösen kann.

3.4 Vermittlung der antioxidativen Schutzwirkung von SeP durch zelluläre Selenenzyme

3.4.1 Modulation des mRNA-Gehaltes verschiedener Selenenzyme nach Stimulation mit Selenverbindungen

Um zu verstehen, wie die Selenverbindungen Natriumselenit, Selenomethionin und SeP die humanen Astrozytoma-Zellen vor t-BHP induzierter Zytotoxizität schützen, wurden die mRNA-Gehalte von verschiedenen Selenenzymen untersucht.

Im folgenden Versuchsansatz wurden MOG-G-CCM-Zellen für 48 Stunden mit verschiedenen Selenverbindungen inkubiert, und anschließend der Einfluss auf die mRNA-Expression verschiedener Selenenzyme mittels RT-PCR untersucht. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle und sind hier mit basal bezeichnet. Als Ladekontrolle für die PCR diente das Haushaltsgen HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase).

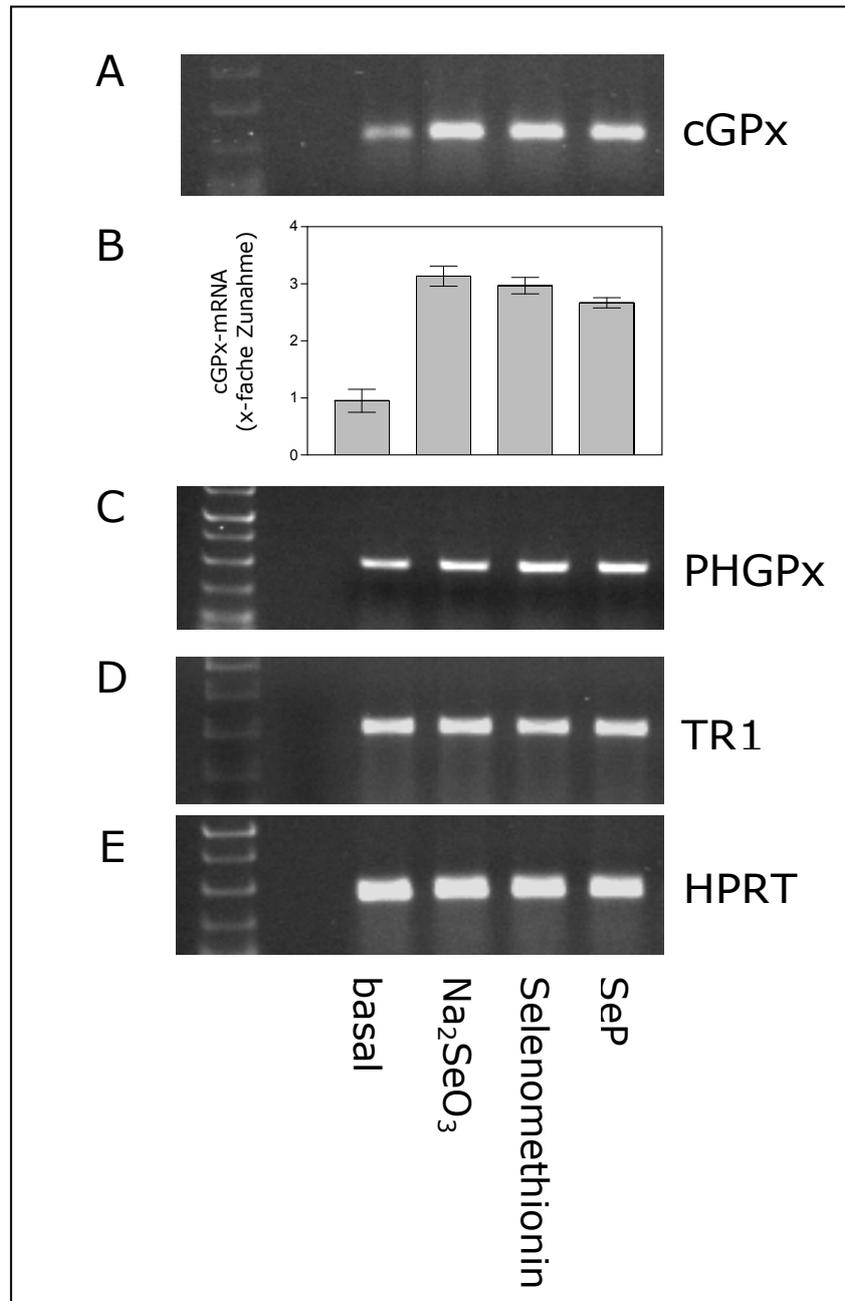


Abbildung 29: Modulation des mRNA-Gehaltes der Astrozytoma-Zellen. Die Abbildung zeigt das Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegel einer RT-PCR-Reaktion. mRNA-Gehalt von **A)** cGPx, **B)** Der cGPx-Gehalt wurde densitometrisch analysiert. **C)** PHGPx und **D)** TR1 von unbehandelten Astrozytoma-Zellen (basal) und nach Inkubation mit Natriumselenit (100 nM), Selenomethionin (10 µM) und SeP (0.6 nM) für 48 Stunden. **E)** HPRT-mRNA (Haushaltsgen) als Ladekontrolle cGPx: cytosolische Glutathionperoxidase, PHGPx: Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase, TR1: Thioredoxin-Reduktase, basal: unbehandelte Zellen. Das gezeigte Agarosegel repräsentiert eines von drei unabhängigen Experimenten.

Die Inkubation mit Natriumselenit, Selenomethionin und SeP für 48 Stunden führte zu einer Verdopplung des mRNA-Gehaltes der cytosolischen Glutathionperoxidase (cGPx) verglichen mit unbehandelten Zellen (basal).

Dagegen war die mRNA-Expression der Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase (PH-GPx) und Thioredoxin-Reduktase (TR1) konstitutiv und unabhängig von exogen zugegebenen Selenverbindungen. Der HPRT mRNA-Gehalt (Ladekontrolle) der behandelten und unbehandelten HepG2-Zellen veränderte sich nicht.

3.4.2 Selenabhängige Änderung der Expression der cytosolischen Glutathionperoxidase

Sowohl mRNA- und Protein-Expression als auch die Enzymaktivität der cGPx sind in Zellen des Menschen, der Ratte und des Rindes vom Selenstatus abhängig [Saito et al., 2003; Hill et al., 2003; Hara et al., 2001]. Nachdem ausschließlich die mRNA der cytosolischen Glutathionperoxidase nach Inkubation mit Selenverbindungen erhöht war, wurde die cGPx-Expression mittels Western Blotting untersucht.

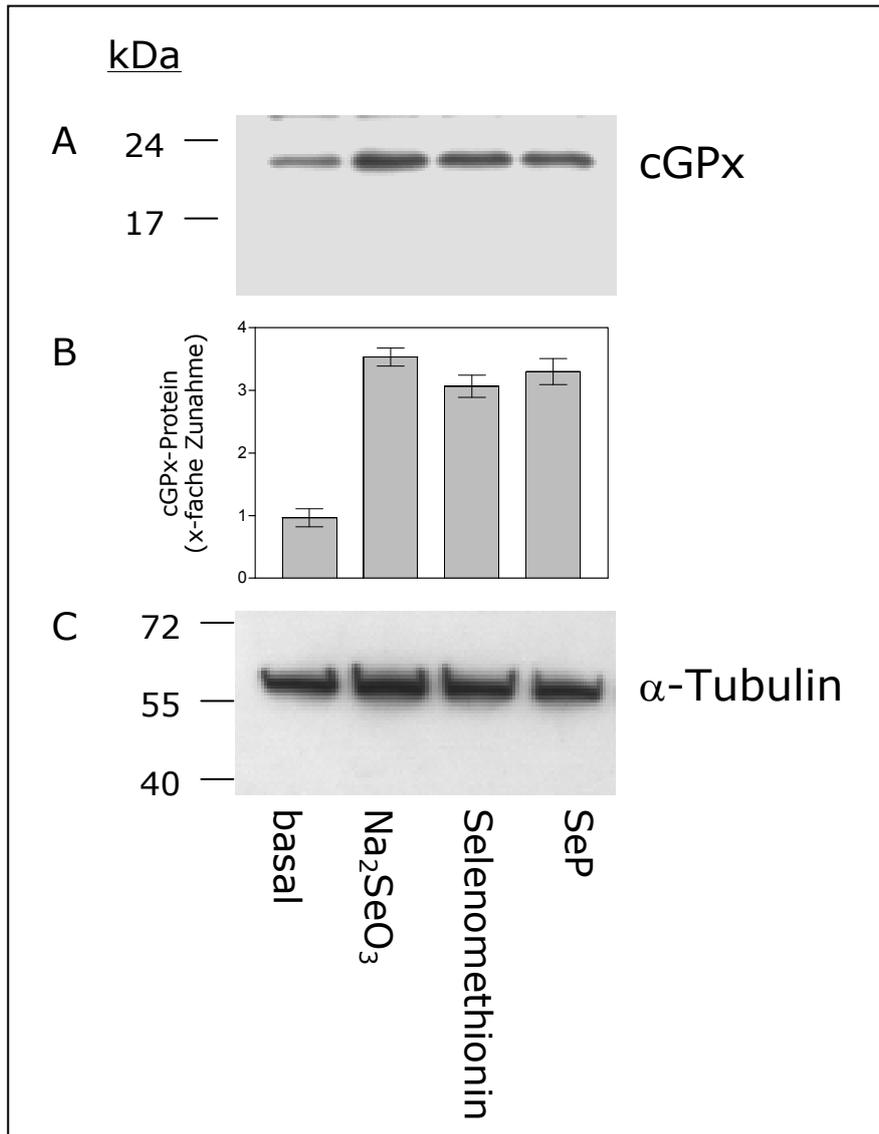


Abbildung 30: A) Stimulation der cytosolischen Glutathionperoxidase. Die 48-stündige Behandlung von humanen Astrozytoma mit Natriumselenit (100 nM), Selenomethionin (10 μ M) oder SeP (0.6 nM) im Vergleich zu unbehandelten (selendefizienten) Zellen (basal). **B)** Der cGPx-Gehalt wurde densitometrisch analysiert. **C)** α -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. Die cGPx- und α -Tubulin -Proteinexpression der Zellen wurde mittels Western Blotting detektiert. Es wurden je drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Ähnlich wie beim mRNA-Gehalt, konnte im Western Blot gezeigt werden, dass die cGPx-Proteinexpression nach Stimulation mit jeweils den verwendeten Selenverbindungen nach 48 Stunden zweifach erhöht war.

Die α -Tubulin-Expression änderte sich durch Inkubation mit den Selenverbindungen nicht.

3.4.3 Selenabhängige Änderung der Aktivität des Enzyms Glutathionperoxidase

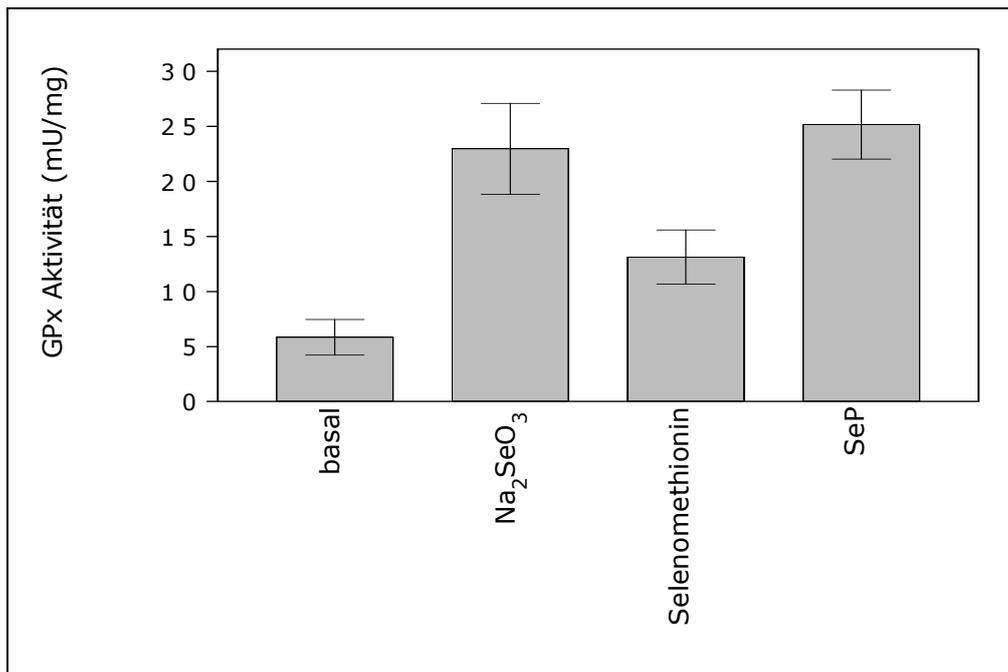


Abbildung 31: Enzymatische Aktivität der Glutathionperoxidase. In unbehandelten (basal) sowie Natriumselenit (100 nM), Selenomethionin (10 μ M) oder SeP (0.6 nM) für 48 Stunden vorinkubierten Astrozytoma-Zellen. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Alle drei eingesetzten Selenverbindungen bewirken eine Erhöhung der spezifischen enzymatischen Aktivität der Glutathionperoxidase, wobei Natriumselenit und SeP einen stärkeren Effekt hatten als Selenomethionin. Während die GPx-Aktivität durch Selenomethionin zweifach stimuliert wurde, erreichten Natriumselenit und SeP eine vierfache Erhöhung der GPx-Aktivität im Vergleich zur Selen-armen Kontrolle (basal).

Um sicherzustellen, dass der protektive Effekt von t-BHP durch die Inkubation der Astrozyten mit Selenverbindungen und die dadurch

aktivierte Glutathionperoxidase verursacht war, wurde der spezifische cGPx-Inhibitor Mercaptosuccinat [Toussaint et al., 1993] verwendet. Hierzu wurden die Astrozytoma-Zellen im Serum-freien, Selen-armen Medium mit und ohne Mercaptosuccinat (100 μ M) inkubiert. Zusätzlich wurden Astrozytoma-Zellen mit Natriumselenit und SeP vorinkubiert und in allen Ansätzen wurde mit t-BHP ein Zelltod induziert.

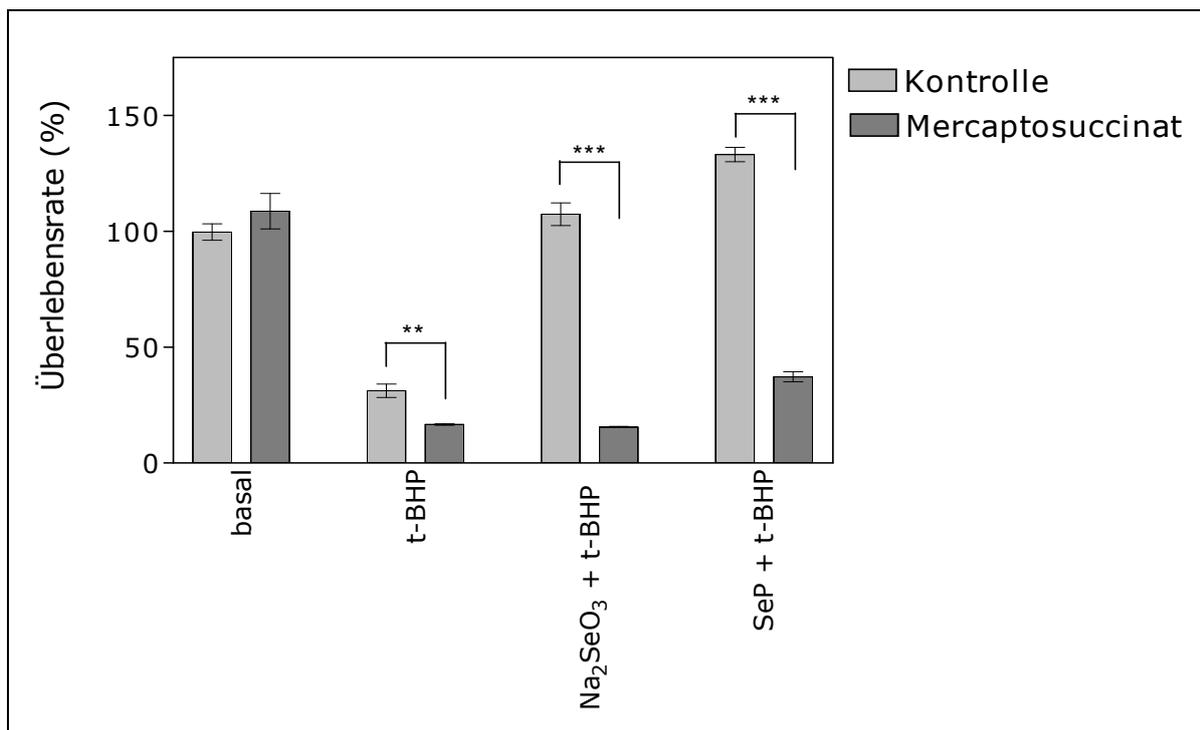


Abbildung 32: Einfluss des Inhibitors Mercaptosuccinat auf die Überlebensrate. Ein spezifischer cGPx-Inhibitor, verhindert die durch Selenverbindungen induzierte Schutzwirkung vor oxidativem Stress. Astrozytoma-Zellen wurden nach einer 48 stündigen Vorinkubation mit Natriumselenit (100 nM) und SeP (0.6 nM) zusätzlich für fünf Stunden mit Mercaptosuccinat (100 μ M) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit t-BHP (200 μ M) für 24 Stunden behandelt und mit Hilfe eines MTT-Assays vermessen. Unbehandelte Astrozytoma-Zellen wurden als 100% Vital gesetzt. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe des Student's t-Tests bestimmt. ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ gegen Kontrolle. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Sowohl in Natriumselenit- als auch in SeP- vorinkubierten Zellen, wurde deren Schutzeffekt vor t-BHP induzierte Zytotoxizität vollständig durch Mercaptosuccinat aufgehoben. Daraus lässt sich schließen, dass in

Astrozytoma-Zellen die cytosolische Glutathionperoxidase hauptsächlich für den Selen-bedingten Schutz vor oxidativem Stress verantwortlich ist [Steinbrenner et al., 2005].

3.5 Inhibition der intrazellulären SeP-Expression durch siRNA-Transfektion

Die biologische Funktion von intrazellulärem SeP in Astrozyten und anderen Zellen ist noch nicht geklärt. Aus diesem Grund, sollte nun die Expression von SeP durch Transfektion der Astrozytoma-Zellen mit einer spezifischen siRNA (small interfering RNA) inhibiert werden.

Zur Etablierung der Inhibierung des intrazellulären SeP wurden verschiedene si-RNA Konzentrationen mit verschiedenen Zeitwerten kombiniert.

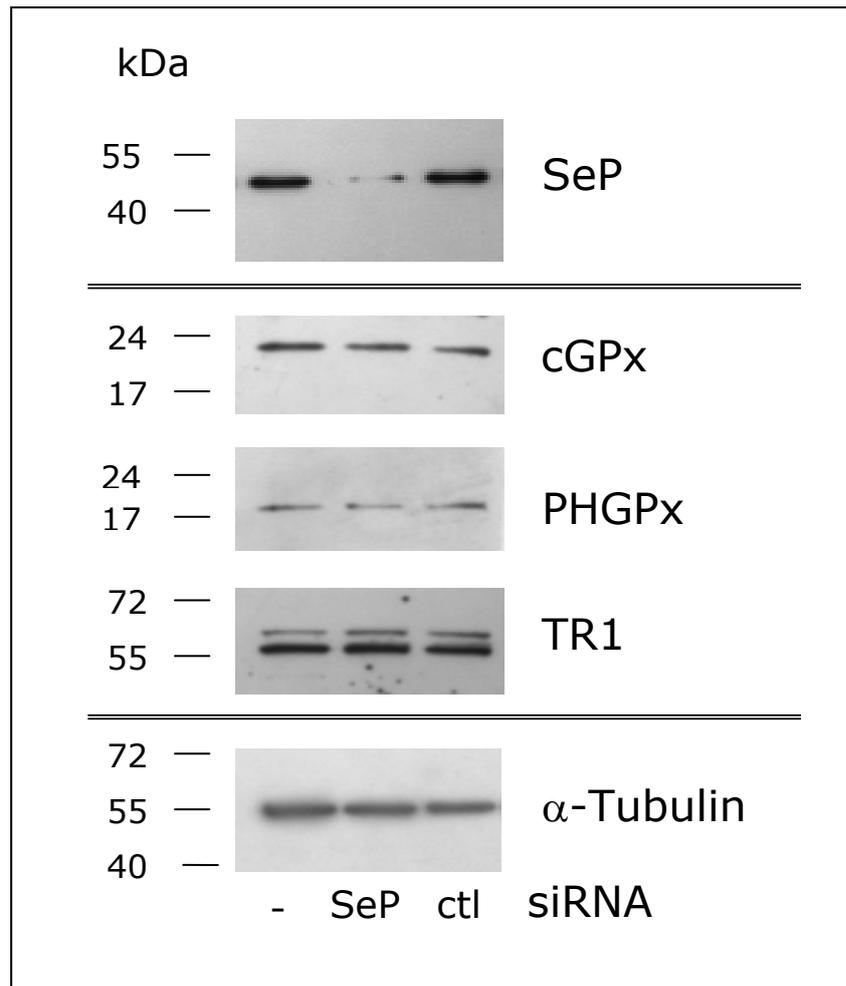


Abbildung 33: Einfluss von si-RNA auf die SeP-Expression. Spezifische Inhibierung der intrazellulären SeP-Expression durch Transfektion mit SeP-spezifischer siRNA (SeP). Als Kontrollen wurden unbehandelte Zellen (-) und transfizierte Zellen mit unspezifischer siRNA (ctl) mitgeführt. Zudem wurde die Expression der Selenenzyme cGPx, PH-GPx und TR1 untersucht. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin. Die Expression der untersuchten Proteine wurde mittels Western Blotting nachgewiesen. Es wurden je drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. cGPx: cytosolische Glutathionperoxidase, PHGPx: Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase, TR1: Thioredoxinreduktase.

Die Transfektion mit 50 pM SeP-spezifischer siRNA inhibierte die SeP-Expression nach 24 Stunden in MOG-G-CCM-Zellen um bis zu 90 %, im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen. Diese Konzentration wurde für die weiteren Experimente gewählt. In Zellen, die mit unspezifischer Kontroll-siRNA (ctl) transfiziert wurden, zeigten ebenfalls eine normale SeP-Expression. Die Expression der drei Selenenzyme cGPx,

PH-GPx und TR1 blieb unverändert, was die Spezifität der SeP siRNA beweist.

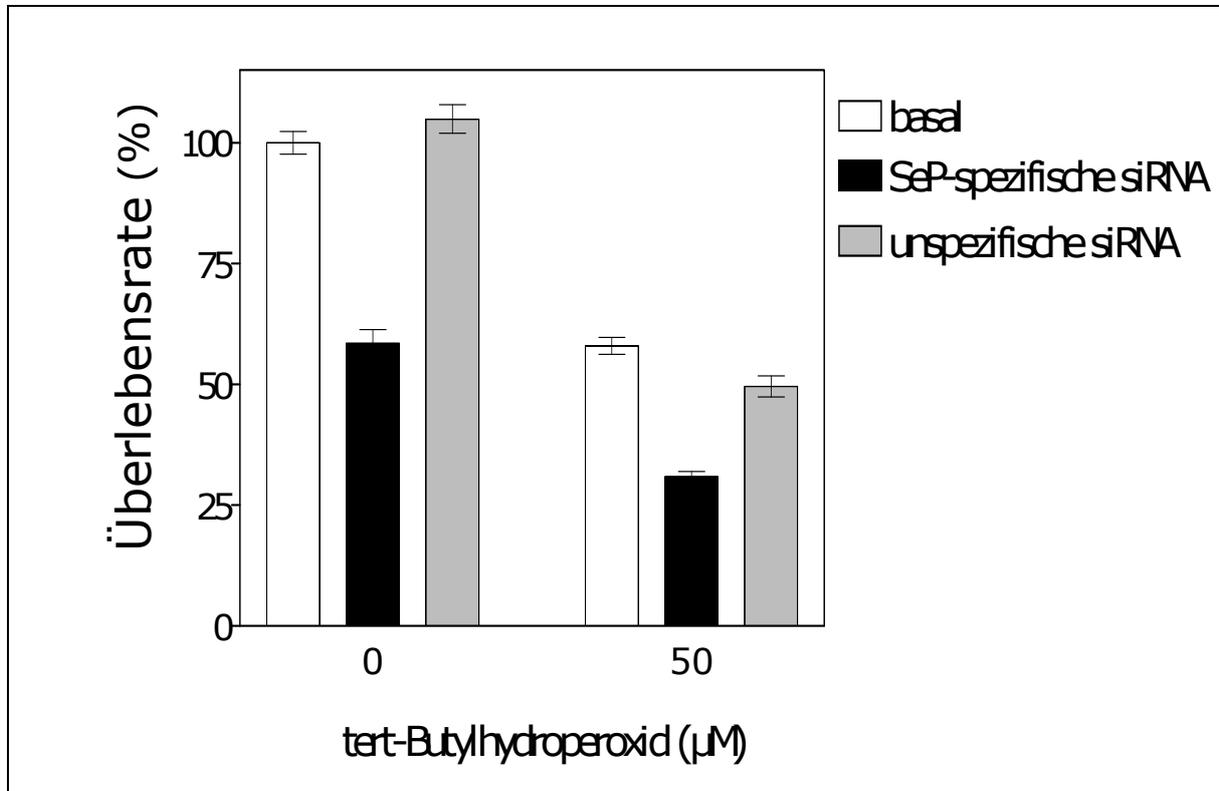


Abbildung 34: Vitalität von si-RNA behandelten Astrozytoma-Zellen. MTT-Assay von unbehandelten (basal), mit SeP-spezifischer siRNA transfizierten und mit unspezifischer siRNA transfizierten MOG-G-CCM-Zellen. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche. 0: unbehandelte, nicht transfizierte Zellen.

Die Vitalität der mit si-RNA transfizierten Astrozytoma-Zellen wurde durch einen MTT-Assay vermessen. Die Transfektion mit SeP-spezifischer siRNA führte zu einer auf ungefähr 50% verminderten Zellzahl der MOG-G-CCM-Zellen im Vergleich zu unbehandelten, nicht transfizierten Zellen (0). Währenddessen hatte die unspezifische siRNA keinen toxischen Effekt. Nach Behandlung mit t-BHP war der zytotoxische Effekt in den mit SeP-spezifischer siRNA transfizierten Zellen verstärkt.

Dies ist ein Hinweis auf eine antioxidative Wirkung von endogen exprimierten SeP in Astrozyten [Steinbrenner et al., 2005].

4 Diskussion

Vor 50 Jahren wurde Selen als essentielles Spurenelement entdeckt und stellt einen bedeutenden Faktor für die Entwicklung und die Gesundheit von höheren Säugern dar. Klinische Studien belegen die positive Wirkung einer ausreichenden Selen-Versorgung bei zahlreichen Krankheiten [Rayman 2000].

Selen ist ein Strukturbestandteil von Selenoproteinen, einer Gruppe von Selenocystein-haltigen Proteinen, deren Funktion nur teilweise bekannt ist. Einige Selenoproteine spielen jedoch eine wichtige Rolle im antioxidativen Stoffwechsel und besitzen somit eine Schutzfunktion vor ROS-induzierten Schäden. Diverse Studien konnten zeigen, dass der Se-Status entscheidend für die Funktionsfähigkeit einiger Selenoproteine ist und in Abhängigkeit von den jeweiligen Umweltbedingungen individuell stark variieren kann [Bermano et al., 1995; Thomson et al., 2004]. Über die biologische Rolle der Selenoproteine im Gehirn ist noch wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Expression von Selenoprotein P in verschiedenen Hirnzellen untersucht und eine für selenhaltige Proteine wie die cytosolische Glutathionperoxidase beschriebene antioxidative Wirkung auch für Selenoprotein P herausgearbeitet werden.

Humanes Selenoprotein P (SeP) ist ein extrazelluläres, glykosyliertes Plasmaprotein, mit zehn Selenocysteinen und sechs potentiellen Glykosylierungsstellen. Die Transkription von SeP wurde sowohl in vielen humanen und murinen Geweben als auch in vielen Zelllinien [Dreher et al., 1997] gefunden. Vor kurzer Zeit wurden durch Immunohistochemie an Zellen von Ratte und Mensch intrazelluläres SeP detektiert [Schweizer et al., 2004; Tagavilla et al., 2005].

4.1 Die humane Hepatoma-Zelllinie HepG2 als Bezugsquelle für Selenoprotein P

Der Großteil des im Plasma zirkulierenden SeP wird von der Leber produziert [Carlson et al., 2004]. Hepatoma-Zelllinien des Menschen und der Ratte sezernieren *in vitro* ebenfalls SeP [Burk et al., 1994]. Das konditionierte Medium der humanen Hepatozytenzelllinie HepG2 enthält nach der Supplementierung mit Natriumselenit Selenoprotein P [Mostert et al., 1999]. In dieser Arbeit konnte die SeP-Sezernierung von HepG2-Zellen ebenfalls gezeigt werden. Es wird als Doppelbande mit molekularen Massen von 51 und 61 kDa detektiert [Mostert et al., 1998]. Der polyklonale SeP-Antikörper, der während dieser Arbeit verwendet wurde, erkennt gleichermaßen glykosiliertes SeP in humanem Plasma [Traulsen et al., 2004] und in Kulturüberständen von Natriumselenit-behandelten HepG2-Zellen [Brenneisen et al., 2005]. Der Antikörper ist gegen ein Peptid (AS 244-258 aus humanem SeP) gerichtet [Traulsen et al., 2004; Mostert et al., 1998].

Die antioxidative Wirkung von SeP wird diskutiert [Takebe et al., 2002; Arteel et al., 1998]. Experimente mit SeP werden jedoch dadurch erschwert, dass es bisher nicht als rekombinantes Protein überexprimiert und produziert werden konnte [Tujebajeva et al., 2000]. Bisher wurde SeP daher sehr zeitaufwendig durch drei Chromatographieschritte aus humanem Plasma isoliert [Mostert et al., 1998].

In dieser Arbeit konnte SeP das erste Mal durch eine geeignete Aufreinigungsmethode, die Aufkonzentrierung der Kulturüberstände von HepG2-Zellen mittels Ultrafiltration gewonnen werden [Steinbrenner et al., 2005]. Selenoprotein P ist bei Stimulation mit Natriumselenit das einzige von HepG2 Zellen sezernierte Selenoprotein [Tujebajeva et al., 2000], was die Aufreinigung des SeP aus Kulturüberständen der HepG2 Zellen erleichterte.

4.2 SeP-Expression in verschiedenen Hirnzellen

Da Zellen des zentralen Nervensystems potentielle Zielstrukturen von SeP darstellen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von SeP in humanen primären Astrozyten, in der Astrozytoma-Zelllinie MOG-G-CCM und in der Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y untersucht.

SeP mRNA wird in vielen humanen und Ratten-Zelllinien ubiquitär exprimiert [Dreher et al., 1997]. In allen drei hier verwendeten Zelllinien konnte ebenfalls eine ubiquitäre SeP mRNA-Expression gezeigt werden. Über die Expression von intrazellulärem SeP und die möglichen Funktionen ist noch wenig bekannt. Einige Veröffentlichungen beschreiben eine immunohistochemisch gezeigte SeP-Lokalisation im humanen und Ratten-Hirn (Schweizer et al., 2004; Tagavilla et al., 2005).

Der bereits beschriebene Antikörper detektierte SeP im Zelllysat der verwendeten Hirnzellen als einzelne Bande bei 45 kDa. Das entspricht in etwa der theoretischen Molekülmasse von 41,2 kDa für das nicht-glykosilierte SeP Core Protein und der nicht-glykosilierten Form von SeP [Tujebajeva et al., 2000]. Demzufolge schließen wir daraus, dass humane primäre Astrozyten sowie die Astrozytoma- und die Neuroblastoma-Zellen SeP als nicht-glykosikiertes, intrazelluläres Protein herstellen.

Immunohistochemische Studien zeigten eine Lokalisation von Selenoprotein P an Membranen von Endothelzellen [Burk et al., 1997]. Durch die Fraktionierung des Zelllysates von MOG-G-CCM konnte in dieser Arbeit eindeutig gezeigt werden, dass SeP hauptsächlich in der Membran und demnach vermutlich im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist.

Unsere Hypothese, dass Astrozytoma-Zellen nur das nicht-glykosilierte SeP produzieren, wurde durch die Experimente zur Deglykosilierung bestätigt. Lediglich die beiden SeP Isoformen aus HepG2-Zellen wiesen nach dem Verdau mit dem Enzym N-Glykosidase-F eine geringere molekulare Masse auf, während die Molekülmasse des SeP aus dem Astrozytoma-Lysat nicht verändert war. Die weiterhin bestehende Abweichung von 2-3 kDa zwischen dem SeP der Astrozytoma-Zellen und

dem deglykosylierten full-length SeP aus Kulturüberständen von HepG2-Zellen geht möglicherweise auf die Signalsequenz zurück, welche nur abgespalten wird, wenn das Protein sezerniert wird.

Ferner konnte kein Hinweis für eine Sezernierung von SeP in den verwendeten Hirnzellen gefunden werden, sogar eine 20-fache Konzentrierung des Zellkulturüberstandes lieferte kein anderes Ergebnis. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass Astrozyten *in vitro* Wachstumsfaktoren von umgebenden Zellen wie z.B. Neuronen fehlen und deshalb keine Stimulationssignale für die Sezernierung von SeP vorhanden sind. Demnach könnte es sein, dass die *in vivo* Situation, nicht der intrazellulären Lokalisation von SeP entspricht.

Auch in humanen primären Fibroblasten, humanen epidermalen Keratinocyten und HUVEC Endothelial-Zellen wurde von uns intrazelluläres, nicht-glykosyliertes SeP detektiert (nicht publizierte Daten). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen haben Yang et al. [Yang et al., 2000] gezeigt, dass Ratten-Astrozyten SeP sezernieren. Allerdings haben sie mit Hilfe von radioaktiv markiertem ^{75}Se , Proteine mit molekularen Massen von 40 und 48 kDa in Zelllysaten von Rattenastrozyten detektiert, welches die intrazelluläre SeP-Lokalisation wiedergibt. Indes wurde eingeräumt, dass bei der Präparation der Astrozyten wahrscheinlich eine Kontamination mit anderen Zellen erfolgte. Es ist demnach zu vermuten, dass die Sekretion von SeP dadurch verursacht wurde.

Eine unzureichende Selen-Versorgung führt zu einer Erniedrigung der Konzentration von Selenoprotein P im Plasma von Ratten auf 5-10% im Vergleich zu Selen-gesättigten Tieren [Yang et al., 1989] und zu der Annahme, dass die Bildung von SeP in der Leber durch Selen gesteuert ist. Mehrere Studien bestätigen die Selen-abhängige Sezernierung von SeP in verschiedenen Leberzellen der Ratte und des Menschen [Tujebajeva et al., 2000; Brenneisen et al., 2005; Hill et al., 1996], während die Transkription von SeP in der Leber unabhängig vom Selenstatus ist [Burk et al., 2005; Burk et al., 1994]. Astrozytoma- und

Neuroblastoma-Zellen behalten eine SeP-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene und sie ist unabhängig von exogener Selengabe.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass humane primäre Astrozyten, humane Astrozytoma- und Neuroblastoma-Zellen im Gegensatz zu Leberzellen SeP als intrazelluläres, membranassoziertes und nicht glykosyliertes Protein exprimieren. Burk et al. [Burk et al., 1997] zeigten, dass SeP im Rattenhirn ausschließlich mit Endothelzellen assoziiert ist, wobei sowohl Neuronen als auch Astrozyten nicht gefärbt wurden. Extrazelluläres und intrazelluläres SeP sind unterschiedlich glykosyliert und sie nehmen deshalb an, dass ihr Antikörper lediglich das Plasma-SeP detektieren kann.

4.3 Mechanismus des Zelltodes in Astrozytoma-Zellen (MOG-G-CCM) nach Stimulation mit t-BHP

Der Zelltod besitzt eine wichtige regulatorische Funktion während Entwicklung und Erhalt des Organismus. Zellen können durch Nekrose oder Apoptose sterben. Bei der Nekrose gehen Zellen durch äußere Einflüsse z.B. durch Verbrennungen, Vergiftungen, Strahlung oder mechanischen Verletzungen zugrunde. Diese führen in größeren Bereichen des Gewebes zur Kondensation der Kernsubstanz und zum Anschwellen der Zellorganellen. Die Folge ist das Platzen der Zelle durch Schädigung der Plasmamembran. Dadurch werden Stoffe aus dem Zytoplasma freigesetzt. Im Gegensatz dazu läuft bei der Apoptose ein genetisch gesteuertes Programm ab. Es sind in der Regel nur einzelne Zellen betroffen und diese reagieren auf Signale von innen, auch wenn sich die Auslöser des Signals außerhalb der Zelle befinden. In der Anfangsphase schrumpfen Zellkern, Zytoplasma und Mitochondrien; die Zellmembran bleibt jedoch unbeschädigt. Infolge des sinkenden Zellvolumens verliert die Zelle ihren Kontakt zu den Nachbarzellen.

Hydroperoxide können in humanen Zellen sowohl apoptotischen als auch nekrotischen Zelltod induzieren [Lorenz et al., 1998]. In hier verwendeten Astrozytoma-Zellen wurden sowohl apoptotische als auch nekrotische Parameter nach Stimulation mit tert.-Butylhydroperoxid untersucht. Es wurden Anzeichen für eine t-BHP induzierte Nekrose in MOG-G-CCM-Zellen beobachtet. Die Lactatdehydrogenase-Aktivität im Kulturmedium nach Stimulation mit t-BHP für 24 Stunden war vierfach erhöht, was auf einen Verlust der Membranintegrität und damit einen nekrotischen Zelltod hindeutet. Die Apoptose-Marker Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase und die Casapase 3/7 Aktivität wurden untersucht und es konnte gezeigt werden, dass t-BHP konzentrationsabhängig sowohl Apoptose als auch Nekrose in Astrozytoma-Zellen auslösen kann.

4.4 Antioxidativer Schutz von humanen Hirnzellen gegen ROS-induzierte Zytotoxizität

Bei unzureichender Selenaufnahme kann das Gehirn, im Vergleich zu vielen anderen Geweben, Selen speichern [Prohaska et al., 1976; Behne et al., 1988]. Aus diesem Grund wird spekuliert, dass Astrozyten Selen im Gehirn, während unzureichender Selenaufnahme, durch konstitutive, intrazelluläre SeP-Expression speichern. Dieses SeP könnte direkt protektiv gegen oxidativen Stress in Zellen wirken oder als Selenquelle für andere antioxidative Selenenzyme dienen. Durch den hohen Sauerstoffverbrauch und den hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren als Substrat für die Lipidperoxidation ist das Gehirn besonders anfällig für oxidative Schädigung [Halliwell, 1992]. Viele neurodegenerative Erkrankungen (z.B. Parkinson, Alzheimer) und akute Hirnverletzungen (z.B. Schlaganfall) sind ebenfalls eine Folge der erhöhten Produktion an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [Chen et al., 2003; Simonian et al., 1996; Love, 1999]. Im Gehirn werden kontinuierlich hohe Mengen an Wasserstoffperoxiden und organischen Hydroperoxiden gebildet, die durch enzymatische Systeme effizient entgiftet werden können [Dringen et al.,

2005]. Kultivierte Ratten-Astrozyten bedürfen einer Kombination von Katalase und Glutathionperoxidase um Wasserstoffperoxid zu entgiften [Dringen et al., 2005; Dringen et al., 1997], wohingegen t-Butylhydroperoxid (t-BHP) nur durch die Glutathionperoxidase entgiftet werden kann [Dringen et al., 1998].

Daher wurde in dieser Arbeit das organische t-Butylhydroperoxid zur Stimulation von humanen Astrozytoma- und Neuroblastoma-Zellen verwendet, um den Mechanismus des Selen-vermittelten Schutzes vor oxidativer Schädigung zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass die Selenverbindungen Natriumselenit, Selenomethionin und exogen zugegebenes SeP humane Astrozytoma vor t-BHP-induzierte Zytotoxizität schützt [Steinbrenner et al., 2005], wohingegen in Neuroblastoma-Zellen lediglich Natriumselenit einen protektiven Effekt zeigte.

4.5 SeP als Selentransporter für endogene antioxidative Enzyme

Eine Supplementierung von humanen Astrozytoma-Zellen mit Selen hatte keinen Effekt auf die intrazelluläre Expression von Selenoprotein P. Also ist der direkte Einfluss von endogenem SeP auf den protektiven Effekt durch Selensupplementation nicht gegeben. Deshalb sollten die mRNA-Gehalte anderer Selenoproteine (cGPx, PH-GPx und TR-1), die zur Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beitragen, untersucht werden. Lediglich der mRNA-Gehalt der cytosolischen Glutathionperoxidase wurde durch die Inkubation mit Selen stimuliert. Abgesehen von dem mRNA-Gehalt wurde eine Erhöhung der Proteinmenge und der enzymatischen Aktivität der cGPx nach Behandlung der Astrozytoma-Zellen mit verschiedenen Selenverbindungen gemessen. Alle hier untersuchten Selenverbindungen hatten auf die Stimulation der cGPx-Expression und im Schutz gegen t-BHP-induzierten oxidativen Stress in humanen Astrozytoma-Zellen den gleichen Effekt [Steinbrenner et al.,

2005]. Humane Astrozytoma-Zellen sind somit in der Lage, Selen unabhängig von der Selenverbindung zu nutzen. Diese Erkenntnis bestätigt zwei Studien mit SeP-Knock-out Mäusen, bei denen Selen auch in Abwesenheit des physiologischen SeP-Transporters kontinuierlich vom Gehirn aufgenommen werden [Hill et al., 2003; Schweizer et al., 2005]. Es ist bekannt, dass sowohl die Expression als auch die Aktivität der cGPx in Zellen des Menschen, der Ratte und des Rindes vom Selenstatus abhängig sind [Saito et al., 2003; Hill et al., 1992; Hara et al., 2001]. Dies stimmt mit dem niedrigen Stand in der Hierarchie der Selenoproteine überein [Brigelius-Flohé et al., 2002; Brigelius-Flohé, 1999]. Die cGPx verliert unter Selen-defizienten Bedingungen schnell an Aktivität, Protein- und mRNA-Expression, wobei die Aktivität und Expression nach Selensupplementation zurückgewonnen wird.

Mercaptosuccinat, ein spezifischer Inhibitor der cGPx [Toussaint et al., 1993], hebt die Wirkung des t-BHP in Ratten-Astrozyten konzentrationsabhängig vollständig auf [Dringen et al., 1998]. Ob der selenbedingte protektive Effekt in humanen Astrozytoma-Zellen gegen t-BHP durch die Aktivität und Expression der cGPx gegeben ist, sollte durch Inkubation mit Mercaptosuccinat überprüft werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass diese durch Selenverbindungen induzierte Schutzwirkung in humanen Astrozyten verhindert wird, was mit den Ergebnissen an Ratten-Astrozyten übereinstimmt [Toussaint et al., 1993].

Zusätzlich zu den bereits bekannten enzymatisch wirkenden Antioxidantien, wie die Glutathionperoxidase und Thioredoxin-Reduktase [Brigelius-Flohé, 1999; Kyriakopoulos et al., 2002], existieren einige noch nicht näher charakterisierte Selenoproteine, z.B. Selenoprotein W oder Selenoprotein S. Diese könnten ebenfalls einen Beitrag zur Regulation von intrazellulären ROS und dem Schutz vor oxidativem Stress in humanen Zellen leisten [Gao et al., 2004; Jeong et al., 2002], und sollte in naher Zukunft herausgearbeitet werden.

4.6 Selenoprotein P als intrazelluläres Antioxidans

Einige Studien deuten auf eine direkte antioxidative Wirkung von SeP *in vitro* und *in vivo* an [Burk et al., 1995; Takebe et al., 2002; Arteel et al., 1998; Traulsen et al., 2004]. Weiterhin konnten Maehara und Mitarbeiter kürzlich zeigen, dass humane Pankreastumor-Zellen empfindlicher gegenüber dem ROS induzierenden Chemotherapeutikum Gemcitabine waren, wenn die SeP-Expression durch Vorbehandlung mit dem Zytokin Interferon- γ unterdrückt wurde [Maehara et al., 2004]. Zudem wurde kürzlich gezeigt, dass Myofibroblasten intrazellulär Selenoprotein P exprimieren und durch Abbau von Lipidhydroperoxiden die Zellen vor oxidativem Stress schützen [Kabuyama et al., 2007].

In der vorliegenden Arbeit wurde die SeP-Expression durch die Transfektion mit SeP-spezifischer siRNA inhibiert. Dadurch war es möglich herauszuarbeiten, welche Auswirkung die Inhibierung des intrazellulären SeP auf die Astrozytoma-Zellen haben, wobei die Selenenzyme cGPx, PH-GPx und TR1 in ihrer Expression unverändert blieben.

Die Inhibierung der SeP-Expression führte zu einer basalen Zytotoxizität in humanen Astrozytoma-Zellen. Darüberhinaus waren selendefiziente Astrozytoma-Zellen mit inhibierter SeP-Expression empfindlicher gegen t-BHP-induzierten oxidativen Stress, im Vergleich zu Nicht- bzw. Kontrolltransfizierten Zellen. In dieser Arbeit konnte das erste Mal gezeigt werden, dass Selenoprotein P in selendefizienten Zellen (erniedrigter cGPx-Aktivität) einen direkten Einfluss auf den Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies besitzt [Steinbrenner et al., 2005].

SeP erfüllt die nötigen Voraussetzungen für diese Funktion, da der N-Terminus ein Selenocystein enthält, welches *in vitro* enzymatische Aktivität besitzt, während die neun Selenocysteine im C-Terminus für den Selentransport zu Zielzellen verantwortlich zu sein scheinen [Saito et al., 2004].

5 Perspektiven

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Astrozyten Selenoprotein P als intrazelluläres, membranassoziertes und nicht-glykosyliertes Protein exprimieren. Die Funktion von endogenem SeP im Gehirn sowie die Faktoren, die seine Expression und Sekretion beeinflussen, sind derzeit noch unklar:

I) Es stellt sich nun die Frage, ob Neuronen durch parakrine Faktoren (z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokine) die Astrozyten zur Sekretion von SeP stimulieren können.

II) Astrozyten schützen benachbarte Neuronen [Drukarch et al., 1998] vor oxidativem Stress, was in der hier vorliegenden Arbeit bestätigt wurde. Ein weiterer Schritt wäre nun herauszuarbeiten, welche löslichen Faktoren für diese extrazelluläre Kommunikation verantwortlich sind.

III) Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine physiologische Funktion von endogenem SeP als antioxidatives Enzym hin, gleichzeitig wirkt exogen zugegebenes SeP durch Induktion der cGPx schützend. Nachdem nun der Rezeptor für SeP identifiziert scheint [Olson et al., 2007], ergibt sich die Frage nach dem Mechanismus der Aufnahme von SeP in die Zielzellen.

IV) Es werden viele Funktionen für SeP im Gehirn diskutiert [Schweizer et al., 2004; Richardson et al., 2005], welche Aufgabe es tatsächlich übernimmt, ist in weiteren Studien zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Selenoprotein P (SeP) ist ein glykosyliertes Plasmaprotein. Neben der Funktion als Selen-Transport-Protein, wird eine antioxidative Wirkung für SeP angenommen. Astrozyten können reaktive Sauerstoffspezies im Gehirn unschädlich machen und werden als potentielle Zielzellen für Selenoprotein P beschrieben.

Es wurde in der hier vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt, dass primäre Astrozyten, die humane Astrozytoma-Zelllinie MOG-G-CCM und die Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y im Gegensatz zu Leberzellen Selenoprotein P als intrazelluläres, membranassoziiertes und nichtglykosyliertes Protein exprimieren, dessen Biosynthese auch bei Selendefizienz nicht inhibiert war.

Außerdem schützt SeP Hirnzellen vor oxidativem Stress, der durch tert-Butylhydroperoxid induziert wird. Die Inkubation von Astrozyten mit angereichertem SeP aus Hepatozyten ahmt den protektiven Effekt von niedermolekularen Selenverbindungen, wie z.B. Natriumselenit und Selenomethionin, vor oxidativem Stress durch tert-Butylhydroperoxid nach. Supplementation von Astrozyten mit Selenverbindungen bewirkt eine Steigerung der Expression und Aktivität des Selenenzym cytosolische Glutathionperoxidase (cGPx) und damit eine Schutzfunktion vor oxidativem Schaden. Mit Hilfe einer spezifischen siRNA wurde die SeP Expression signifikant vermindert, was in humanen Astrozyten zu einer erniedrigten metabolischen Aktivität und zu einer stärkeren Zytotoxizität von t-BHP führt. Das deutet auf eine mögliche physiologische Funktion von endogenem SeP als antioxidatives Enzym hin.

Diese Ergebnisse ergeben eine Schutzwirkung von Selenoprotein P in Selen-defizienten Astrozyten, sobald eine ausreichende Selenversorgung gegeben ist, wird der Schutz vor oxidativem Stress durch die cytosolische Glutathionperoxidase gewährleistet.

7 Summary

Selenoprotein P (SeP) is a highly glycosylated, selenium-rich plasmaprotein. Aside from its role as selenium carrier protein, an antioxidative function of SeP has been suggested. Astrocytes, detoxifying reactive oxygen species in the brain, were described to be potential target cells for SeP. We investigated the expression of SeP in human astrocytes and its involvement in the protection of these cells against tert-butylhydroperoxide (*t*-BHP)-induced oxidative damage. We show that primary human astrocytes as well as the human astrocytoma cell line MOG-G-CCM and the neuroblastoma cell line SH-SY5Y express SeP as an unglycosylated protein, which is not secreted. SeP expression in astrocytes and neurons is constitutive and independent of exogenous selenium supply. Pre-incubation of astrocytes with hepatocyte-derived SeP mimicks the protective effect of low-molecular weight selenocompounds, such as sodium selenite and selenomethionine, against oxidative damage shielding astrocytes from *t*-BHP-induced cytotoxicity. Selenium supplementation of astrocytes counteracts oxidative stress via an increase in expression and activity of the selenoenzyme cytosolic glutathione peroxidase (cGPx). Furthermore, specific downregulation of SeP expression by siRNA decreases cell viability of human astrocytes and makes them more susceptible to *t*-BHP-induced cytotoxicity. This results implicate an antioxidant activity of constitutively expressed SeP in selenium-deficient astrocytes, while during adequate selenium supply the enhanced protection against oxidative stress is exerted by cGPx.

8 Literatur

Abe K, Saito H (1998)

Characterization of t-butyl hydroperoxide toxicity in cultured rat cortical neurones and astrocytes

Pharmacol. Toxicol. 83: 40-46

Akesson B, Bellew T, Burk RF (1994)

Purification of selenoprotein P from human plasma

Biochim. Biophys. Acta. 1204: 243-249

Arteel GE, Mostert V, Oubrahim H, Briviba K, Abel J, Sies H (1998)

Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration

Biol. Chem. 379: 1201-1205

Arteel GE, Franken S, Kappler J, Sies H (2000)

Binding of selenoprotein P to heparin: characterization with surface plasmon resonance

Biol. Chem. 381: 265-268

Arteel GE, Sies H (2001)

The biochemistry of selenium and the glutathione system

Environmental Toxicology and Pharmacology 10: 153-158

Axley MJ, Stadtman TC (1989)

Selenium metabolism and selenium-dependent enzymes in microorganisms

Annu. Rev. Nutr. 9: 127-137

Bähr K, Dreher I, Köhrle J (1999)

Selenium supplementation by selenium yeast and sodium selenite: analysis of the selenium status as well as risk of deficiency and intoxication

J. Lab. Med. 23: 594-599

Bayraktutan U, Draper N, Lang D, Shah AM (1998)

Expression of functional neutrophil-type NADPH oxidase in cultured rat coronary expressed in bovine pulmonary artery smooth muscle cells

Cardiovasc. Res. 38: 256-262

Beck MA, Levander OA, Handy J (2003)

Selenium deficiency and viral infection

J. Nutr. 133: 1463S-1467S

Behne D, Hilmert H, Scheid S, Gessner H, Elger W (1988)

Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins

Biochim. Biophys. Acta. 966: 12-21

Behne D, Weiler H, Kyriakopoulos A (1996)

Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats

J. Reprod. Fertil. 106: 291-297

Behne D, Kyriakopoulos A (2001)

Mammalian selenium-containing proteins

Annu. Rev. Nutr. 21: 453-473

Bermano G, Nicol F, Dyer JA, Sunde RA, Beckett GJ, Arthur JR, Hesketh JE (1995)

Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats

Biochem J. 311 (Pt 2):425-30

Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C (2007)

Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis

JAMA. 297: 842-857

Böck A, Forchhammer K, Heider J, Baron C (1991)

Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code

TIB 16: 463-467

Brenneisen P, Sies H, Scharfetter-Kochanek K (2002)

Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases

Ann. N.Y. Acad. Sci. 973: 31-43

Brenneisen P, Steinbrenner H, Sies H (2005)

Selenium, oxidative stress, and health aspects

Mol. Aspects Med. 26: 256-267

Brigelius-Flohé R (1999)

Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases

Free Radic. Biol. Med. 27: 951-965

Brigelius-Flohé R, Wingler K, Müller C (2002)

Estimation of individual types of glutathione peroxidases

Methods Enzymol. 347: 101-112

Burk RF, Hill KE, Read R, Bellew T (1991)

Response of rat selenoprotein P to selenium administration and fate of its selenium

Am. J. Physiol. 261: E26-30

Burk RF, Hill KE (1994)

Selenoprotein P. A selenium-rich extracellular glycoprotein. Review. *J Nutr. Oct.* 124 (10):1891-1897

Burk RF, Hill KE, Awad JA, Morrow JD, Kato T, Cockell KA, Lyons PR (1995)

Pathogenesis of diquat-induced liver necrosis in selenium-deficient rats: assessment of the roles of lipid peroxidation and selenoprotein

P. Hepatology. 21:561-569

Burk RF, Hill KE, Boeglin ME, Ebner FF, Chittum HS (1997)

Selenoprotein P associates with endothelial cells in rat tissues

Histochem. Cell. Biol. 108: 11-15

Burk RF, Hill KE, Motley AK (2001)

Plasma selenium in specific and non-specific forms

Biofactors. 14:107-114

Burk RF, Hill KE (2005)

Selenoprotein P An Extracellular Protein with Unique Physical Characteristics and a Role in Selenium Homeostasis

Annu. Rev. Nutr. 25: 215-235

Carlson BA, Novoselov SV, Kumaraswamy E, Lee BJ, Anver MR, Gladyshev VN, Hatfield DL (2004)

Specific excision of the selenocysteine tRNA[Ser]Sec (Trsp) gene in mouse liver demonstrates an essential role of selenoproteins in liver function

J. Biol. Chem. 279: 8011-8017

Chambers I, Frampton J, Goldfarb P, Affara N, Mc Bain W, Harrison PR (1986)

The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoding by the termination codon, TGA

EMBO J. 5 (6): 1221-1227

Chavatte L, Brown BA, Driscoll DM (2005)

Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes

Nat. Struct. Mol. Biol. 12: 408-416

Chen J, Berry MJ (2003)

Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases
J. Neurochem. 86: 1–12

Combs GF, Combs SB (1986)

The Role of Selenium in Nutrition
Academic Press, New York/London: 532ff

Copeland PR, Fletcher JE, Carlson BA, Hatfield DL, Driscoll DM (2000)

A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs
EMBO J. 19: 306-314

Degterev A, Boyce M, Yuan J (2003)

A decade of caspases
Oncogene. 22(53): 8543-67. Review

Deitmer JW (2000)

Glial strategy for metabolic shuttling and neuronal function
BioEssay 22: 747–752

Desagher S, Glowinski J, Premont J (1996)

Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity
J Neurosci. 16(8): 2553-62

Deutsche Gesellschaft für Ernährung (2000)

Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. www.dge.de

Diamond A, Dudock B, Hatfield D (1981)

Structure and properties of a bovine liver UGA suppressor serine tRNA with a tryptophan anticodon
Cell 25: 497–506

Dong Y, Benveniste EN (2001)

Immune function of astrocytes
Glia 36: 180–190

Dreher I, Schmutzler C, Jakob F, Köhrle J (1997)

Expression of selenoproteins in various rat and human tissues and cell lines
J. Trace. Elem. Med. Biol. 11: 83-91

Dringen R, Hamprecht B (1997)

Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells
Brain Res. 759: 67–75

Dringen R, Kussmaul L, Hamprecht B (1998)

Rapid clearance of tertiary butylhydroperoxide by cultured astroglial cells via oxidation of glutathione
Glia 23:139–145

Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J (2005)

Peroxide detoxification by brain cells
J. Neurosci. Res. 79: 157–165

Drukarch B, Schepens E, Stoof JC, Langeveld CH, van Muiswinkel FL (1998)

Astrocyte-enhanced neuronal survival is mediated by scavenging of extracellular reactive oxygen species
Free. Radic. Biol. Med. 25: 217-220

Fehrenbach E, Northoff H (2001)

Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins
Exerc Immunol Rev. 7: 66-89 Review

Foster LH, Sumar S (1997)

Selenium in Health and Disease
Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 37: 211-228 Review

Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A, Ikehara Y (1988)

Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum
J. Biol. Chem. 263: 18545-18552

Flohé L, Guntzler WA, Schock HH (1973)

Glutathione peroxidase: a selenoenzyme
FEBS Lett. 32: 132–134

Ganther HE, Lawrence JR (1997)

Chemical Transformations of Selenium in Living Organisms. Improved Forms of Selenium for Cancer prevention
Tetrahedron 53 (36): 12299-12310

Ganther HE (1999)

Selenium metabolism, selenoproteins and mechanism of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase
Carcinogenesis 49 (4): 1657-1666

Gao Y, Feng HC, Walder K, Bolton K, Sunderland T, Bishara N, Quick M, Kantham L, Collier GR (2004)

Regulation of the selenoprotein SelS by glucose deprivation and endoplasmic reticulum stress-SelS is a novel glucose-regulated protein
FEBS Lett. 563: 185–190

Ge K, Xue A, Bai J, Wang S (1983)

Keshan disease-an endemic cardiomyopathy in China
Virchows Arch. 401: 1–15

Gimsa U, Oren A, Pandiyan P, Teichmann D, Bechmann R, Brunner-Weinzierl MC (2004)

Astrocytes protect the CNS: antigen-specific T helper cell responses are inhibited by astrocyte-induced upregulation of CTLA-4 (CD152)
J. Mol. Med. 82: 364–372

Gramm HJ, Kopf A, Brätter P (1995)

The necessity of selenium substitution in total parenteral nutrition and artificial alimentation
J. Trace Elem. Med. Biol. 9: 1–12

Green LM, Reade JL, Ware CF (1984)

Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines
J. Immunol. Methods 70: 257–268

Grömer S, Schirmer RH, Becker K (1999)

News and views on thioredoxin reductases
Redox Rep. 4:221-228

Halliwell B (1992)

Reactive oxygen species and the central nervous system
J. Neurochem. 59: 1609–1623

Halliwell B (2006)

Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?
J. Neurochem. 97: 1634–58

Hara S, Shoji Y, Sakurai A, Yuasa K, Himeno S, Imura N (2001)

Effects of selenium deficiency on expression of selenoproteins in bovine arterial endothelial cells
Biol. Pharm. Bull. 24: 754–759

Hawkes WC, Lyons DE, Tappel AL (1982)

Identification of a selenocysteine-specific aminoacyl transfer RNA from rat liver
Biochim. Biophys. Acta 699: 183–191

Herrman JL (1977)

The properties of a rat serum protein labelled by the injection of sodium selenite
Biochim. Biophys. Acta. 500: 61-70

Hill KE,, Lloyd RS, Yang JG, Read R, Burk RF (1991)

The cDNA for rat selenoprotein P contains 10 TGA codons in the open reading frame

J. Biol. Chem. 266 (16): 10050– 10053

Hill KE, Lyons PR, Burk RF (1992)

Differential regulation of rat liver selenoprotein mRNAs in selenium deficiency

Biochem. Biophys. Res. Commun. 185: 260–263

Hill KE, Lloyd RS, Burk RF (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 KE, Chittum HS, Lyons PR, Boeglin ME, Burk RF (1996)

Effect of selenium on selenoprotein P expression in cultured liver cells

Biochim. Biophys. Acta. 1313: 29–34

Hill KE, Zhou J, McMahan WJ, Motley AK, Atkins JF, Gesteland RF, Burk RF (2003)

Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse

J. Biol. Chem. 278: 13640-13646

Hill KE, Zhou J, McMahan WJ, Motley AK, Burk RF (2004)

Neurological dysfunction occurs in mice with targeted deletion of the selenoprotein P gene

J. Nutr. 134: 157-161

Himeno S, Chittum HS, Burk RF (1996)

Isoforms of selenoprotein P in rat plasma. Evidence for a full-length form and another form that terminates at the second UGA in the open reading frame

J. Biol. Chem. 271: 15769-15775

Hiran TS, Moulton PJ, Hancock JT (1997)

Detection of superoxide and NADPH oxidase in porcine articular chondrocytes

Free. Radic. Biol. Med. 23: 736-743

Holben DH, Smith AM (1999)

The diverse role of selenium within selenoproteins

J. Am. Diet. Assoc. 99: 836-843 Review

Holleman AF, Wiberg E, Wiberg N (1995)

Lehrbuch der anorganischen Chemie 100. Auflage. Walter de Gruyter, Berlin - New York: 613-662

Hondal RJ, Ma S, Caprioli RM, Hill KE, Burk RF (2001)

Heparin-binding histidine and lysine residues of rat selenoprotein P
J. Biol. Chem. 276: 15823-15831

Ip C (1998)

Lessons from basic research in selenium and cancer prevention
J. Nutr. 128: 1845-1854

Jackson AL, Loeb LA (1998)

The mutation rate and cancer
Genetics 148 (4): 1483-90 Review

Jeong D, Kim DS, Chung YW, Lee BJ, Kim IY (2002)

SelenoproteinW is a glutathione-dependent antioxidant in vivo
FEBS Lett. 517: 225-228

Jones SA, Wood JD, Coffey MJ Jones OT (1994)

The functional expression of p47-phox and p67-phox may contribute to the generation of superoxide by an NADPH oxidase-like system in human fibroblasts
FEBS Lett. 355: 178-182

Kabuyama Y, Oshima K, Kitamura T, Homma M, Yamaki J, Munakata M, Homma Y (2007)

Involvement of selenoprotein P in the regulation of redox balance and myofibroblast viability in idiopathic pulmonary fibrosis
Genes Cells. 12(11):1235-44

Kawakubo K, Iida M, Matsumoto T, Mochizuki Y, Doi K, Aoyagi K, Fujishima M (1994)

Progressive encephalopathy in a Crohn's disease patient on long-term total parenteral nutrition: possible relationship to selenium deficiency
Postgrad Med J. 70: 215-219

Kettenmann H (1999)

Physiology of glial cells
Advances in Neurology 79: 565-571

Kim H, Jhoo W., Shin E, and Bing G (2000)

Selenium deficiency potentiates methamphetamine-induced nigral neural loss, comparison with MPTP model
Brain res. 862, 247-252

Köhrle J (2005)

Selenium and the control of thyroid hormone metabolism
Thyroid. 15:841-853

Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, Gladyshev VN (2003)

Characterization of mammalian selenoproteomes.
Science 300 : 1439–1443

Kyriakopoulos A, Behne D (2002)

Selenium-containing proteins in mammals and other forms of life
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 145: 1–46

Lee BJ, Rajagopalan M, Kim YS, You KH, Jackobsom KB, Hatfield D (1990)

Selenocysteine tRNA sersec gene is ubiquitous within the animal kingdom
Molecular and cellular biology 10 (5): 1940–1949

Levander OA (1987)

A global view of human selenium nutrition
Ann. Rev. Nutr. 7: 227–250

Loeb KR, Loeb LA (2000)

Significance of multiple mutations in cancer
Carcinogenesis 21 (3):379-85 Review

Lorenz B, Schlüter T, Bohnensack R, Pergande G, Müller WE (1998)

Effect of flupirtine on cell death of human umbilical vein endothelial cells induced by reactive oxygen species
Biochem. Pharmacol. 56:1615-1624

Love S (1999)

Oxidative stress in brain ischemia
Brain Pathol. 9: 119–131

Maehara S, Tanaka S, Shimada M, Shirabe K, Saito Y, Takahashi K, Maehara Y (2004)

Selenoprotein P, as a predictor for evaluating gemcitabine resistance in human pancreatic cancer cells
Int. J. Cancer 112: 184–189

Merrill JE, Benveniste EN (1996)

Cytokines in inflammatory brain lesion: helpful and harmful
Trends Neurosci. 19: 331–338

Miller S, Walker SW, Arthur JR, Nicol F, Pickard K, Lewin MH, Howie AF, Beckett GJ (2001)

Selenite protects human endothelial cells from oxidative damage and induces thioredoxin reductase
Clin. Sci. 100: 543-550

Moreno-Reyes R, Suetens C, Mathieu F, Begaux F, Zhu D, Rivera MT, Boelart M, Néve J, Perlmutter N, Vanderpas J (1998)

Kashin-Beck osteoarthropathy in rural Tibet in relation to selenium and iodine status

New England J. Med. 339: 1112-1120

Mostert V, Lombeck I, Abel J (1998)

A novel method for the purification of selenoprotein P from human plasma

Arch. Biochem. Biophys. 357: 326-330

Mostert V, Dreher I, Köhrle J, Abel J (1999)

Transforming growth factor-beta1 inhibits expression of selenoprotein P in cultured human liver cells

FEBS Lett. 460: 23-26

Motsenbocker MA, Tappel AL (1982)

A selenocysteine-containing selenium-transport protein in rat plasma

Biochim. Biophys. Acta. 719:1447-1453

Ogasawara Y, Lacourciere G, Stadtmann TC (2001)

Formation of a selenium-substituted rhodanese by reaction with selenite and glutathione: Possible role of a protein perselenide in a selenium delivery system

Proc. Natl. Acad. Sci. 98 (17): 9494-9498

Oldfield JE (1999/2002)

Selenium world atlas. Selenium-Tellur Development Association (STDA) Grimbergen, Belgien

Olson GE, Winfrey VP, Nagdas SK, Hill KE, Burk RF (2007)

Apolipoprotein E Receptor-2 (ApoER2) Mediates Selenium Uptake from Selenoprotein P by the Mouse Testis

J. Biol. Chem. 282: 12290-12297

Oster O, Schmiedel G, Prellwitz W (1988)

Correlations of blood selenium with hematological parameters in West German adults

Biological Trace Element Research 15: 47-81

Oster O, Prellwitz W (1989)

The daily dietary selenium intake of West German Adults

Biol. Trace Elem. Res. 20: 1-14

Oster O (1992)

Zum Selenstatus in der Bundesrepublik Deutschland. Universitätsverlag, Jena

Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK (2007)

From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health

Antioxid. Redox. Signal 9: 775-806

Pfriegeer FW, Barres BA (1996)

New views on synapse-glia interactions

Curr. Opin. Neurobiol. 6: 615-621

Racher A (1998)

LDH Assay. Cell and tissue culture: Laboratory procedures in biotechnology. Chichester, New York, Weinheim: John Wiley & Sons; 71-75

Ramaekers VT, Calomme M, Vanden Berghe D, Makropoulos W (1994)

Selenium deficiency triggering intractable seizures

Neuropediatrics. 25: 217-223

Ramsby ML, Makowski GS, Khairallah EA (1994)

Differential detergent fractionation of isolated hepatocytes: biochemical, immunochemical and two-dimensional gel electrophoresis characterization of cytoskeletal and noncytoskeletal compartments

Electrophoresis. 15:265-277

Rayman MP (2000)

The importance of selenium to human health

Lancet. 356(9225):233-41

Read R, Bellew T, Yang JG, Hill KE, Palmer IS, Burk RF (1990)

Selenium and amino acid composition of selenoprotein P, the major selenoprotein in rat serum

J. Biol. Chem. 265: 17899-17905

Reilly C (1996)

Selenium in Food and Health

Blackie Academic & Professional; London

Richardson DR (2005)

More roles for selenoprotein P: local selenium storage and recycling protein in the brain

Biochem. J. 386: e5-7

Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafemann DG, Hoekstra WG (1973)

Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase

Science 179: 588-590

Saijoh K, Saito N, Lee MJ, Fujii M, Sumino K (1995)

Molecular cloning of DNA encoding a bovine selenoprotein P-like protein containing 12 selenocysteines and a (his-pro) rich domain insertion, and its regional expression

Mol. Brain Res. 30: 301–311

Saito Y, Yoshida Y, Akazawa T, Takahashi K, Niki E (2003)

Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants

J. Biol. Chem. 278: 39428–39434

Saito Y, Sato N, Hirashima M, Takebe G, Nagasawa S, Takahashi K (2004)

Domain structure of bi-functional selenoprotein P

Biochem. J. 381: 841–846

Salganik RI (2001)

The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population

J Am Coll Nutr. 20 (5 Suppl): 464S-475S Review

Schomburg L, Schweizer U, Holtmann B, Flohé L, Sendtner M, Köhrle J. (2003)

Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues

Biochem. J. 370:397-402

Schrauzer GN (2000)

Anticarcinogenic effects of selenium

Cell. Mol. Life Sci. 57: 1864-1873

Schrauzer GN, Rhead WJ (1971)

Interpretation of the methylene blue reduction test of human plasma and the possible cancer protecting effect of selenium

Experientia 27: 1069-1071

Schwarz K, Foltz CM (1957)

Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver Degeneration

J. Am. Chem. Soc. 79: 3292-3293

Schweizer U, Bräuer AU, Köhrle J, Nitsch R, Savaskan NE (2004)

Selenium and brain function: a poorly recognized liaison

Brain. Res. Rev. 45: 164-178

Schweizer U, Streckfuss F, Pelt P, Carlson BA, Hatfield DL, Köhrle J, Schomburg L (2005)

Hepatically derived selenoprotein P is a key factor for kidney but not for brain selenium supply

Biochem. J. 386: 221–226

Shamberger RJ, Frost DV (1969)

Possible inhibitory effect of selenium on human cancer

CMAJ 100: 682

Sheehan TM, Gao M (1990)

Simplified fluorometric assay of total selenium in plasma and urine

Clin. Chem. 36: 2124-2126

Siegal GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD (1999)

Basic Neurochemistry. 6nd Edition. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia

Sies H, Cadenas E (1985)

Oxidative stress: damage to intact cells and organs

Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 311: 617-631

Sies H (1986)

Biochemistry of oxidative stress

Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 25: 1058-1071

Sies H (1991)

Oxidative stress: from basic research to clinical application

Am. J. Med. 91: 31S-38S

Sies H (1997)

Oxidative Stress: oxidants and antioxidants

Exp. Physiol. 82: 291-295

Simonian NA, Coyle JT (1996)

Oxidative stress in neurodegenerative diseases

Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36: 83–106

Stadtman TC (1996)

Selenocysteine

Annu. Rev. Biochem. 65: 83-100

Steinbrenner H, Alili L, Bilgic E, Sies H, Brenneisen P (2006)

Involvement of selenoprotein P in protection of human astrocytes from oxidative damage

Free Rad Biol Med. 40(9):1513-23

Steinbrenner H, Alili L, Sies H, Brenneisen P (2006)

Selenoprotein P a link between liver and brain. Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism
Springer Science 134-40

Tagavilla MA, Li PA (2005)

Hyperglycemic ischemia increases the production of superoxide free radicals and decreases the level of antioxidative selenoprotein P
Eth. Dis. 15: S4-60-1

Takebe G, Yarimizu J, Saito Y, Hayashi T, Nakamura H, Yodoi J, Nagasawa S, Takahashi KA (2002)

Comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein
P. J. Biol. Chem. 277: 41254-41258

Thanbichler M, Böck A (2001)

Selen: Biologie eines Spurenelements; Einsichten – Forschung an der LMU München

Thisse C, Degrave A, Kryukov GV, Gladyshev VN, Obrecht- Pflumio S, Krol A, Thisse B, Lescure A (2003)

Spatial and temporal expression pattern of selenoprotein genes during embryogenesis in zebrafish
Gene Expression Patterns 3: 525- 532

Thomson CD (2004)

Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review
Eur J Clin Nutr. 58(3):391-402

Toussaint O, Houbion A, Remacle J (1993)

Relationship between the critical level of oxidative stresses and the glutathione peroxidase activity
Toxicology 81: 89-101

Traulsen H, Steinbrenner H, Buchczyk DP, Klotz LO, Sies H (2004)

Selenoprotein P protects low-density lipoprotein against oxidation
Free Radic. Res. 38: 123-128

Tsacopoulos M, Magisstretti PJ (1996)

Metabolic coupling between glia and neurons
J. Neurosci. 16 (3): 877-885

Tujebajeva RM, Copeland PR, Xu X, Carlson BA, Harney IW, Driscoll DM, Hatfield DL, and Berry MJ (2000)

Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion
EMBO J. 1: 158-163

Tujebajeva RM, Harney JW, Berry MJ (2000)

Selenoprotein P expression, purification, and immunochemical characterization

J. Biol. Chem. 275: 6288–6294

Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA (2001)

Control of synapse number by glia

Science 291: 657–660

Vendeland SC, Butler JA, Whanger PD (1992)

Intestinal absorption of selenite, selenate, and selenomethionine in the rat

J. Nutr. Biochem. 3: 359–365

Wilson DS, Tappel AL (1993)

Binding of plasma selenoprotein P to cell membranes

J. Inorg. Biochem. 51: 707–714

Whanger PD, Beilstein MA, Thomson CD, Robinson MF, Howe M (1988)

Blood selenium and glutathione peroxidase activity of populations in New Zealand, Oregon, and South Dakota

FASEB J. 2(14):2996-3002

Whanger PD, Butler JA (1988)

Effects of various dietary levels of selenium as selenite or selenomethionine on tissue selenium levels and glutathione peroxidase activity in rats

J Nutr. 118(7):846-52

Yan J, Barrett JN (1998)

Purification from bovine serum of a survival-promoting factor for cultured central neurons and its identification as selenoprotein-P

J. Neurosci. 18: 8682-8691

Yang JG, Hill KE, Burk RF (1989)

Dietary selenium intake controls rat plasma selenoprotein P concentration

J. Nutr. 119:1010–1012

Yang C, Niu C, Bodo M, Gabriel E, Notbohm H, Wolf E, Muller PK (1993)

Fulvic acid supplementation and selenium deficiency disturb the structural integrity of mouse skeletal tissue. An animal model to study the molecular defects of Kashin-Beck disease

Biochem. J. 289:829-835

Yang X, Hill KE, Maguire MJ, Burk RF (2000)

Synthesis and secretion of selenoprotein P by cultured rat astrocytes

Biochim. Biophys. Acta 1474: 390–396

Yoneda S, Suzuki KT (1997)

Equimolar Hg-Se complex binds to selenoprotein P
Biochem. Biophys. Res. Commun. 231: 7-11

Xu XM, Mix H, Carlson BA, et al. (2005)

Evidence for direct roles of two additional factors, SECp43 and soluble liver antigen, in the selenoprotein synthesis machinery
J. Biol. Chem. 280: 41568-41575

Zafar KS, Siddiqui A, Sayeed I, Ahmad M, Salim S, Islam F (2003)

Dose-dependent protective effect of selenium in rat model of Parkinson's disease: neurobehavioral and neurochemical evidences
J Neurochem. 84: 438-446

Publikationen

Jörgens S, **Alili L**, Mewis A. The PrPS4 type structure and a filled variant: The compounds TbPS4 and LiEuPS4. Zeitschrift für Naturforschung Section B-A Journal of chemical sciences 2005 Juli; 60(7):705-8

Steinbrenner H, **Alili L**, Bilgic E, Sies H, Brenneisen P. Involvement of selenoprotein P in protection of human astrocytes from oxidative damage. Free Rad Biol Med. 2006 Mai 1; 40(9):1513-23

Steinbrenner H, **Alili L**, Sies H, Brenneisen P. Selenoprotein P: a link between liver and brain. Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism. Springer Science 2006; 134-40

Cat B, Stuhlmann D, Steinbrenner H, **Alili L**, Holtkotter O, Sies H, Brenneisen P. Enhancement of tumor invasion depends on transdifferentiation of skin fibroblasts mediated by reactive oxygen species. Journal of cell science 2006 Juli 1; 119(13): 2727-38

Steinbrenner H, Bilgic E, **Alili L**, Sies H, Brenneisen P. Selenoprotein P protects endothelial cells from oxidative damage by stimulation of glutathione peroxidase expression and activity. Free radical research 2006 September; 40(9): 936-43

Steinbrenner H, **Alili L**, Stuhlmann D, Sies H, Brenneisen P. Posttranslational processing of selenoprotein P: implications of glycosylation for its utilisation by target cells. Biol Chem. 2007 Oktober; 388: 1043-1051

Werth C, Stuhlmann D, Cat B, Steinbrenner H, **Alili L**, Sies H, Brenneisen P.

Stromal resistance of fibroblasts against oxidative damage: Involvement of tumor cell-secreted platelet derived growth factor (PDGF) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) activation. Carcinogenesis 2007 Dezember; akzeptiert

Konferenzen und Posterbeiträge

GBM Herbsttagung 18.-21. September 2005

Berlin-Potsdam

Protective function of Selenoprotein P in human astrocytes

57. Mosbacher Kolloquium 06.-08. April 2006

„Redox Signaling: Mechanisms and Biological Impact“

Mosbach

Selenoprotein P protects human astrocytes from oxidative cell death

8th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine 25.-30. Juli 2006

Madison (Wisconsin/USA)

Protection from Oxidative Stress by Selenoprotein P

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Peter Brenneisen für die interessante Themenstellung und die fachliche Betreuung. Außerdem möchte ich mich bei ihm für die wissenschaftlichen Diskussionen und das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Herrn Universitätsprofessor Dr. Christian Ganter danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Universitätsprofessor Dr. Dr. Helmut Sies danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes in seinem Institut und die bereitgestellten finanziellen Mittel.

Herrn Dr. Holger Steinbrenner danke ich für sein stetes Bemühen um fachliche Beratungen und konstruktive Gespräche.

Za Dr. Dragana Mitic: hvala za sve i lepo da smo se upoznali.

Bei den derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern des Instituts möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, interessante Diskussionen und Geduld bei Laborfragen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt den allerbesten Kollegen Dr. Bahar Cat und Dr. Dominik Stuhlmann für die nette Atmosphäre, die schöne Zeit und zahlreiche Hilfestellungen. Ihr habt mir weit mehr auf meinen zukünftigen Weg gegeben, als nur Ratschläge und Tipps zum wissenschaftlichen Arbeiten! Dankeschön.

Claudia Wyrich danke ich für die Hilfestellung in jeder Laborfrage, ihrer Hilfsbereitschaft und die netten Gespräche und Aufheiterungen.

Außerdem möchte ich den lieben Mediziner-Mädels für die nette und oftmals lustige Zeit (nicht nur) im Labor danken.

Dr. Claudia von Monfort und Dr. Niloofar Ale-Agha danke ich herzlichst für ihre Freundschaft und Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen und die nette Zeit, die wir zusammen verbracht haben.

Bei Yasemin Ince und Anna Eckers bedanke ich mich für die freundschaftlichen Diskussionen und die kleinen praktischen Hilfestellungen (Süßigkeiten).

Marlies Scholtes danke ich für die Unterstützung in allen organisatorischen Fragen.

Allen Freunden und Kollegen, die hier nicht namentlich erwähnt sind, danke ich für das freundschaftliche Verhältnis, die gute Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Ingo, für seine Liebe, seine Unterstützung und sein Vertrauen.

Den größten Dank schulde ich meiner Familie! Meinen Eltern, Iset, Leonora, Laura und allen voran meinen Schwestern Merita und Drita. Sie haben meine Launen gleichmütig ertragen, mir sehr viel Kraft gegeben und mich unermüdlich motiviert. DANKE!!!

Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 19.11.2007

(Lirija Alili)

