

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. K. Wilms

**Nachweis der Expression von Selenoprotein P
im menschlichen Gastrointestinaltrakt**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Christoph Braig

aus Pentling

Würzburg, November 2004

Referent: Prof. Dr. rer. nat. J. Köhrle

Koreferent: Prof. Dr. med. W. Scheppach

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 20.01.2005

Der Promovend ist Arzt.

*Meinen Eltern
und
Sonja*

Inhaltsverzeichnis

AbkürzungenIV	
1 Einleitung	1
1.1 Selen: Vorkommen und Versorgung	1
1.2 Selenmetabolismus	1
1.3 Wirkung von Selen	2
1.3.1 Überversorgung	2
1.3.2 Selenmangel	3
1.3.3 Rolle von Selen in der Karzinogenese	4
1.4 Molekularbiologie von Selenoprotein P	6
1.4.1 Genlocus	6
1.4.2 Einflüsse auf den SeP-Promotor	6
1.4.3 Selenocystein-Insertion	7
1.4.3.1 Selenocystein-Insertions-Sequenz (SECIS)	8
1.4.3.2 SECIS-bindendes Protein 2 (SBP2)	12
1.4.3.3 Selenocysteyl-tRNA-spezifischer Translations-Elongationsfaktor (eEF _{Sec})	13
1.4.3.4 Selenocysteyl-spezifische tRNA (tRNA ^{Sec})	13
1.4.3.5 Selenophosphat-Synthetase, Selenocystein-Synthase	14
1.4.3.6 Interaktionen zwischen den einzelnen Translationselementen	14
1.4.3.7 Weitere Einflüsse auf die Translation	15
1.4.3.8 Proteineigenschaften	16
1.5 Bisher bekannte Funktionen von Selenoproteinen	20
1.5.1 Glutathion-Peroxidase-Familie (GPX)	20
1.5.1.1 Cytosolische oder klassische GPX (cGPX)	20
1.5.1.2 Plasma oder extracelluläre GPX (pGPX oder eGPX)	20
1.5.1.3 Phospholipid-Hydroperoxid-GPX (PH-GPX)	20
1.5.1.4 Gastrointestinale GPX (GI-GPX)	21
1.5.2 Dejodase-Familie (5'-DI Typ I-II, 5-DI Typ III)	21
1.5.3 Thioredoxinreduktase (TRR)	21
1.5.4 Selenophosphat-Synthetase	21
1.5.5 Biologische Funktionen von Selenoprotein P	22
1.5.6 SeP in der Karzinogenese	25
2 Aufgabenstellung	27
3 Material und Methoden	28
3.1 Reagenzien und Apparaturen	28
3.2 Prinzip des Western Blots	29

3.3 Probenaufbereitung	30
3.3.1 Proben	30
3.3.2 Methoden der Probenaufbereitung	33
3.3.2.1 Grundlagen	33
3.3.2.2 Durchführung	34
3.3.2.2.1 Probenaufbereitung mit Potterhomogenisator	34
3.3.2.2.2 Probenaufbereitung mit Dismembrator	35
3.3.2.2.3 Probenaufbereitung mit Ultraschall	35
3.3.3 Weitere Probenaufbereitungen	35
3.3.3.1 Zentrifugenfilter Centricon 100	35
3.3.3.2 Heparin-Agarose-Säule	36
3.4 Proteinbestimmung	37
3.4.1 Grundlagen	37
3.4.2 Durchführung	38
3.5 Elektrophorese	38
3.5.1 Grundlagen	38
3.5.1.1 Wanderung von geladenen Molekülen im elektrischen Feld	38
3.5.1.2 Besonderheiten der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
3.5.2 Durchführung	42
3.5.2.1 Gelherstellung	43
3.5.2.2 Probenvorbereitung für die SDS-PAGE	44
3.5.2.2.1 Grundlagen	44
3.5.2.2.2 Durchführung	45
3.5.2.3 Elektrophorese	47
3.6 Elektroblob	48
3.6.1 Grundlagen	48
3.6.2 Durchführung	51
3.7 Färbungen	51
3.7.1 Membranfärbung mit Ponceau S	52
3.7.2 Gelfärbung mit Coomassie-Blau	52
3.7.3 Gelfärbung mit BioRad Silver Stain	53
3.8 Immunchemische Detektion mit Antikörpern	54
3.8.1 Grundlagen	54
3.8.2 Durchführung	57
3.8.2.1 Blockieren der Membran	57
3.8.2.2 Inkubation mit Antikörpern und Waschen der Membran	57
3.8.2.2.1 Antikörper- und Waschlösungen	57
3.8.2.2.2 Inkubation mit dem ersten Antikörper, erstes Waschen	58
3.8.2.2.3 Inkubation mit zweitem Antikörper, zweites Waschen	60
3.8.2.2.4 Amersham-Methode mit RIPA-Puffer	60

3.9 Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Reaktion	61
3.9.1 Grundlagen	61
3.9.2 Durchführung	62
3.10 Erstellung der densitometrischen Messergebnisse	63
3.11 Optimierter Versuchsablauf	64
4 Resultate	65
4.1 Herstellung der Proben zur Elektrophorese	65
4.2 Proteinbestimmung	65
4.3 Elektrophorese	65
4.4 Elektroblob	68
4.5 Färbungen	68
4.6 Antigen-Antikörper-Reaktion	70
4.7 ECL-Reaktion	71
4.8 Reduktion der Hintergrundsignale	71
4.9 Auswertung der densitometrischen Messergebnisse	72
4.9.1 Auswertung des Mukosastandards	73
4.9.2 Auswertung der Proben	74
4.9.2.1 Auswertung der Proben „mit Selensubstitution“ versus „ohne Selensubstitution“	74
4.9.2.2 Auswertung der Probenpaare von Rektumschleimhaut und Polypen	75
5 Diskussion	78
6 Zusammenfassung	85
Literaturverzeichnis	86

Abkürzungen:

AA	Acrylamid
AE	Aktivator-Element
AP1	Aktivator Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
DI	Dejodase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EDV	elektronische Datenverarbeitung
eEF _{Sec}	Selenocysteyl-tRNA-spezifischer Translations-Elongationsfaktor
Fab	antigenbindendes Fragment
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
GAS	Interferon γ -gesteuertes Element
GPX (p, c, GI, PH)	Glutathion Peroxidase (p = plasmatische, c = cytosolische, GI = gastrointestinale, PH = Phospholipid Hydroperoxid)
HCl	Salzsäure
HepG2	hepatocelluläre Karzinomzelllinie G2
HNPCC	humanes nicht-polypöses Kolonkarzinom
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon γ
KCl	Kaliumchlorid
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LIDS	Lithiumdodecylsulfat
MAC	Mercaptoessigsäure

mRNA	Boten-RNA
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NMD	Nonsense-mediated Decay
Nonidet P 40	Octylphenol-Ethylenoxid-Kondensat
Nt	Nukleotid
P	Polyp
P_{α} , P_{β}	Konformationskoeffizienten für Aminosäuren in Proteinen [α -Helix (P_{α}), β -Faltblatt und β -Schleife (P_{β})]
p53	Tumorsuppressorgen p53
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Lösung
PSE	proximales Sequenz-Element
R	Rektum
RIPA	Radio-Immuno-Protection-Assay
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
rp2	Kaninchenantikörper gegen das antigene Peptid P2
SBE	Smad-bindendes Element
SBP	SECIS-bindendes Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SeC	Selenocystein
SECIS	Selenocystein-Insertions-Sequenz
SELB	prokaryontischer Translationsfaktor
SeP	Selenoprotein P
Smad	sma- und mad-verwandtes Protein
SP1	promoterspezifischer Transkriptionsfaktor
Staf	Selenocystein-tRNA ^{Sec} -aktivierender Faktor
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	Tumorwachstumsfaktor β

TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	Polyethylenglycol-mono-[p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl]-ether
tRNA	Transfer-RNA
tRNA ^{Sec} , tRNA ^{Ser}	Selenocysteyl-tRNA, Seryl-tRNA
TRR	Thioredoxinreduktase
Tween	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
UTR	untranslatierte Region
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Selen: Vorkommen und Versorgung

Das Element Selen wurde 1817 von Berzelius entdeckt. Seine Wichtigkeit als essentielles Spurenelement wurde 1957 erkannt [1], seine zentrale Rolle im Enzym Glutathionperoxidase (GPX), dem ersten identifizierten Selenoprotein, 1973 entdeckt [2]. Die Aufnahme über die Nahrungskette ist weltweit großen Schwankungen unterworfen. So ist die Versorgung mit Selen in Venezuela, Japan und weiten Teilen Nordamerikas hoch, in Mittel- und Nordeuropa jedoch aufgrund der Auswaschung der Böden während und nach den Eiszeiten niedrig [3]. In vulkanischen Gebieten ist der Selengehalt der Böden ebenfalls relativ niedrig. Saurer Boden und Komplexbildung verringern zusätzlich die Aufnahme von Selen in Pflanzen [4]. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt eine tägliche Selenaufnahme von 30-70 µg [5]. In Deutschland liegt die durchschnittliche tägliche Selenaufnahme von Männern bei 47 µg Selen, von Frauen bei 38 µg Selen. Menschen nehmen Selen hauptsächlich in Form von Selenomethionin und Selenocystein über tierisches Eiweiß (Fleisch, Fisch, Eier) und Getreide auf [3,6]. Selen wird in verschiedenen Verbindungen im menschlichen Körper vor allem im ZNS, den endokrinen Organen und Reproduktionsorganen, besonders in den männlichen, akkumuliert [7], wobei die Schilddrüse von allen untersuchten Geweben den höchsten Gehalt an Selen aufweist [8].

1.2 Selenmetabolismus

Selen wird zum einen für den Einbau in Selenoproteine, d.h. selenocysteinhaltige Proteine, zum anderen für das Generieren niedermolekularer Selenmetaboliten durch den Selen-Intermediärstoffwechsel verwendet. Durch Tierversuche konnten zahlreiche Reaktionen des Selenstoffwechsels aufgezeigt werden [9].

Anorganische Selensalze wie Natriumselenit (Na_2SeO_3) und -selenat (Na_2SeO_4) unterliegen einer Thiol- oder NADPH-abhängigen Reduktion zu Selenwasserstoff (H_2Se), einem sehr toxischen Metaboliten. Von diesem aus erfolgt entweder über die Synthese von Selenophosphat zum weiteren Aufbau von Selenocystein an der spezifischen tRNA^{Sec} der spezifische Einbau in Selenoproteine oder die Methylierung zu weniger

toxischen Metaboliten. Die Methylierung erfolgt durch S-Adenosylmethionin in drei Schritten zu Methylselenol (CH_3SeH), Dimethylselenid ($(\text{CH}_3)_2\text{Se}$) und zum Trimethylselenonium-Ion ($(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$) durch die Enzyme Thiol-S-Methyltransferase (Schritt 1 und 2) und Thioether-S-Methyltransferase (Schritt 3). Methylselenol stellt bei normaler Selenaufnahme den Hauptmetaboliten dar, bei höherer Selenaufnahme treten vermehrt die zwei- und dreifach methylierten Formen auf und werden abgeatmet (Dimethylselenol) und über den Urin ausgeschieden (Trimethylselenonium-Ion) [9].

Selenomethionin, Hauptselenform in selenreicher Hefe [10], die in vielen Studien genutzt wird, kann durch Transselenierung zu Selenocystein umgebaut werden, woraus durch die Selenocystein- β -Lyase Selenwasserstoff freigesetzt wird. Ein unspezifischer Einbau in Proteine an Stelle von Cystein oder die direkte Verwertung von Selenocystein zum Aufbau von Selenoproteinen findet nicht statt. An Stelle dieses komplexen Metabolismus wird Selenomethionin hauptsächlich direkt an Stelle von Methionin unspezifisch in Proteine, vor allem Albumin, eingebaut und in den Methionin-Pool integriert [9,11,12].

Selen-Methylselenocystein, ein Hauptselenbestandteil bestimmter Pflanzen, wie selenangereicherten Knoblauchs und selenangereicherten Broccolis [10,13], kann durch die Cysteinkonjugat- β -Lyase in einem Schritt unter Umgehung des Selenwasserstoff-Pools zu Methylselenol und mehrfach methylierten Selenformen metabolisiert werden [9].

1.3 Wirkung von Selen

1.3.1 Überversorgung

Die Einnahme von mehr als 900 μg Selen pro Tag verursacht reversible toxische Erscheinungen in Form von Nagel-, Haut- (Rötung, Schwellung, Blasenbildung) und Haarveränderungen, ZNS-Störungen (cerebrale Anfälle, Lähmungen, periphere Anästhesie, motorische Unruhe) und nach Knoblauch riechendem Atem. In selenreichen Regionen wie Venezuela und South Dakota wurden bei einer täglichen Selenaufnahme von 300-724 μg keine derartigen Symptome festgestellt. Die toxische Grenze wird daher bei 800 μg pro Tag vermutet [14-17].

1.3.2 Selenmangel

Eine Selenaufnahme von weniger als 30 µg pro Tag wird als unzureichend angesehen [5], verschiedene Erkrankungen werden damit in Zusammenhang gebracht. Auf die besondere Rolle der Selenversorgung bei der Karzinogenese wird im nächsten Kapitel näher eingegangen.

Unter Selenmangel tritt ein Verlust sowohl der zellvermittelten als auch der humoralen Immunkompetenz auf. Supplementierung mit Selenit ergab immunstimulierende Effekte. Es trat eine verstärkte klonale Expansion aktivierter T-Lymphozyten auf, die Stimulation durch Antigene, die Fähigkeit zytotoxische Lymphozyten zu entwickeln und Tumorzellen zu zerstören nahm zu. Ebenso wurden Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) aktiviert [18,19]. Auch das Auftreten und die Schwere der Progression von Viruserkrankungen werden mit Selenmangel verbunden [20]. Besonders deutlich wird das bei der Keshan-Krankheit, einer schweren Kardiomyopathie, die in extrem selenarmen Gebieten in China auftritt [21]. Auf der Basis eines Selenmangels wird das avirulente Coxsackievirus B3 virulent und führt mit weiteren Kofaktoren zur Erkrankung [22]. Mangel an Selen in Kombination mit Nahrungstoxinen wird für das Kashin-Beck-Syndrom, eine deformierende Osteoarthritis [23,24], und ein kombinierter schwerer Jod- und Selenmangel für den Myxödemkretinismus mitverantwortlich gemacht [25,26].

Eine essentielle Rolle spielt Selen für die männliche Fruchtbarkeit. Es wird zur Testosteron-Biosynthese sowie zur Bildung und Reifung der Spermatozoen benötigt [27]. Seine Wirkung übt es dabei wahrscheinlich über die PH-GPX aus, eine Form der GPX [28]. Eine mögliche protektive Eigenschaft von Selen bei kardiovaskulären Erkrankungen wird derzeit diskutiert [14,29]. Niedrige Plasmaselenspiegel treten bei schwerkranken, intensivmedizinisch versorgten Patienten auf und korrelieren mit verringerter Aktivität von pGPX, einem antioxidativen und antiinflammatorischen Selenoprotein. Welche Wirkungen Selen darüber hinaus auf inflammatorische Reaktionen hat, ist von besonderem Interesse, da der Serumselenspiegel invers zur Stärke der inflammatorischen Reaktion und Mortalität von intensivmedizinisch betreuten Patienten korreliert [30-32].

Bisher ist keine schwere neurologische Erkrankung unter selenmangelernährten Tieren bekannt, lediglich eine vermehrte Anfälligkeit für neuropathologische Auffälligkeiten. Erst vor kurzem wurde die Entwicklung von Ataxie und cerebralen Krämpfen unter schwerstem, durch selendefiziente Ernährung nicht erreichbar Selenmangel im Gehirn bei SeP^{-/-}-Knockout-Mäusen festgestellt [33,34]. Die genaueren Zusammenhänge dieser Erkrankung unter der massiven Unterversorgung des Gehirns mit Selen sind jedoch noch völlig ungeklärt.

Eine Anzahl von Elementen, die in Nahrungsmitteln, Trinkwasser und Umwelt vorkommen (z.B. Cadmium, Arsen, Zink, Blei, Quecksilber), haben selenantagonistische Wirkungen. Sie konkurrieren mit Selen um die Aufnahme, bilden unter physiologischen Bedingungen unreaktive Selenide oder Proteinkomplexe oder inhibieren selenabhängige Enzyme. Viele dieser Elemente stimulieren die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale, sind mutagen, inhibieren DNA-Reparaturenzyme, zeigen karzinogene Aktivität und stimulieren das Wachstum von Tumorzellen. Eine Exposition gegenüber diesen Elementen vergrößert den Selenbedarf [19].

Eine zentrale Rolle kommt Selen natürlich bei der Biosynthese der Selenoproteine zu. Unter Selenmangel zeigt sich eine Hierarchie der Expression, in der besonders SeP und PH-GPX ein hoher Stellenwert zukommt [35-39].

1.3.3 Rolle von Selen in der Karzinogenese

In tierexperimentellen sowie epidemiologischen Fallkontroll- und Kohortenstudien konnte ein protektiver Effekt von Selen bei der Krebsinzidenz und -sterblichkeit aufgezeigt werden. Diese Ergebnisse konnten aber nicht in allen Studien bestätigt werden. Eine besonders starke protektive Wirkung von Selen zeigte sich bei gastrointestinalen und kolorektalen Tumoren, wenngleich es auch hierzu inkonsistente Ergebnisse gibt [19,40-49].

In zwei Querschnittstudien konnte von Clark et al. (1993) [40] und Russo et al. (1997) [41] gezeigt werden, dass die Prävalenz eines oder mehrerer kolorektaler Adenompolypen bei hohen Serumselenspiegeln deutlich vermindert ist. Die Wirksamkeit des zugeführten Selens hängt von der chemischen Verbindung ab, in der es verabreicht wird. Jacobs et al. (1983) [50] zeigten in Studien mit Ratten, dass eine Selenitanrei-

cherung der Nahrung die chemisch induzierte Tumorentstehung im gesamten Dickdarm der Ratten inhibieren konnte. In einer Studie von Feng et al. (1999) [42] wurde die Nahrung der Ratten mit verschiedenen Selenformen angereichert. Die chemisch induzierte Bildung aberranter Krypten, die als spezifische, dosisabhängige Antwort auf Kolonkarzinogene gelten, wurde nur mit der Selenit- oder Selenatgabe verhindert, nicht aber mit Selenomethionin. In einer großen prospektiven Studie von Clark et al. (1996) [43] erhielten die Personen entweder 200 µg Selen pro Tag in Form von selenreicher Hefe oder Placebo. Selen ist in Hefe hauptsächlich als Selenomethionin enthalten [10]. Durch die Selengabe wurde die Gesamtkrebsinzidenz und besonders das relative Risiko für Lungen-, Prostata- und kolorektale Karzinome signifikant gesenkt. Finley et al. (2000) [44] führten Ratten überdurchschnittliche Selenmengen in Form von Selenat, Selenit oder selenangereichertem Broccoli mit der Nahrung zu. In selenangereichertem Broccoli liegt Selen hauptsächlich als Selen-Methylselenocystein vor [13]. Die chemisch induzierte Bildung aberranter Krypten konnte nur bei Ratten, die Selen in Form von selenangereichertem Broccoli erhalten hatten, signifikant reduziert werden. Vergleichbare Ergebnisse erzielten auch Ip und Lisk (1994/95) [51] bei chemisch induziertem Brustkrebs bei Tieren mit selenangereichertem Knoblauch.

Bei der antikarzinogenen Wirkung scheinen besonders methylierte Selenformen eine große Rolle zu spielen, deren Funktion aber noch nicht genau bekannt ist und die lange nur als Ausscheidungsformen von Selen angesehen wurden. Von den Metaboliten im Selenstoffwechsel hat Methylselenol den höchsten antikarzinogenen Effekt, mehrfach methylierte Formen haben eine geringere Effektivität, ebenso wie Selenit. Den geringsten antikarzinogenen Effekt hat Selenomethionin. Weitere methylierte Selenformen mit guter antikarzinogener Wirkung sind bekannt, wie Selen-Methylselenocystein oder die synthetischen Verbindungen Selenobetain und Selenobetainmethylester, die als Vorstufen dienen und von denen monomethylierte Selenmetaboliten abgespalten werden können. Da sie unter Umgehung des anorganischen Selen-Pools, mit Selenwasserstoff als toxischer Substanz, methylierte Selenformen bereitstellen, haben sie eine wesentlich geringere Toxizität als anorganische Selensalze. Auf diesen Mechanismus wird neben möglichen eigenen antikarzinogenen Effekten auch die antikarzinogene Wirkung zahlreicher Selenalkyl- und Selenallylderivate sowie Alkyl- und Arylselenocyanate

zurückgeführt. Die antikarzinogene Wirkung der methylierten Selenmetaboliten beruht nicht auf einem Metabolismus zu Selenwasserstoff. Somit entfalten sie ihre protektive Wirkung nicht über den Aufbau von Selenoproteinen, sondern unabhängig von diesen [9,52].

Ein Zwischenprodukt des thiolabhängigen Selenitabbaus ist Selenodiglutathion. Für diese Substanz wurde eine potentiell antikarzinogene Wirkung festgestellt. Dies könnte bei hohen Selenitgaben zu signifikanten Mengen an Selenodiglutathion führen und die antikarzinogene Wirkung von Selenit begründen [52,53].

In Krebszellkulturen können hohe Dosen Selenit oder methylierten Selens Apoptose induzieren. Diese kann auch unabhängig von toxischen Effekten, DNA-Schäden und in Abwesenheit eines funktionsfähigen p53-Systems induziert werden. Die monomethylierten Selenformen zeigen dabei eine besonders hohe Effektivität bei bereits sehr geringen Konzentrationen in vitro [54]. Außerdem konnte eine Onkogeninaktivierung durch Selenit nachgewiesen werden [55].

1.4 Molekularbiologie von Selenoprotein P

1.4.1 Genlocus

Der Genlocus des humanen SeP befindet sich auf Chromosom 5 im Abschnitt q31 [56]. Die bekannten Isoformen des SeP [57] haben alle die gleiche N-terminale Sequenz, weshalb sie als ein Produkt desselben Gens anzusehen sind. Die auf dem Genlocus 5q32 gefundene pGPX hat trotz ihrer Nähe keine Expressionsverknüpfung [56].

1.4.2 Einflüsse auf den SeP-Promotor

Die Charakterisierung des humanen SeP-Promotors ergab zahlreiche mögliche Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren: TATA-Box, CAAT-Box, ein CG-reicher Strang für SP1-abhängige Transkription, zwei AP1-Bindungsstellen, ein INF- γ -gesteuertes Element (GAS) und mehrere Bindungsstellen für Mitglieder der STAT-Familie (Signal Transducer and Activator of Transcription) [58]. Zytokine sind Signalproteine, die biologische Informationen von ihren Bildungsorten zu verschiedenen Zielzellen bringen. Sie sind an der Regulation von Akut-Phase-

Reaktionen und Entzündungen beteiligt. Inflammatorische Zytokine wie TNF- α , INF- γ und besonders IL-1 β erniedrigen in HepG2-Zellen die SeP-Promotoraktivität sowie die Expression, was die Vermutung einer negativen Akut-Phase-Reaktion nahelegt [58-60]. In den gleichen Zellen wird auch eine verminderte SeP-mRNA- und Proteinsynthese auf Transkriptionsebene durch das antiinflammatorische Zytokin TGF- β 1 beobachtet [61]. TGF- β 1 wird von aktivierten Makrophagen sezerniert und spielt eine wichtige Rolle bei Immunmodulation und Wundheilung, was multifokale Entzündungen bei TGF- β 1-defizienten Mäusen belegen [62,63]. Das TGF- β 1-Signal wird über die Familie der Smad-Proteine nach Aktivierung am TGF- β -Rezeptorkomplex in den Kern übermittelt [64]. Hier erfolgt die direkte Bindung an Smad-bindende Elemente (SBE) im Promotor von TGF- β -reaktiven Genen. Die Sequenz der SBE ist CAGACA, auch CAGA-Box genannt. Im Promotor des humanen SeP-Gens wurden zwei CAGACA-Sequenzen gefunden. Bei Überexpressionsversuchen haben nur Smad 3 und 4, nicht aber Smad 2 an die CAGA-Box gebunden und führen zu einer stark verminderten SeP-mRNA-Synthese durch Reduktion der Promotoraktivität [60,65,66]. Bisher wurde gezeigt, dass Smad-Überexpression zu Promotoraktivierung von TGF- β -reaktiven Genen führt [65]. Der humane SeP-Promotor ist der erste, bei dem eine Negativregulation durch TGF- β 1 nachgewiesen werden konnte [67].

1.4.3 Selenocystein-Insertion

Selen wird in Form von Selenocystein (SeC, 21. Aminosäure), das ein Cystein-Analogon mit Selen an Stelle von Schwefel darstellt, in eine Reihe von Proteinen in stöchiometrischen Mengen eingebaut. Diese Proteine werden Selenoproteine genannt [11,68]. Zu ihnen gehören z.B. die Familie der Dejodasen (Typ I-III), die Familie der Glutathionperoxidasen (cGPX, pGPX, PHGPX, GI-GPX), SeP, die Thioredoxinreduktasen (TRR, TRR-2), Selenophosphat-Synthetase-2 und mehrere weitere Selenoproteine [14,69]. Dabei ist SeC im aktiven Zentrum der Selenoproteine mit enzymatischer Aktivität lokalisiert und direkt in die katalytischen Reaktionen involviert. Die Stelle der mRNA, an der SeC in die Selenoproteine eingebaut wird, ist das UGA-Codon, das ursprünglich als nicht codierend im genetischen Code bestimmt wurde [68]. Unter den

Selenoproteinen nimmt SeP eine besondere Stellung ein, da es über multiple UGA-Codons im offenen Leserahmen verfügt, bis zu 17 beim SeP des Zebrafisches [70-72].

Für den bei der Biosynthese eukaryontischer Selenoproteine erforderlichen kotranslationalen Einbau dieser außergewöhnlichen Aminosäure sind spezifische Komponenten erforderlich:

Eine haarnadelförmige Struktur im 3'-untranslatierten Teil der mRNA, die Selenocystein-Insertions-Sequenz (SECIS) [39,73], ein SECIS-bindendes Protein (SBP2) [74-76], ein Selenocysteyl-tRNA-spezifischer Translations-Elongationsfaktor (eEF_{Sec}) [77,78], eine Selenocysteyl-spezifische tRNA (tRNA^{Sec}) [79] und eine Selenophosphat-Synthetase zur SeC-Biosynthese an der tRNA^{Sec} [80]. Eine mögliche Selenocystein-Synthase-ähnliche Aktivität in eukaryontischen Zellen zur Synthese von Selenocysteyl-tRNA^{Sec} aus Seryl-tRNA^{Sec} wurde beschrieben [81].

1.4.3.1 Selenocystein-Insertions-Sequenz (SECIS)

In Anwesenheit des haarnadelförmigen SECIS-Elements im 3'-untranslatierten Teil der mRNA von Selenoproteinen (3'-UTR) wird das UGA-Codon statt normalerweise als Stopp-Codon, das zum Kettenabbruch führt, als Selenocystein translatiert. Dies geschieht für jedes UGA-Codon im offenen Leserahmen, unabhängig von der Position [39,73,82]. In den Selenoproteinen werden zum Kettenabbruch an der korrekten Position statt UGA andere Stopp-Codons verwendet. Als definitives Stopp-Codon fungiert bei SeP UAA [39,83]. Der Abstand des SECIS-Elements zum decodierten UGA-Codon beträgt in Eukaryonten mindestens 60 Nukleotide und kann ohne Funktionseinbuße mehrere Kilobasen betragen [39,84]. In Eukaryonten kann ein SECIS-Element mehrere UGA-Codons bedienen, wie z.B. in der SeP-mRNA, wo im Gegensatz zu den anderen Selenoprotein-mRNAs sogar 2 funktionelle SECIS-Elemente bekannt sind, die 10-17 UGA-Codons bedienen [39,72,82]. Dies steht im Gegensatz zum Mechanismus in Prokaryonten, bei denen das SECIS-Element unmittelbar anschließend zum UGA-Codon im codierenden Abschnitt stehen muss, da es sonst zu keiner SeC-Inkorporation führt [85]. In Prokaryonten kann somit ein SECIS-Element immer nur das unmittelbar vorangehende UGA-Codon bedienen. Die prokaryontische Haarnadelstruktur unter-

scheidet sich von der eukaryontischen und besitzt deutliche Unterschiede in Sequenz, Struktur und Lokalisation [73,86].

Ein Vergleich der Sequenzen von 23 eukaryontischen SECIS-Elementen ergab, dass alle eine ähnliche 2-D-Struktur besitzen, bestehend aus zwei Helices I und II, die durch eine innere Schleife getrennt sind, und eine die Helix II überragende apikale Schleife (Abbildung 1). Die apikale und innere Schleife haben variable Größen. Helix I hat eine sehr variable Länge, Helix II dagegen eine sehr hochkonservierte Länge von 13-15 Basenpaaren. Weitere hochkonservierte Regionen sind ein Adenosin-Doppel an der Basis der apikalen Schleife, GA an der 3'-Seite und AUGA an der 5'-Seite der Haarnadelstiele. Die zwei letzten Sequenzen sind Teil einer Folge von meistens vier non-Watson-Crick-Basenpaaren mit einem zentralen GA/AG-Tandem, dem sogenannten SECIS-Kern [87], an der Basis von Helix II [73,86,88]. Diese hochkonservierten Sequenzbereiche sind essentiell für die Funktion des SECIS-Elements [39,87,89]. Non-Watson-Crick-Basenpaare können Ausbeulungen und innere Schleifen bilden, präsentieren chemische Gruppen an der großen oder kleinen Rille der Helix und können somit funktionelle Bindungsstellen für spezifische Interaktionen mit Metallen oder Proteinen bilden. Besondere Beachtung findet das zentrale GA/AG-Tandem, das in allen bisher untersuchten SECIS-Elementen gefunden wurde, in gekreuzter Anordnung vorliegt und dadurch erstaunliche Eigenschaften zeigt. Während das Vorhandensein von nur einem GA-Basenpaar zur schweren Distorsion und fast alle anderen Tandemkombinationen zur Helixöffnung führen, führt die natürlich vorkommende Anordnung zur Paarungsstabilität und Helixstabilisierung [73,86,89].

Neuere Untersuchungen der Sekundärstruktur der verschiedenen SECIS-Elemente ergaben, dass diese nach ihrer Form in zwei Gruppen eingeteilt werden können. Die bisherigen Untersuchungen wurden vor allem an SECIS-Elementen von humaner und Ratten-Dejodase Typ I, humaner und Ratten-cGPX und Ratten-SeP durchgeführt. Aus diesen Ergebnissen wurde eine gemeinsame Sekundär- und Tertiärstruktur hergeleitet [39,86,87,89]. Die neue Einteilung in zwei Gruppen richtet sich nach der Anwesenheit einer kleinen Haarnadelstruktur an der Spitze des SECIS-Elements oberhalb des konservierten Adenosin-Doppels (Abbildung 2). In der Gruppe 2 mit der genannten und schon früher vorgeschlagenen Struktur [90] befinden sich das konservierte Adenosin-Doppel

in einer inneren Ausbuchtung. Die Bildung dieser zusätzlichen Haarnadelstruktur hängt von der postulierten Größe der apikalen Schleife ab. Schleifen aus 4-12 Nukleotiden gelten als stabil, wenn sie durch einen stabilen Stiel geschlossen werden, wohingegen Schleifen mit mehr als 16 Nukleotiden als instabil gelten [91]. SECIS-Elemente mit großen apikalen Schleifen aus 15 oder mehr Nukleotiden können durch Bildung zusätzlicher Basenpaare die Schleife verkleinern und stabilisieren (Gruppe 2). Die SECIS-Elemente der Gruppe 1 mit apikalen Schleifen aus 14 oder weniger Nukleotiden haben in der Sequenz kein Potential, zusätzliche Basenpaare zu bilden. Somit gehören der Gruppe 1 die Typ I-Dejodase, cGPX, GI-GPX und das zweite SeP-SECIS-Element an. Alle anderen bisher untersuchten SECIS-Elemente werden der Gruppe 2 zugeordnet.

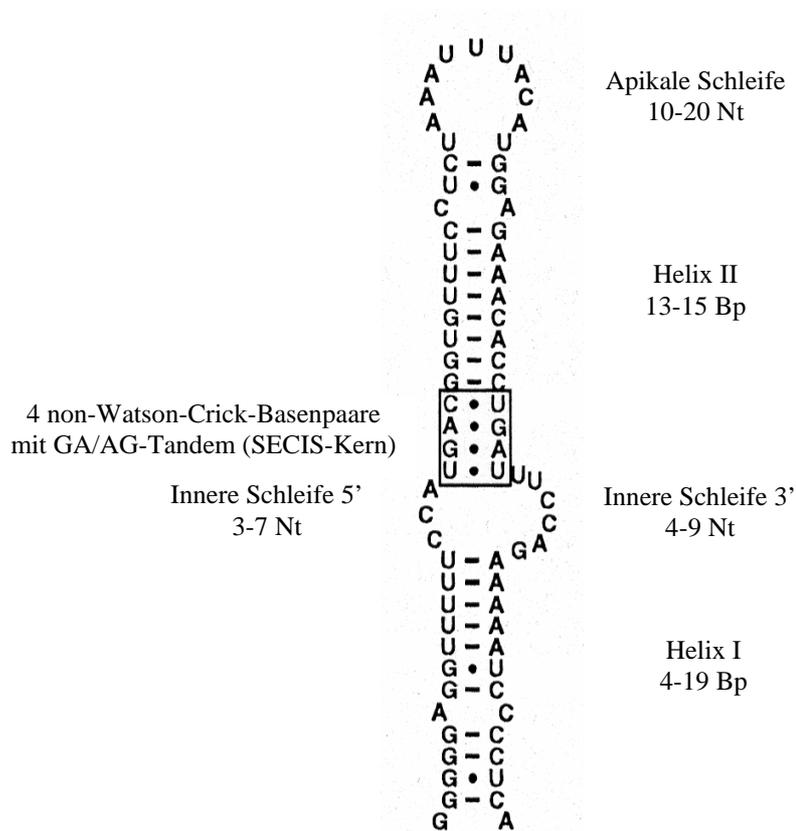


Abbildung 1: Sekundärstruktur des haarnadelförmigen SECIS-Elements [86,89].

Die zuvor bestimmten Sekundär- und Tertiärstrukturen stimmen damit nur für SECIS-Elemente der Gruppe 1, von denen sie auch abgeleitet wurden. Beide Formen des SECIS-Elements haben aber vergleichbare Aktivitäten, die SeC-Inkorporation zu steuern, und lassen aufgrund der ähnlichen Positionen von Kern und konservierten Adenosinen einen gemeinsamen Mechanismus vermuten [86,87,89].

Abgesehen von den hochkonservierten Sequenzen, bei denen ein Basenaustausch zu starker Aktivitätseinbuße bis zum Funktionsverlust des SECIS-Elements führen kann, ist im übrigen SECIS-Element die exakte Sequenz der gepaarten Nukleotide vergleichsweise unwichtig, wenn die Balance von Länge und thermodynamischer Stabilität aufrechterhalten bleibt. Die nicht maximal ausgeprägte Stabilität im SECIS-Element könnte Hinweis auf die zur Funktion nötige Flexibilität für den Translationsvorgang sein. Neben einem postulierten „Looping-back“-Mechanismus (Zurückklappen des SECIS-Elements im 3'-UTR zum UGA-Codon) [39] könnte auch das Bindungsverhalten zu spezifischen Proteinfaktoren hierdurch erleichtert werden [92].

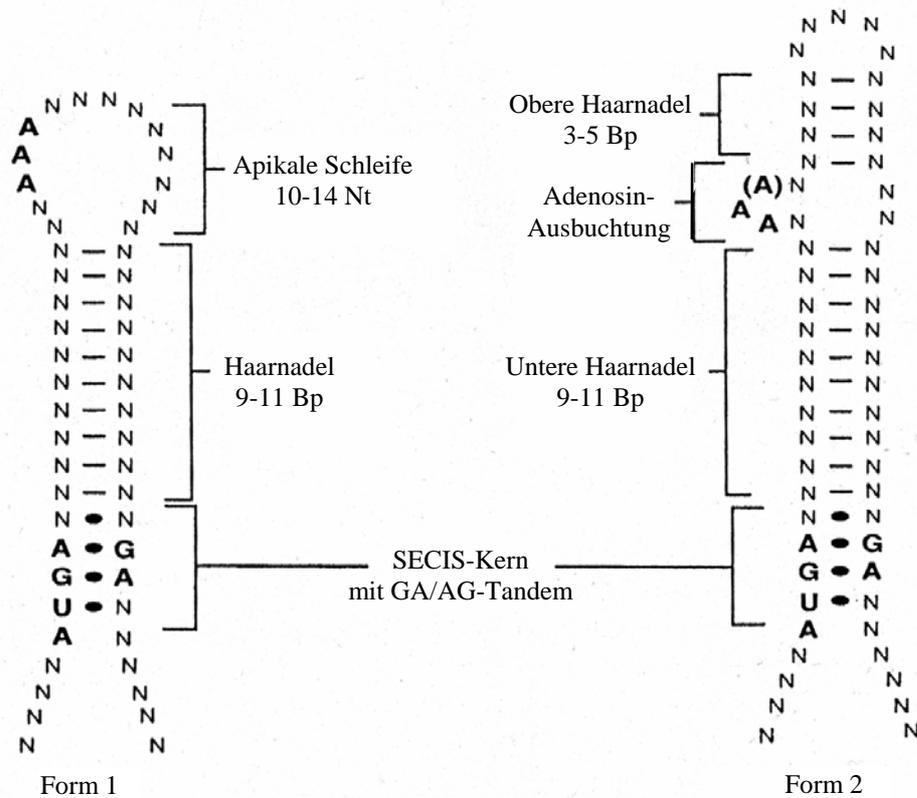


Abbildung 2: Formen 1 und 2 der Spitzenregion des SECIS-Elements [88].

1.4.3.2 SECIS-bindendes Protein 2 (SBP2)

In Prokaryonten wird die SECIS-vermittelte SeC-Inkorporation von einem bifunktionalen Protein katalysiert: Der Translationfaktor SELB hat eine N-terminale tRNA^{Sec}-spezifische Elongationsfaktor-Domäne und eine C-terminale SECIS-RNA-bindende Domäne [93]. In Eukaryonten werden diese Aufgaben von zwei getrennten Proteinen übernommen, vom SECIS-bindenden Protein 2 (SBP2) [74-76] und von einem tRNA^{Sec}-spezifischen Translations-Elongationsfaktor (eEF_{Sec}) [77,78].

Die postulierte SBP2-Bindungsstelle des SECIS-Elements besteht aus den vier non-Watson-Crick-Basenpaaren der Helix 2 mit dem zentralen GA/AG-Tandem, dem 5'-Strang der Helix I und dem 5'-Teil der inneren Schleife. Diese Bindungsstelle ist über verschiedene Spezies hinweg konserviert [94]. Wenn SBP2 einmal an das SECIS-Element gebunden hat, dissoziiert es entweder sehr langsam oder gar nicht mehr und bleibt bis zum Abbau der mRNA oder dem eigenen Abbau gebunden [38]. In zahlreichen Versuchen mit Überexpression von Selenoprotein-mRNAs und der dabei beobachteten verminderten SeC-Inkorporation und dem vorzeitigen Kettenabbruch am UGA-Codon stellte sich SBP2 als der hauptsächlich limitierende Faktor der SeC-Inkorporation heraus. Nur geringen limitierenden Einfluß haben eEF_{Sec} und tRNA^{Sec} [38,77]. Für SBP2 wurde eine stimulierende Wirkung auf die SeC-Inkorporation festgestellt [74,75]. Dabei bestimmt SBP2 eine bereits aus früheren Studien bekannte Hierarchie unter den SECIS-Elementen der verschiedenen Selenoproteine: cGPX < 5'-DI Typ I < TRR << PH-GPX << SeP (1. SECIS-Element) [39,92]. Transfektion von SBP2 oder auch Selensupplementierung bewirkte eine drastische Aktivitätssteigerung der SECIS-Elemente von PH-GPX und noch deutlicher von SeP (1. SECIS-Element) [38]. Dass diese Hierarchie über unterschiedliche Affinitäten von SBP2 zu verschiedenen SECIS-Elementen gesteuert wird, ist wegen der ähnlichen Affinität von SBP2 zu vielen verschiedenen Säuger-SECIS-Elementen unwahrscheinlich [94]. Das isolierte humane SBP2 (Genlocus: Chromosom 9) zeigt neben zwei Bereichen sehr hoher Übereinstimmung mit dem Ratten-SBP2 auch Bereiche erstaunlich niedriger Übereinstimmung für zwei Säugetierproteine [76].

1.4.3.3 Selenocysteyl-tRNA-spezifischer Translations-Elongationsfaktor (eEF_{Sec})

Der Sequenzvergleich der tRNA^{Sec}-spezifischen Translations-Elongationsfaktoren (eEF_{Sec}) verschiedener Eukaryonten mit den Elongationsfaktoren eEF1A aus Mäusen und Menschen zeigt eine hohe Homologie in der tRNA-bindenden Domäne, aber auch einzigartige Regionen der eEF_{Sec}-Familie, eine C-terminale SBP2-interagierende Domäne, sowie Insertionen in der eEF1A-Sequenz, die in eEF_{Sec} fehlen [77,78]. Die Bindung von eEF_{Sec} an Selenocysteyl-tRNA^{Sec} ist sehr spezifisch, eine Bindung an die serylierte Vorstufe, Seryl-tRNA^{Sec}, oder an die Standard Seryl-tRNA^{Ser} war kaum festzustellen [78].

Die Translation ist abhängig von der Belieferung der Ribosomen A-Seite mit Aminoacyl-tRNA-Komplexen durch die Elongationsfaktoren zu deren entsprechenden Codons. Aminosäure-Codons werden durch die tRNA-EF-Komplexe von Abbruch-Codons unterschieden, die durch Freisetzungsfaktoren erkannt werden [95]. Die SeC-Inkorporation ist eine Ausnahme, da hier ein tRNA-EF-Komplex ein Codon beliefert, das normalerweise als Abbruch gelesen wird [78].

1.4.3.4 Selenocysteyl-spezifische tRNA (tRNA^{Sec})

Die tRNA^{Sec} zeigt Charakteristika der Sekundär- und Tertiärstruktur, die sie von gewöhnlicher tRNA unterscheidet. Die Tertiärstruktur ist wegen begrenzter tertiärer Interaktionen lockerer. Die 2-D-Strukturen einer Vielzahl prokaryontischer tRNA^{Sec} [96] ähneln der postulierten Kleeblattstruktur der eukaryontischen tRNA^{Sec} [73,79]. Diese liegt in zwei Isoformen vor, die sich durch eine 2'-O-Ribose-Methylierung am U34 unterscheiden [97]. Die Promotorstruktur des eukaryontischen tRNA^{Sec}-Gens wurde sehr genau untersucht und zeigt große Unterschiede zu klassischen eukaryontischen tRNA-Genen, wo der Promotor aus den zwei intragenen A- und B-Boxen besteht. Der tRNA^{Sec}-Promotor besteht aus einem Aktivator-Element (AE), einem proximalen Sequenz-Element (PSE) und einer TATA-Box strangaufwärts und der B-Box intragen. Die Transkriptionsfaktoren zu diesen Promotorelementen wurden bereits identifiziert. Besondere Aufmerksamkeit wurde dem Selenocystein-tRNA-Transkription aktivierenden Faktor (Staf), einem Sieben-Zinkfinger-Protein, geschenkt, der spezifisch die

Aktivierung vom AE aus vermittelt. Genauere Eigenschaften dieses Faktors werden noch erforscht [73].

1.4.3.5 Selenophosphat-Synthetase, Selenocystein-Synthase

Die Biosynthese der SeC-beladenen tRNA^{Sec} in Eukaryonten ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird ein ähnlicher Weg wie in Prokaryonten angenommen: Die tRNA^{Sec} wird trotz geringer Sequenzhomologie mit der tRNA^{Ser} von der Seryl-tRNA-Synthetase mit Serin zu Seryl-tRNA^{Sec} aminoacyliert. Aus ATP und Selenwasserstoff wird durch die Selenophosphat-Synthetase Selenophosphat synthetisiert. Mit diesem wird durch die Selenocystein-Synthetase die Seryl-tRNA^{Sec} in Selenocysteyl-tRNA^{Sec} umgewandelt [69,98]. Von den beteiligten spezifischen Enzymen ist in Eukaryonten die Selenophosphat-Synthetase bekannt [80]. Eine mögliche Selenocystein-Synthase-ähnliche Aktivität in Zellen wurde beschrieben [81]. Der genaue Reaktionsweg ist aber noch unklar.

1.4.3.6 Interaktionen zwischen den einzelnen Translationselementen

In Transfektionsversuchen binden SBP2 und eEF_{Sec} unabhängig voneinander an das SECIS-Element. Dabei zeigt eEF_{Sec} eine geringe Spezifität, da es auch an veränderte SECIS-Elemente bindet, SBP2 dagegen nicht. Zusammen binden die beiden Faktoren aber nur an das natürliche SECIS-Element, d.h. SBP2 verleiht eEF_{Sec} Spezifität für das natürliche SECIS-Element, wahrscheinlich durch Konformationsänderung der RNA-bindenden Domäne von eEF_{Sec} [78]. Die Bindung von SBP2 an das SECIS-Element wird von eEF_{Sec} stimuliert [76]. Da ein Komplex mit SECIS-Element, SBP2 und eEF_{Sec} nur in Anwesenheit eines SECIS-Elements zustandekommt, wird für das Zusammenspiel der Faktoren folgender Mechanismus angenommen: Die SeC-Inkorporation, gesteuert vom 3'-UTR, erfolgt durch Bindung von SBP2 an das SECIS-Element, gefolgt vom Einfang eines eEF_{Sec}-Selenocysteyl-tRNA^{Sec}-Komplexes. Der Komplex wird am SECIS-Element zusammengebaut und liefert den eEF_{Sec}-Selenocysteyl-tRNA^{Sec}-Komplex an ein UGA-Codon, das an der Ribosomen A-Seite liegt. Ein stabiler SECIS-SBP2-Komplex erlaubt einen raschen und effizienten Wechsel von leerem eEF_{Sec} und beladenem Selenocysteyl-tRNA^{Sec}-eEF_{Sec}, was für die Decodierung von multiplen UGA-Codons im SeP wichtig ist [76,78].

1.4.3.7 Weitere Einflüsse auf die Translation

Die SeC-Inkorporation hat sich in bisher allen untersuchten Systemen als ineffizient herausgestellt, auch in Bakterien [75,78,99,100]. Die Kombination von zwei oder drei UGA-Codons in einem Leserahmen führt dabei zu einer drastischen Reduktion des vollständig translatierten Proteins, so dass die vorzeitige Abbruchrate in solchen Proteinen sehr hoch sein muss. Trotzdem ist die SeC-Inkorporations-Effizienz am einzelnen UGA-Codon wohl hoch genug, um ausreichende Mengen an komplettem Selenoprotein zu erhalten [100]. Bemerkenswert ist, dass die Selenoprotein-mRNA-Beladung mit Polysomen, bezogen auf die Länge des offenen Leserahmens, im Vergleich zu Nichtselenoprotein-mRNAs geringer ausfällt. Die Polysomenanzahl entspricht dabei der mRNA-Länge bis zum ersten UGA-Codon, wenn dort der Kettenabbruch erfolgen würde, d.h. das UGA-Codon ist ein Translationsnachteil der mRNA. Die An- oder Abwesenheit eines SECIS-Elements spielt dabei keine Rolle [101].

Ursache der bereits angesprochenen Hierarchie der einzelnen Selenoproteine in verschiedenen Geweben und innerhalb eines Gewebes kann auch die unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber einem als Nonsense-vermittelter Zerfall (Nonsense-mediated Decay, NMD) bezeichneten Reaktionsweg sein, in dem mRNAs mit unsinnigen Codons vor dem Stopp-Codon eliminiert werden. Bei Selenmangel unterliegt die cGPX-mRNA einem NMD, gegen den die mRNAs von anderen Selenoproteinen, wie Typ I-Dejodase und besonders SeP und PH-GPX, relativ unempfindlich sind. Das würde bedeuten, dass unter Selenmangel die UGA-Codons vermehrt als unsinnig interpretiert werden und das wenige vorhandene Selen in Selenoproteine höherer Rangordnung inkorporiert wird [38].

Die SeC-Inkorporation wird auch von den beiden dem UGA-Codon folgenden Basen und den zwei Aminosäuren vor der potentiellen SeC-Einbaustelle beeinflusst. Pyrimidinbasen nach dem UGA-Codon begünstigen, Purinbasen benachteiligen den SeC-Einbau in das Protein, auch wenn sie nach einer Pyrimidinbase folgen [102,103]. Vergleicht man die Sequenzen des SeP von Ratte, Mensch und Rind, so fällt die Prävalenz von Cytosin als Folgebase nach dem UGA-Codon auf, der schwächsten Abbruch-induzierenden Base [90]. Die zwei Aminosäuren vor dem möglichen SeC-Einbau haben einen noch stärkeren Einfluß auf Einbau oder Abbruch als die Folgebase nach dem

UGA-Codon. Durch Einbau zweier Codons von Abbruch-einleitenden Aminosäuren (Asparaginsäure und Arginin) vor das UGA-Codon erfolgte eine drastische Verringerung der SeC-Inkorporation. Die Kombination dieser zwei Aminosäuren vor einem UGA-Codon wurde in keinem der bisher untersuchten Selenoproteingene gefunden [100].

1.4.3.8 Proteineigenschaften

Das humane SeP besteht aus 381 Aminosäuren, davon fungieren 19 Aminosäuren als Signalpeptid (Abbildung 3). SeP ist das erste identifizierte Selenoprotein, das mehr als ein Selenocystein in seiner Primärsequenz beinhaltet, ein Selenocystein als 59. Aminosäure und neun Selenocysteine im C-terminalen Anteil (AS 300-381), vier davon unter den letzten 15 Aminosäuren (AS 367-381) [70,82]. Die selenreichen Regionen im C-terminalen Teil offenbaren sich u.a. durch Trypsin- und Bromcyanbehandlung von SeP [104]. Neben dem menschlichen SeP sind auch die von Maus, Ratte (je 10 SeC), Rind (12 SeC) [105] und Zebrafisch (17 SeC) [72] bekannt.

Bei der Aminosäurenanalyse von SeP ergibt sich ein SeC-Gehalt von sieben bis acht pro Molekül, was im Widerspruch zu den zehn erwarteten aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz steht. Als Ursachen hierfür werden Zerstörung von Selenocystein während der Präparation, Modifikation, posttranslationale Spaltung des SeP-Moleküls und vor allem vorzeitiger Abbruch an einem UGA-Codon diskutiert [70,71,82,83,104]. Die basischen Aminosäuren (17,2%) überwiegen gegenüber den sauren (10,4%) unter besonderer Beachtung zweier basischer, histidinreicher Abschnitte (AS 204-217 und AS 244-253 im humanen SeP) [70,82]. Letztere sind charakteristisch für Heparin-affinität, weisen zahlreiche redoxaktive Stellen auf und legen die Vermutung nahe, dass SeP an Proteoglykane an der Zelloberfläche binden kann [70,57,106-109]. Sie sind wahrscheinlich auch verantwortlich für die Fähigkeit, Schwermetalle zu binden [110,111]. Somit könnte SeP im interzellulären Raum der Abwehr oxidativer Reagenzien zum Schutz der Plasmamembran dienen [7,57,104,112,113]. Die Vermutung, dass es sich bei SeP um ein sezerniertes extrazelluläres Protein handelt, wird auch durch das Vorhandensein eines Signalpeptids erhärtet [70,71,82]. Außer in der Leber wurden bei Ratten besonders in Niere, Lunge und Hoden, beim Menschen vor allem in Herz und

Lunge SeP-mRNA-Transkripte nachgewiesen [114]. Im Gastrointestinaltrakt des Menschen wurden im Ösophagus, Duodenum, dem proximalen und distalen Kolon und im Rektum starke, im Magencorpus und Antrum nur schwache SeP-mRNA-Signale detektiert [115]. Im menschlichen Plasma liegt Selen, je nach untersuchtem Kollektiv, zu 40% bis knapp 70% in SeP gebunden vor [116], in Rattenplasma zu über 60% [104]. Somit hat in beiden Fällen SeP den größten Anteil am Selengehalt des Plasmas [104,108,117]. Der SeP-Gehalt im Plasma von Ratten ist mit 25-30 µg/ml fünf- bis zehnmal so hoch wie der beim Menschen (ca. 3 µg/ml) [104,108,118,119]. Die Plasma-Halbwertszeit von SeP liegt bei drei bis vier Stunden [120].

Das native Ratten-SeP hat in der Gelfiltration eine Molekülmasse von 80-100 kD [121,122]. Durch Elution des SeP aus Rattenserum mit einem pH-Gradienten an einer Heparin-Sepharose-Säule und Auftrennung mittels SDS-PAGE lassen sich mindestens fünf Isoformen mit den Molekülmassen 57 kD und 45 kD bestimmen [57]. Die 57 kD-Bande ist die prominenteste, gefolgt von einer Doppelbande um 45 kD und mehreren schwächeren Banden [57,83]. Dabei scheint das 45 kD-Protein durch Abbruch der Translation am zweiten UGA-Codon zu entstehen. Dies wird durch übereinstimmende Ergebnisse der berechneten und gemessenen Molekülmasse des 45 kD-Proteins sehr wahrscheinlich [83]. Die Differenz der Molekülmassen in der Gelfiltration und der SDS-PAGE könnte durch die Existenz einer kleinen Untereinheit, die sich nicht gut detektieren läßt, erklärt werden [117,122]. Am wahrscheinlichsten ist aber die Glykoproteinnatur des SeP Ursache für die voneinander abweichenden Molekülmassen in den beiden Methoden [104,117]. Nach Behandlung mit N-Glucosidase verschoben sich die Molekülmassen von 57 bzw. 45 kD nach 48 bzw. 36 kD, woraus ersichtlich ist, dass SeP ein reich glykosyliertes Protein darstellt [83]. Mit N- oder O-Glykanase ergaben sich beide Male aus der 57 kD-Bande eine 48 kD- und eine 43 kD-Bande. Da die 43 kD-Bande, verglichen mit der 48 kD-Bande eine noch geringere Glykoproteinfärbung zeigte, ist anzunehmen, dass es sich um eine heterogene Glykosylierung handelt [104]. Dieses Ergebnis korreliert mit dem an Hand der Aminosäuresequenz errechneten Molekulargewicht ohne Signalpeptid von 41,052 kD [70,71]. Die massenspektrometrische Untersuchung von Ratten-SeP ergibt vier Isoformen mit identischen N-terminalen Anteilen und den Molekülmassen 36 kD, 38 kD, 48 kD und 50,5 kD. Dies

entspricht vorzeitigen Kettenabbrüchen am UGA-Codon 2, 3, und 7 sowie dem komplett translatierten SeP. Die dabei detektierten breiten Banden sind Ausdruck der Mikroheterogenität der Glykosylierung [123].

Analoge Ergebnisse existieren auch für das humane SeP. Es ergeben sich bei der SDS-PAGE zwei Banden bei 61 kD und 55 kD [108,124]. Nach N-Deglycosylierung resultieren mehrere Banden mit 32 kD, 34 kD, 39 kD und 45 kD [99,124]. Die aus der von der mRNA abgeleiteten SeP-Primärstruktur errechneten Molekularmassen des komplett translatierten SeP (41,229 kD) [82] und eines SeP mit Kettenabbruch am zweiten UGA-Codon (31,893 kD) [124] entsprechen gut den Banden mit 39 kD und 32 kD. Das Auftreten weiterer Banden kann auf die Existenz mehrerer Isoformen mit Kettenabbruch an anderen UGA-Codons oder eine heterogene Glycosylierung hinweisen. Eine unterschiedliche Glycosylierungsstufe ein und desselben Proteins als Ursache des Auftretens zweier SeP-Banden mit 61 kD und 55 kD ist aufgrund dieser Ergebnisse sehr unwahrscheinlich. Ein vorzeitiger Kettenabbruch analog zu den Ergebnissen beim Ratten-SeP ist am wahrscheinlichsten [108,124].

Vergleicht man das SeP der Ratte mit dem des Menschen, so fällt auf, dass es sich um ein hochkonserviertes Protein handelt. So codiert die cDNA bei Ratten (Werte für humanes SeP in Klammern) für 385 (381) Aminosäuren und weist fünf (sechs) typische N-Glycosylierungsstellen auf. Die errechneten Molekulargewichte betragen ohne Signalpeptid 41,052 kD (41,229 kD). Die Übereinstimmung beträgt 69% auf Nukleotidenebene und 72% auf Aminosäurenebene [71,82,70].

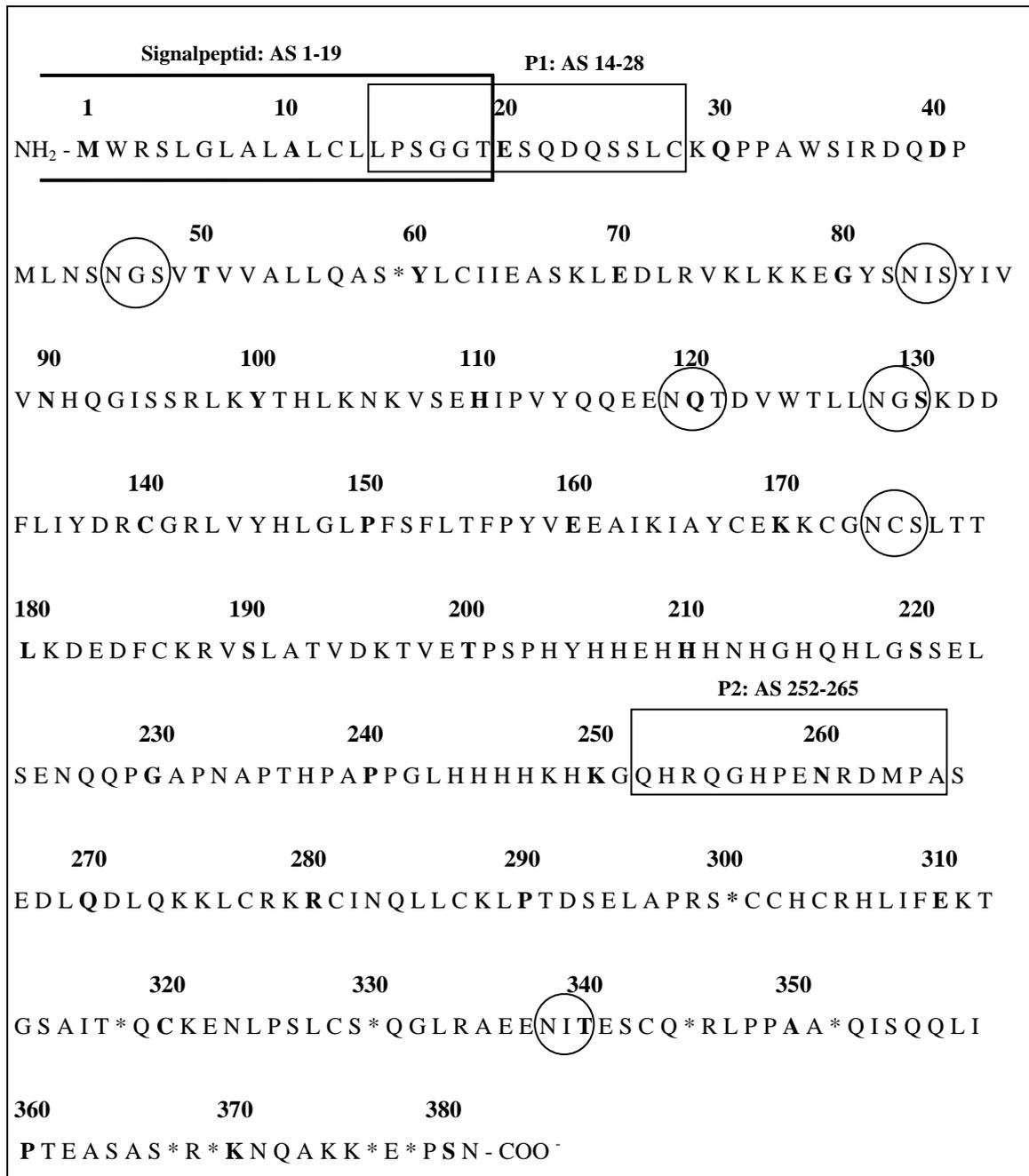


Abbildung 3:

Aminosäuresequenz des humanen SeP (381 Aminosäuren) [82]. Eckige Rahmen: Antigenes N-regionales Peptid (P1) und antigenes C-regionales Peptid (P2). Eckige Klammer: Signalpeptid (AS 1-19). Kreis: Mögliche Glykosylierungsstelle. Stern (*): Selenocystein.

1.5 Bisher bekannte Funktionen von Selenoproteinen

1.5.1 Glutathion-Peroxidase-Familie (GPX)

Die Enzyme der GPX-Familie katalysieren die Reduktion von zell- und gewebsschädigenden Peroxiden zu Alkoholen durch Glutathion mit reduziertem Glutathion als Kofaktor. Peroxide und andere reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies können zur Radikalbildung beitragen und dadurch DNA, Proteine, Kohlenhydrate und Lipide beschädigen. Die einzelnen GPX-Isoformen stellen somit eine wichtige Schutzfunktion in ihren jeweiligen Kompartimenten und Geweben sicher [69].

1.5.1.1 Cytosolische oder klassische GPX (cGPX)

Die cGPX kommt in fast allen Zellen vor. Sie kann Wasserstoffperoxid und freie organische Hydroperoxide zu Wasser und Alkoholen reduzieren. Die cGPX könnte einen zellulären Selenspeicher darstellen. Die cGPX-Aktivität wird auch als Marker für den Selenstatus eines Individuums herangezogen [14].

1.5.1.2 Plasma- oder extracelluläre GPX (pGPX oder eGPX)

Die pGPX wird hauptsächlich in den proximalen Tubuluszellen der Nieren und in der Lunge synthetisiert [125,126]. Sie stellt das extrazelluläre Isoenzym der GPX-Familie dar und reduziert Wasserstoffperoxid und Phospholipid-Hydroperoxid im Plasma [127]. Auch die pGPX-Aktivität wird als Marker für den Selenstatus herangezogen. Bei Selenmangel ist ihre Aktivität verringert, bei adäquater Selenversorgung erreicht sie ein Plateau [128].

1.5.1.3 Phospholipid-Hydroperoxid-GPX (PH-GPX)

Die PH-GPX ist eine intrazelluläre und teilweise membrangebundene Isoform, die Fettsäure-Hydroperoxide, die zu Phospholipiden verestert sind, sowie Hydroperoxide von Cholesterol und Cholesterolester in Membranen und Low-Density-Lipoproteinen (LDL) reduziert [129,130]. Die PH-GPX übt ihre Funktionen im Eicosanoidstoffwechsel und beim Schutz vor Lipidperoxidation aus. Die Verhinderung der LDL-Oxidation ist wichtig zur Vermeidung einer Arteriosklerose. Oxidierte LDL können von

Endothelzellen und Makrophagen in den Arterienwänden aufgenommen werden und dort zu Frühstadien der Arteriosklerose führen [14,131]. Die PH-GPX ist auch das Selenoprotein in der Mitochondrienkapsel der Spermien [28]. Die PH-GPX-Aktivität ist kein geeigneter Parameter zur Bestimmung des Selenstatus eines Individuums, da diese bei Selenmangel wesentlich langsamer als die der cGPX sinkt [132].

1.5.1.4 Gastrointestinale GPX (GI-GPX)

Die GI-GPX ist die Haupt-GPX-Isoform im Gastrointestinaltrakt und spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle zellulärer Redoxmechanismen, beim Schutz vor mit der Nahrung aufgenommenen Lipidhydroperoxiden und der Resistenz gegen die Karzinomentstehung. Sie befindet sich intrazellulär in den Mukosazellen [133,134].

1.5.2 Dejodase-Familie (5'-DI Typ I-II, 5-DI Typ III)

Die Enzyme der Dejodase-Familie regulieren den Schilddrüsenhormonstoffwechsel. Die 5'-DI Typ I und II katalysieren die Bildung von aktivem Trijodthyronin (T_3) aus dem Prohormon Tetrajodthyronin (T_4), das von der Schilddrüse sezerniert wird. Die 5-DI Typ III führt zur Dejodierung von T_3 und T_4 zu inaktiven Metaboliten [69].

1.5.3 Thioredoxinreduktase (TRR)

TRR reduziert Nukleotide in der DNA-Synthese und reguliert den intrazellulären Redoxstatus. TRR kann eine Vielzahl von Verbindungen reduzieren, z.B. Disulfide, Fettsäuren, Vitamin K3 und Dehydroascorbinsäure. Das natürliche Substrat der TRR ist das Thioredoxin. Dieses ist ein zentraler Regulator des zellulären Redoxstatus und damit wichtig für die Funktion von Transkriptionsfaktoren und Kernrezeptoren. Des Weiteren benötigt auch die Ribonukleotidreduktase reduziertes Thioredoxin für die Bildung von Desoxyribonukleotiden [14,69].

1.5.4 Selenophosphat-Synthetase

Derzeit sind zwei Formen der Selenophosphat-Synthetase bekannt, von denen nur der Typ 2 ein Selenoprotein darstellt. Dieses Enzym ist von entscheidender Bedeutung bei

der Biosynthese von Monoselenphosphat als Selenpender in biologischen Reaktionen, so auch beim schrittweisen Aufbau von Selenocystein an der Selenocysteyl-tRNA^{Sec} bei der Biosynthese von Selenoproteinen [80,135].

1.5.5 Biologische Funktionen von Selenoprotein P

Auch wenn die Funktion von SeP bisher noch nicht vollständig geklärt ist, so geben doch zahlreiche Untersuchungen Hinweise auf mögliche Funktionen, die SeP ausüben könnte.

Eine Rolle als antioxidatives Agens zum Schutz der Zellen vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gilt als sehr wahrscheinlich [57,82,105,116,136]. Bei Ratten beobachtete man unter Selenmangel spontane Leberzellnekrosen und Lipidperoxidation [137]. Den antioxidativen Schutzeffekt von Selen hat man früher generell der Glutathionperoxidase zugeschrieben. In einem Rattenmodell stellte sich aber heraus, dass durch Seleninjektion die durch Diquat und Paraquat induzierten Leberzellnekrosen und Lipidperoxidation deutlich vermindert werden können, bevor die Glutathionperoxidase-Aktivität ansteigt. Nachfolgende Forschungen ergaben, dass der schützende Effekt der Seleninjektion mit einem signifikanten Anstieg des SeP assoziiert ist [112,113].

Untersuchungen über die Auswirkungen des SeP-Spiegels im Plasma auf die Benzoat-Hydroxylierung durch Peroxynitrit ergaben für verminderte SeP-Spiegel eine signifikant höhere Hydroxylierungsrate. SeP-angereichertes Plasma kann danach die Hydroxylierung gegenüber Normalplasma deutlich verringern [136]. Vergleichbare Ergebnisse sind auch für pGPX [138] und TRR [139] bekannt. Peroxynitrit ist ein wichtiger Mediator inflammatorischer Toxizität und initiiert DNA-Einzelstrangbrüche, Lipidperoxidation und Nitratisierung von Tyrosinresten in Proteinen [105].

SeP bindet an Zellmembranen, besonders in Leber, Niere, Hirn und Hoden [120,140,141], es wird sogar ein spezifischer Membranrezeptor postuliert [140]. Es wird vermutet, dass SeP besonders im Gefäßsystem antioxidative Eigenschaften entfaltet, da es eine hohe Affinität zum Gefäßendothel besitzt [107]. Diese Affinität kommt wahrscheinlich durch zwei histidinreiche Domänen und weitere histidin- und lysinreiche Regionen sowie durch die Prävalenz basischer Aminosäuren zustande, die in vitro pH- und salzabhängig mit Heparin interagieren. Möglicher Zweck dieser SeP-

Bindung an Glycosaminoglycane könnte die Akkumulation von SeP an Zelloberflächen als antioxidatives Schutzschild sein. Durch die pH-Abhängigkeit dieser Bindung kann SeP besonders in entzündetem und hypoxischem Gewebe verstärkt an Zellmembranen binden [57,70,106,108,109].

SeP ist reich an Histidin, Cystein und Selenocystein und bildet mit Metallen wie Quecksilber, Silber und Cadmium stabile Komplexe [110,111]. Schwermetalle und Ungleichgewichte physiologisch im Gehirn vorkommender Metalle haben neurotoxische Eigenschaften und werden mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Amyotrophe Lateralsklerose in Verbindung gebracht [142]. Vor dem Hintergrund, dass Rinder-SeP in vitro ein Überlebensfaktor für Neurone in Zellkulturen darstellt [143], könnte der Schutz vor Schwermetallen im Hirn eine weitere mögliche Funktion von SeP sein. Es ist aber noch unklar, ob SeP Metalle detoxifizieren kann.

Für SeP konnte auch eine leichte Phospholipid-Hydroperoxidase-Aktivität nachgewiesen werden, wenn auch etwa 100fach geringer als die der PH-GPX und im Gegensatz zur PH-GPX, die intrazellulär lokalisiert ist, im Extrazellulärraum. Durch die unterschiedliche Substratspezifität der antioxidativen Selenoproteine innerhalb (cGPX, PH-GPX, GI-GPX, TRR) und außerhalb der Zellen (SeP, pGPX) ist ein auf das jeweilige Kompartiment abgestimmter und im Zusammenspiel suffizienter Schutz vor ROS gewährleistet [129].

Der SeP-Gehalt im Plasma gilt als guter Marker für den Selenstatus eines Individuums. Dabei besteht eine lineare Korrelation zwischen Plasma-SeP-Spiegel, Plasmaselen Spiegel und der Aktivität der pGPX, vor allem in selenarmen Gebieten [118,119,144,145]. In selenreichen Gebieten besteht eine deutlich geringere Korrelation, wahrscheinlich aufgrund der Plateaubildung von SeP bei hohen Selenkonzentrationen im Plasma [144,145]. Bei Versuchen, den Plasma-SeP-Spiegel bei selendefizienten Personen zu erhöhen, stellten sich Selen-Hefe, Selen-Weizen und Selenat, also organische und anorganische Selenverbindungen, als gleichwertig heraus. Nach zwei Wochen Substitution bildete sich ein Plateau der SeP-Konzentration aus. Bei Personen mit hohem Selenstatus ergab die zusätzliche Substitution keine signifikante Erhöhung der SeP-Konzentration [118,145]. Im Gegensatz dazu ergab eine weitere

Substitutionsstudie für Selenomethionin und Selenat keinen signifikanten Effekt auf die Plasma-SeP-Konzentration [12]. Es zeigte sich aber, dass organische Selenformen mehr als anorganische den Plasmaselenspiegel anheben können, da die organischen einem unspezifischen Seleneinbau in Proteine unterliegen. Dagegen werden die anorganischen vor allem über den Selenwasserstoff-Pool spezifisch in Selenoproteine eingebaut [12,145].

Auf immunhistochemische Färbungen von SeP hat Selenmangel keinen nennenswerten Einfluß bezüglich der Farbintensität, obwohl die Plasmakonzentration von SeP bei Selenmangel bei 8% der Kontrolle lag. Daraus kann abgeleitet werden, dass gewebegebundenes SeP besser zurückgehalten wird als das SeP im Plasma [146].

Innerhalb der Gruppe der Selenoproteine gibt es offenbar eine Hierarchie, was die Versorgung mit Selen betrifft [35-39]. Bei Versuchen an Ratten stellte sich heraus, dass während einer selendefizienten Diät in der Leber die Verringerung der mRNA von SeP geringer ist als von cGPX. Auf Proteinebene war die Reduktion der Plasma-SeP-Konzentration bzw. der Leber-cGPX-Aktivität noch stärker ausgeprägt [36]. Der Selenmangel veränderte aber nicht die Transkriptionsraten der mRNA für die jeweiligen Selenoproteine. Daher wird die Verringerung der mRNA aufgrund einer Regulation durch vermehrten mRNA-Abbau diskutiert [11,70]. Nach Selengabe stieg die Plasma-SeP-Konzentration deutlich früher und schneller an als die der pGPX und cGPX in der Leber. Bereits 30 Minuten nach Aufnahme von ⁷⁵Se-Selenit erschien ⁷⁵Se-markiertes SeP im Plasma [36,117,120]. Der Selenstatus hat keinerlei Einfluß auf die Plasma-Halbwertszeit von SeP. Diese liegt mit drei bis vier Stunden deutlich unter der von pGPX (zwölf Stunden) [120].

Eine Selentransport- und -speicherfunktion für SeP vom Hauptsyntheseort in der Leber zu anderen Organen und Geweben wurde bereits 1982 von Motsenbocker und Tappel diskutiert [147], insbesondere zu den Nieren, wo SeP das Selen zur Synthese von pGPX bereitstellen soll [148], zu den Hoden [149] und zum Hirn [120]. Da hierzu aber SeP zerstört werden müsste, weil das Selen im Protein kovalent gebunden ist [70,120], und SeP in den meisten untersuchten Geweben synthetisiert wird [114,116], wurde diese Funktion lange Zeit für nachrangig angesehen. In Zellkulturversuchen aber wurde durch Zugabe verschiedener selenhaltiger Verbindungen zu einem selenfreien Medium SeP

als der effektivste Selenversorger vor pGPX, Selenit, Selenocystin, Selenomethionin und Albumin ermittelt [150]. Durch Studien mit SeP-Knockout-Mäusen konnte jetzt gezeigt werden, dass SeP eine Schlüsselrolle in der Selenverteilung im Organismus einnimmt. Mit der Nahrung aufgenommenes Selen wird über die Biosynthese von SeP in der Leber als dessen Hauptsyntheseort und die Sekretion ins Blut im Organismus verteilt, insbesondere zum Gehirn, den Hoden und den Nieren. Homozygote $SeP^{-/-}$ -Mäuse zeigten eine schwere Verteilungsstörung von Selen im Organismus mit einer Anhäufung in der Leber und Unterversorgung der anderen Organe und des Plasmas. Dagegen zeigten bereits die mit einem SeP-Allel ausgestatteten heterozygoten $SeP^{+/-}$ -Mäuse eine weitgehende Normalisierung in der Selenverteilung durch Hochregulation der SeP-Biosynthese über das eine vorhandene Allel [34,151]. Somit ist die Selentransport- und -speicherfunktion die erste gesicherte Funktion von SeP.

1.5.6 SeP in der Karzinogenese

Über die Rolle von SeP in der Karzinogenese gibt es unterschiedliche Ergebnisse. Eine Studie von Persson-Moschos et al. (2000) [152] ergab für Karzinome des Respirations- und Gastrointestinaltraktes deutlich niedrigere prämorbidie Plasma-SeP-Spiegel als in der Kontrollgruppe. Außerdem wurden bei Rauchern signifikant niedrigere Plasma-SeP-Spiegel als bei Nichtrauchern gefunden, was mit den Ergebnissen anderer Studien mit Bestimmung des Selengehalts von Plasma, Gesamtblut, Erythrozyten und Zehennägeln übereinstimmt. Als Ursache wird eine leichte chronische Entzündungsreaktion bei Rauchern diskutiert, in deren Folge SeP herunterreguliert wird. Eine andere Erklärung wäre der Verbrauch von SeP bei der Abwehr von Peroxinitrit, das beim Rauchen entsteht.

Vergleiche von Plasma-SeP-Spiegel, Plasmaselenspiegel und pGPX-Aktivität bei Patienten in Nordamerika mit kolorektalen Adenomen und Karzinomen gegenüber Gesunden ergaben in einer Studie von Early et al. (2002) [153] keine signifikanten Unterschiede der Konzentrationen bzw. Aktivitäten. Es war lediglich eine leichte, nichtsignifikante Erniedrigung der Plasma-SeP-Konzentration und Plasmaselenskonzentration und Erhöhung der pGPX-Aktivität bei Karzinompatienten festzustellen. Somit leiden die Karzinompatienten nach Bestimmung mit derzeit üblichen Parametern nach

dieser Studie nicht unter Selen- oder SeP-Mangel. In einer ähnlichen Studie von Al-Taie et al. (2003) [154] in Deutschland konnte gezeigt werden, dass Patienten mit positiver Kolonadenomanamnese oder Träger eines Kolonadenoms erniedrigte Plasmaselenpiegel und pGPX-Aktivität gegenüber der Kontrollgruppe haben. Dieser Mangel konnte in der Studie durch orale Selenitgaben behoben werden und auch die cGPX-Aktivität der Kolonmukosa zeigte einen Anstieg, was darauf schließen läßt, dass das supplementierte Selenit in der Kolonmukosa zur Selenoproteinbiosynthese herangezogen wird. Eine mögliche Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse dieser Studien könnte die höhere durchschnittliche Selenzufuhr in Nordamerika im Vergleich zu Europa sein.

In der kolorektalen Schleimhaut werden die vier Selenoproteine GI-GPX, pGPX, TRR und SeP exprimiert. Die mRNA-Expression von GI-GPX- und SeP, zwei Selenoproteinen, bei denen eine protektive Rolle bei der Entwicklung von kolorektalen Karzinomen diskutiert wird, ist besonders hoch. In kolorektalen Adenomen wurde von Mörk et al. (2000) [133] eine im Vergleich zur gesunden Mukosa veränderte mRNA-Expression von GI-GPX (erhöht) und SeP (verringert) gefunden, wobei das veränderte Expressionsmuster dabei offenbar nicht vom Selenstatus abhängig war, da TRR- und pGPX-Expression unverändert blieben. Da es bisher keine Hinweise für eine signifikante lokale Freisetzung von SeP-herunterregulierenden Zytokinen in kolorektalen Adenomen oder stimulierende Effekte dieser Zytokine auf die GI-GPX-Expression gibt, bleibt eine Regulation über diesen Weg Spekulation.

2 Aufgabenstellung

Bestimmungen von SeP-mRNA aus Schleimhautbiopsien wurden bereits durchgeführt [115]. Als konsequente Weiterführung der Analyse der mRNA-Ebene der SeP-Biosynthese stand im Mittelpunkt dieser Arbeit die direkte Bestimmung von SeP mit dem Western Blot. Dabei waren folgende Aspekte von besonderem Interesse:

1. Inwieweit kann das Verfahren des Western Blots zur semiquantitativen Analyse des SeP-Gehalts in Rektumschleimhautbiopsien Anwendung finden?
2. Sind Unterschiede im SeP-Gehalt zwischen Biopsien von Patienten mit und ohne Selen substitution festzustellen? Wird das substituierte Selen in der kolorektalen Mukosa zur Biosynthese von Selenoproteinen wie SeP genutzt und ist das auch auf Proteinebene zu detektieren?
3. Sind Unterschiede im SeP-Gehalt zwischen Biopsien aus normaler Rektumschleimhaut und Rektumpolypen nachzuweisen? Spiegeln sich die in Studien gefundenen erniedrigten Plasma-SeP-Spiegel von Adenompatienten im SeP-Gehalt der normalen Rektummukosa und der Rektumadenome wieder?

Die Wahl von Schleimhautbiopsien aus dem Rektum beruht auf der Bedeutung von Selen substitution besonders im Bereich der Prävention kolorektaler Adenome und Karzinome und der diskutierten Beteiligung von SeP an diesem präventiven Effekt, das im kolorektalen Bereich stark exprimiert wird.

3 Material und Methoden

3.1 Reagenzien und Apparaturen

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Acrylamid	Serva
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniumpersulfat	Sigma
Antikörper: Kaninchen (rp1, rp2) Huhn (cp1, cp2)	Eurogentec Davids Bio- technology
Bio-Rad-Protein-Assay-Reagenz	Bio-Rad
Bisacrylamid	Serva
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Sigma
Coomassie-Blau 250 R	Merck
Desoxycholat	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
ECL-Lösungen 1 und 2	Amersham
EDTA	Sigma
Eisessig	Merck
Essigsäure	Roth
Glycerin	Sigma
Glycin	Serva
HCl, rauchend	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
KCl	Roth
LIDS	Serva

Reagenz	Hersteller
Marker P 1677	Sigma
Marker SDS 7	Sigma
Mercaptoessigsäure	Sigma
Methanol	Merck
NaCl	Sigma
NaF	Merck
NaOH-Plätzchen	Roth
Nonidet P-40	Sigma
Peroxidase-gekoppelter Antikörper: Anti-Huhn Anti-Kaninchen	Dianova Sigma
Ponceau S	Roth
Probenpuffer Roti-Load	Roth
Protease-Inhibitor Cocktail Tablets (EDTA-frei)	Boehringer
SDS	Serva
Silver Stain-Färbelösung	Bio-Rad
Sulfosalicylsäure	Sigma
TEMED	Bio-Rad
Trichloressigsäure	Merck
Tris	Roth
Tris-HCl	Roth
Triton X-100	Sigma
Tween 20	Sigma

Tabelle 2: Verwendete Apparaturen

Apparatur	Hersteller
Bio-Rad Mini Protean II Elektrophorese- und Blotkammer	Bio-Rad
Centricon 100 Zentrifugenfiltersystem	Millipore/Amicon
Densitometer, EDV-Auswertung	Vilber Lourmat, Bio-Profil Image Analysis Software Bio1D Version 99.01
Elektrophoresis Power Supply PS 3003	Gibco BRL
Filmentwicklungsautomat Curix 60	Agfa
HiTrap-Heparin-Agarose-Säule	Pharmacia
Kunststoffküvetten	Sarstedt
Micro-Dismembrator II	Braun
Nitrocellulosemembran Optitran BA-S 85 0,45 µm	Schleicher und Schuell
pH-Meter	WTW
Photometer Uvicord III	Pharmacia
Pipetten	Eppendorf
Potter S Homogenisator	Braun
Power Pac 300	Bio-Rad
Röntgenfilme X-OMAT und BIOMAX	Kodak
Ultrafree-Zentrifugenröhrchen	Millipore/Amicon
Ultraschallsonde Labsonic U	Braun
Waagen	Mettler
Zentrifugen	Heraeus

3.2 Prinzip des Western Blots

Der Western Blot ist ein immunologisches Nachweisverfahren für Proteine. Dabei werden die Proteine einer Probe zuerst elektrophoretisch aufgetrennt (z.B. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [155]) und anschließend durch elektrische Diffusion aus dem Polyacrylamidgel auf eine Membran (z.B. Nitrocellulose) transferiert (d.h. geblottet). Durch die darauffolgende spezifische Antigen-Antikörperbindung und Farbreaktion kann das nachzuweisende Protein detektiert werden (Abbildung 4). Nähere Einzelheiten zu den einzelnen Abschnitten werden in den jeweiligen Kapiteln ausgeführt.

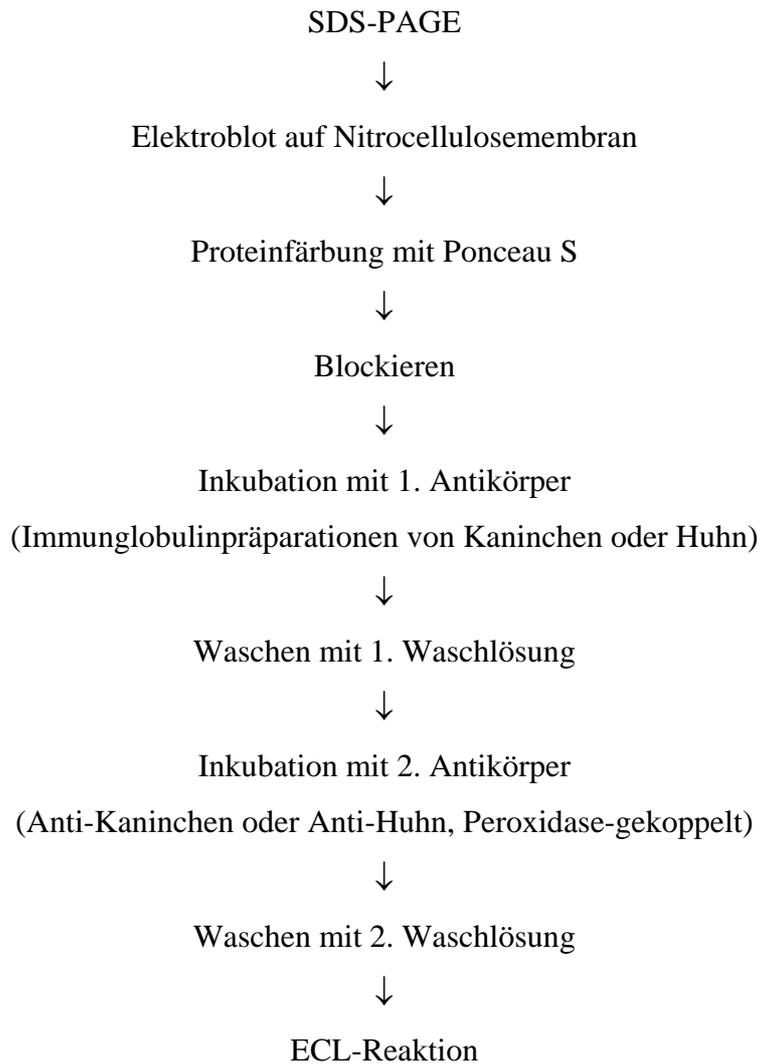


Abbildung 4: Schema des Western Blots [156].

3.3 Probenaufbereitung

3.3.1 Proben

Als Proben wurden Schleimhautbiopsien verwendet, die Patienten im Rahmen von Koloskopien entnommen worden waren. Die Patienten wurden zuvor über die Verwendung der Biopsien aufgeklärt und willigten ein. Ein Großteil der Biopsien stammte aus einer Selensubstitutionsstudie an der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg (Leitung der Studie: PD Dr. F. Jakob). In diese Studie waren Patienten mit sporadischem Kolonadenom, d.h. ohne familiäre Belastung bezüglich kolorektaler Tumore (HNPCC, FAP, kolorektales Karzinom), aufgenommen worden. Diese Patienten

nahmen doppelblind über einen Zeitraum von drei Monaten fünf mal täglich 100 µg Selen in Form von Natriumselenitpentahydrat gelöst in 0,9%iger Kochsalzlösung (selenase von GN Pharm, Fellbach) oder Placebo ein. Sowohl vor Beginn der Einnahme als auch bei der koloskopischen Kontrolluntersuchung nach drei Monaten wurden Biopsien entnommen. Zusätzlich wurden vor Beginn der Seleneinnahme, nach sechs Wochen und nach drei Monaten Blut entnommen, das im Rahmen der Studie weiter analysiert wurde. Dieses Studiendesign, einschließlich der Gewebentnahmen wurde von der Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt. Die in dieser Arbeit analysierten Biopsien der Studie waren allesamt Biopsien der Kontrolluntersuchung nach der dreimonatigen Einnahme von Selen bzw. Placebo.

Von den Patienten der Selensubstitutionsstudie standen folgende Biopsien als Proben zur Verfügung (Tabelle 3a):

- Biopsien gesunder Rektumschleimhaut von Patienten, die doppelblind ein Placebo eingenommen hatten (Proben-Nr. 4 R-, 5 R-, 7 R-, 10 R-, 12 R-, 15 R-, 17 R-, 20 R-, 22 R-, 23 R-).
- Biopsien gesunder Rektumschleimhaut von Patienten, die doppelblind Selen eingenommen hatten (Proben-Nr. 1 R+, 3 R+, 6 R+, 8 R+, 9 R+, 13 R+, 16 R+, 18 R+, 19 R+, 21 R+, 23 R+).
- Rektumadenombiopsien von Patienten, die doppelblind ein Placebo eingenommen hatten (Proben-Nr. 12 P-, 15 P-, 20 P-).
- Rektumadenombiopsie von einem Patienten, der doppelblind Selen eingenommen hatte (Proben-Nr. 16 P+).

Folgende Biopsien von Personen, die nicht an der Selensubstitutionsstudie teilnahmen standen als Proben zur Verfügung (Tabelle 3b):

- Biopsien gesunder Rektumschleimhaut (Proben-Nr. 50 R bis 54 R).
- Biopsie eines Polypen (Proben-Nr. 51 P).

Als SeP-Standardprobe wurde eine Rektummukosapräparation von gesunder Schleimhaut eines einzelnen Patienten verwendet, die im Rahmen einer Darmresektion angefallen war.

Tabelle 3a: Liste der verwendeten Biopsien

in Selensubstitutionsstudie:		
Patienten-Nr. ¹⁾	Gewebeart: (normales Rektum: R; Rektumpolyp: P)	Selengabe: (Verum: + ; Placebo: -)
1	R	+
3	R	+
4	R	-
5	R	-
6	R	+
7	R	-
8	R	+
9	R	+
10	R	-
12	R, P ²⁾	-
13	R	+
15	R, P ²⁾	-
16	R, P ²⁾	+
17	R	-
18	R	+
19	R	+
20	R, P ²⁾	-
21	R	+
22	R	-
23	R	-

Tabelle 3b: Liste der verwendeten Biopsien

nicht in Selensubstitutionsstudie:		
Patienten-Nr. ¹⁾	Gewebeart: (normales Rektum: R; Rektumpolyp: P)	
50	R	³⁾
51	R, P ²⁾	³⁾
52	R	³⁾
53	R	³⁾
54	R	³⁾

¹⁾ Bei den Patienten in der Studie mit den Nummern 2, 11 und 14 war nicht genug Biopsiematerial zur Durchführung der Western Blot Analyse vorhanden (Patienten sind nicht aufgeführt).

²⁾ Bei diesen Patienten lagen Biopsien sowohl von normaler Rektumschleimhaut, als auch von Polypengewebe vor.

³⁾ Diese Patienten haben an der Selensubstitutionsstudie nicht teilgenommen. Sie haben weder Verum, noch Placebo bekommen.

3.3.2 Methoden der Probenaufbereitung

3.3.2.1 Grundlagen

Um die Proteine der Biopsien auftrennen zu können, muss zuerst die Zellstruktur zerstört werden. Für die Lyse von Zellen stehen unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. Im folgenden wird auf die Verfahren mit Potterhomogenisator, Dismembrator und Ultraschall näher eingegangen, da diese auch in der vorliegenden Arbeit Anwendung fanden.

Das Zermahlen von Geweben und Zellen kann mehr oder weniger sanft erfolgen. Es kann per Hand mit Mörser und Pistill oder mit einem motorgetriebenen Potterhomogenisator durchgeführt werden. Für die verschiedenen Anwendungen kann man zwischen verschiedenen Materialkombinationen (Glas oder Keramik) bei Gefäß und Kolben wählen. Eine Steigerung der Effektivität kann durch Zugabe eines Schleifmittels erzielt werden, wie z.B. fein pulverisiertes Aluminium oder Glasperlen.

Eine weitere Art der Gewebezetrümmerung ist mit einem Dismembrator möglich. Hierbei erfolgt eine mechanische Gewebs- und Zellzetrümmerung durch eine inerte Metallkugel in einem Teflonbehälter, der sehr schnell hin und her bewegt wird.

Neben diesen beiden Methoden, die sich auch für größere Gewebeproben eignen, stellt die Zerkleinerung mittels Ultraschall eine Methode dar, die sich besonders für kleine Probenvolumina eignet. Dabei wird Ultraschall mit hoher Intensität über eine Sonde in die Probenlösung geleitet. Die durch die Ultraschallwellen hervorgerufenen Stöße und Vibrationen führen zur Zerstörung des Gewebes und der Zellen. Auch hier können zusätzlich Glasperlen eingesetzt werden.

Das zentrale Problem all dieser Methoden ist die teilweise erhebliche Wärmeentwicklung, weshalb eine stetige Kühlung durch Eiswasser oder Trockeneis gewährleistet sein muss. Auch ein fraktioniertes Vorgehen mit Pausen zur Abkühlung kann notwendig sein.

Nach der Zertrümmerung der Zellen muss das Lysat stabilisiert werden. Deshalb wird der pH-Wert mit Puffern im physiologischen Bereich gehalten und durch Zugabe von Protease-Inhibitoren der Proteinabbau durch zelleigene Proteasen verhindert. Diese Proteasen kommen in vivo normalerweise nur unter streng regulierten Bedingungen in ihrer aktiven Form mit ihrem Substrat in Kontakt, bei der Zerstörung der Zellstrukturen

und Zellorganellen werden sie aber unkontrolliert freigesetzt. Zur Aufbewahrung werden die Lysate bei -20 °C bis -80 °C gelagert, wobei es aber für einzelne Proteine, besonders Enzyme, besondere Temperaturen größter Stabilität gibt [157].

3.3.2.2 Durchführung

Aufgrund der geringen Probenmengen und des zu erwartenden geringen Gehalts an SeP sollte eine Aufbereitungsmethode gewählt werden, bei der das Material mit möglichst wenig Flüssigkeit verdünnt wird, um hohe Proteinkonzentrationen im Lysat zu erhalten und dadurch den Nachweis zu erleichtern.

Als Lösung für die Aufbereitung der Biopsien wurde eine phosphatgepufferte Lösung mit pH 7,4 (PBS) verwendet. In diese wurde eine Mischung aus mehreren Protease-Inhibitoren für Zellextrakte hinzugegeben (Protease-Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-frei, Auflösung nach Herstellervorschrift; Boehringer, Mannheim), die die Proteine vor enzymatischem Abbau schützen.

Tabelle 4: Phosphatgepufferte Lösung mit pH 7,4

Substanz	eingesetzte Menge
NaCl	80 g
KCl	2 g
Kaliumdihydrogenphosphat	2 g
Dinatriumhydrogenphosphat	14,5 g
Wasser	ad 10 l

Nach jeder der drei nachfolgend aufgeführten Aufbereitungsmöglichkeiten folgte die Zentrifugation bei 12000 U/min und 4 °C für 15 Minuten. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Proteinbestimmung durchgeführt.

3.3.2.2.1 Probenaufbereitung mit Potterhomogenisator

Verwendet wurde eine Glas-Glas-Kombination von Kolben und Gefäß (Potter S Homogenisator; B. Braun, Melsungen). Die Biopsien wurden in ca. 500 µl PBS/Protease-Inhibitor im Potterglas mit Eiswasserbad-Kühlung für ein bis drei Minuten gepottert. Dabei wurde die Geschwindigkeit langsam von gering bis mittel (ca. 800 U/min) gesteigert.

3.3.2.2 Probenaufbereitung mit Dismembrator

Das Teflonei und die Kugel wurden auf -80 °C gekühlt. Die Biopsien wurden eingefüllt und nochmals in flüssigem Stickstoff gut durchgekühlt. Anschließend wurde das Teflonei in den Dismembrator (Micro Dismembrator II; B. Braun, Melsungen) eingespannt und für eine Minute langsam die Amplitude erhöht (max. 0,5 bis 0,75 der Gesamtamplitude). Danach mußte das Teflonei wieder in flüssigem Stickstoff gekühlt werden. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Nach dem letzten Durchlauf wurden 300 µl PBS/Protease-Inhibitor zur Probe im Teflonei dazupipettiert und auf Raumtemperatur erwärmt, bis die Probe in ein Eppendorfgefäß überführt werden konnte. Um Reste des Biopsiematerials aus dem Teflonei zu entfernen, wurde dieses mit ca. 200 µl PBS/Protease-Inhibitor noch einmal nachgespült und dieses Volumen zur Probe hinzugefügt.

3.3.2.3 Probenaufbereitung mit Ultraschall

Die Biopsien wurden in ca. 300 µl PBS/Protease-Inhibitor auf Eis für ein bis zwei Minuten fraktioniert sonifiziert. Um Verunreinigungen zu entfernen, wurde mit der Ultraschallsonde (Labsonic U; B. Braun, Melsungen) vor und nach Gebrauch 30 Sekunden lang in Wasser geschallt.

3.3.3 Weitere Probenaufbereitungen

Um die SeP-Konzentration in der Probe durch Beseitigung von nicht-SeP-haltigen Proteinfractionen zu erhöhen, wurden im Anschluß an die Lyseverfahren noch zwei zusätzliche Aufbereitungsverfahren getestet.

3.3.3.1 Zentrifugenfilter Centricon 100

Ziel dieser Nachbehandlung war es, Teilchen mit einem Molekulargewicht von mehr als 100 kD aus der Probe herauszufiltrieren, da das erwartete Molekulargewicht von SeP im Bereich unterhalb von 100 kD liegt. Somit wurde bei der Proteinbestimmung und bei der Elektrophorese "störendes" und für den Nachweis von SeP unwichtiges Protein aus der Probe entfernt.

Die Probe wurde auf die Filtermembran des Centricon 100 Zentrifugensystems (Millipore/Amicon, Eschborn) gegeben und solange zentrifugiert, bis das Probenvolumen nahezu vollständig durch die Filtermembran zentrifugiert war. Ein Probenvolumen von 500 µl mußte bei max. 1000 g 30-40 Minuten bei 4 °C zentrifugiert werden (Herstellerangabe).

3.3.3.2 Heparin-Agarose-Säule

Bei diesem Verfahren wurde die Affinität von SeP zu Heparin zum Aufkonzentrieren des SeP in der Probe ausgenutzt [124].

Verwendet wurde eine 1 ml HiTrap Heparin-Agarose-Säule (Pharmacia, Freiburg), die zuerst zehnmal mit eiskaltem Waschpuffer gewaschen wurde, bis die Absorption bei 280 nm, gegen Waschpuffer als Leerprobe gemessen, bei Null war. Die Absorptionsmessung zur Bestimmung des Proteingehalts erfolgte in Quarzküvetten mit einer Deuteriumlampe im Photometer.

Tabelle 5: Waschpuffer mit pH 7,4

Substanz	eingesetzte Menge	Konzentration der Lösung
Ammoniumacetat	0,7708 g	100 mM
Tris-HCl	0,788 g	50 mM
Wasser	ad 100 ml	

Die weiteren Schritte wurden im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt.

Zuerst wurden 0,5-1 ml Probe auf die Säule aufgetragen und dann 1 ml Waschpuffer hinzugefügt. Anschließend wurden 10-20 ml Elutionspuffer aufgetragen und das Eluat in 1 ml-Fractionen in Eppendorfgefäßen aufgefangen.

Tabelle 6: Elutionspuffer mit pH 7,4

Substanz	eingesetzte Menge	Konzentration der Lösung
Ammoniumacetat	15,416 g	2 M
Tris-HCl	0,788 g	50 mM
Wasser	ad 100 ml	

Die Absorption der einzelnen Fractionen wurde nun jeweils in derselben Quarzküvette im Vergleich zu reinem Elutionspuffer als Leerprobe gemessen. Im Verlauf der Mes-

sung erschienen zwei Absorptionspeaks. Der erste Peak entsprach den in der Probe enthaltenen Proteinen, deren Affinität zur Heparinsäule schwächer war als die des SeP („Protein-Peak“). Der zweite Peak enthielt SeP („SeP-Peak“). Die Eluate des SeP-Peak wurden vereinigt und mit Ultrafree-Zentrifugenröhrchen (Filter mit 10 kD Porengröße; Millipore, Eschborn) durch Zentrifugation bei 4 °C auf ein Volumen von 50-100 µl aufkonzentriert.

Die Heparin-Säule wurde mit Waschpuffer bei Raumtemperatur regeneriert, bis die Absorption bei 280 nm gegenüber der Waschpuffer-Leerprobe wieder Null betrug. Die regenerierte Säule wurde mit Waschpuffer beschichtet und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Im Anschluß an die Nachbehandlung der Proben durch Zentrifugation mit Centricon 100-Röhrchen oder mit der Heparin-Agarose-Säule wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. Wegen hoher Verluste des in geringer Konzentration vorliegenden SeP bzw. zu großer Verdünnung wurde von Aufbereitungen der Lysate mit Centricon 100 bzw. Heparin HiTrap-Säule jedoch im optimierten Versuchsablauf abgesehen.

3.4 Proteinbestimmung

3.4.1 Grundlagen

Die Proteinbestimmung wurde mit dem Bio-Rad-Protein-Assay-Reagenz (Bio-Rad, München) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein einfaches colorimetrisches Verfahren zur Bestimmung der Gesamtprotein-Konzentration einer Probe. Es basiert auf dem Färbeverfahren nach Bradford [158], bei dem die Farbänderung von Coomassie Brilliantblau G-250 in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration der Lösung spektral-photometrisch festgestellt wird. Der Farbstoff Coomassie Brilliantblau G-250 ist in Abwesenheit von Protein rot und hat sein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 465 nm. Bei Zugabe von Protein zur Farblösung erfolgt ein Farbumschlag und das Absorptionsmaximum wird auf 595 nm verschoben, der Farbstoff erscheint blau. Der Farbumschlag kommt durch Bindung des Farbstoffes an basische Aminosäuren, besonders Arginin, und aromatische Aminosäuren zustande [159]. Durch Messung der Absorption der Coomassie Brilliantblau G-250-Farblösung bei 595 nm, versetzt mit

verschiedenen Standardproteinlösungen bekannter Konzentrationen, z.B. Rinderserumalbumin oder Rindergammaglobulin, läßt sich eine Standardkurve erstellen. Durch Interpolieren kann man über die Absorption bei 595 nm die Proteinkonzentration einer unbekannt Probe ermitteln. Sehr vorteilhaft an dieser Methode ist, dass der Farbstoff-Protein-Komplex sehr stabil ist. So ist die Farbentwicklung bereits nach zwei Minuten komplett abgeschlossen und bleibt anschließend für etwa eine Stunde nahezu konstant. Zu beachten ist lediglich, dass der Farbstoff-Protein-Komplex an quarzhaltige Glasküvetten bindet. Daher wurden Plastikkuvetten verwendet.

3.4.2 Durchführung

Die Proteinbestimmung wurde direkt aus den zentrifugierten Lysaten durchgeführt. Sowohl von der Eichgerade als auch von den Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen.

Das Bio-Rad-Protein-Assay-Reagenz wurde mit Wasser im Verhältnis 1:5 verdünnt eingesetzt. Zuerst wurde eine Eichgerade mit einem Standard-IgG (1,62 mg/ml) erstellt. Dabei wurde zu den Volumina (Proteinmenge in Klammern) 1,0 µl (1,62 µg), 2,5 µl (4,05 µg), 5,0 µl (8,1 µg), 7,5 µl (12,15 µg), 10,0 µl (16,2 µg), 15,0 µl (24,3 µg) und 20 µl (32,4 µg) Standard-IgG jeweils 1 ml Reagenzlösung in Kunststoffküvetten dazupipettiert. Von den Proben wurden je nach erwartetem Proteingehalt 0,5-5 µl mit jeweils 1 ml Reagenzlösung ebenfalls in Kunststoffküvetten zusammenpipettiert. Alle Küvetten wurden auf dem Vortex gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die photometrische Messung erfolgte bei der Wellenlänge 595 nm. Die Daten wurden abschließend EDV-gestützt (Excel, Microsoft) ausgewertet.

3.5 Elektrophorese

3.5.1 Grundlagen

3.5.1.1 Wanderung von geladenen Molekülen im elektrischen Feld

Die Elektrophorese ist eine leistungsfähige Methode, die zur Trennung von Makromolekülen, wie Proteinen, DNA oder RNA, in einem elektrischen Feld eingesetzt werden kann. Beim Western Blot wird sie als Gelelektrophorese, bei der zwei Kammern

mit Elektroden und Pufferlösung über das Gel in elektrischer Verbindung stehen, zur Trennung von Proteingemischen eingesetzt. Proteine besitzen saure (Glutamin- und Asparaginsäure) und basische (Lysin und Arginin) Aminosäuren in unterschiedlichen Anteilen in ihrer Aminosäuresequenz, woraus für jedes Protein ein bestimmter pK_s -Wert resultiert. Bei pH 9, dem für die Elektrophorese üblichen pH-Wert, sind die meisten Proteine negativ geladen, so dass diese beim Anlegen eines elektrischen Feldes auf die Anode zuwandern. Die dabei auf die mit der Ladung q geladenen Moleküle wirkende Kraft F_{el} im elektrischen Feld mit der Potentialdifferenz E zwischen den im Abstand d angebrachten Elektroden läßt sich mit folgender Formel beschreiben:

$$F_{el.} = \frac{E}{d} q \quad \text{mit} \quad \frac{E}{d} = \text{Feldstärke}$$

In Lösungen wirkt dieser Kraft die Reibung F_R nach der Stokeschen Gleichung entgegen:

$$F_R = 6\pi r \eta v$$

r ist der Radius des sphärischen Moleküls, η die Viskosität der Lösung und v die Geschwindigkeit des sich bewegenden Moleküls. In der Lösung wirken die Kraft des elektrischen Feldes und die Reibung entgegengesetzt, so dass gilt:

$$\frac{E}{d} q = 6\pi r \eta v \quad \text{durch Umwandlung:} \quad v = \frac{Eq}{d 6\pi r \eta}$$

Somit wird klar, dass die Geschwindigkeit des Moleküls in Lösungen proportional der Feldstärke und der Ladung des Moleküls, aber umgekehrt proportional seiner Größe und der Viskosität der Lösung ist. Dies beschreibt die Verhältnisse einer Elektrophorese in Zuckerlösung, jedoch nur sehr eingeschränkt für Polyacrylamid-Gelelektrophoresen, da die Gelstruktur nicht berücksichtigt ist. Rodbard und Chrambach [160] leiteten mathematische Gleichungen ab, in der die Struktur des Gels mit seiner Acrylamidkonzentration und somit die Porengröße berücksichtigt werden:

$$\log(M) = \log(M_0) - K_r \cdot T \quad \text{mit} \quad K_r = C (R + r)$$

Hierbei ist M die elektrophoretische Beweglichkeit (Geschwindigkeit), M_0 die freie Beweglichkeit in einer Zuckerlösung, T die Acrylamid-Gelkonzentration und K_r der Retardierungskoeffizient. Dieser Retardierungskoeffizient K_r ist eine Funktion des mittleren geometrischen Radius des Makromoleküls R und des Radius der Gelfasern r , die als viel länger als die Makromoleküle angenommen werden, mit einer Konstante C .

Hieraus ist ersichtlich, dass die Beweglichkeit der Proteine sowohl von der Ladung, und somit auch vom pH-Wert, als auch von der Größe, d.h. der Molekülmasse, abhängig ist. Dieses Ladung-Masse-Verhältnis von zwei gleich schweren Proteinen kann unterschiedlich sein, denn die Gesamtladung jedes Proteins hängt von der jeweiligen Aminosäuresequenz ab. Dies erschwert die elektrophoretische Auftrennung und macht Acrylamidkonzentrationsgradienten oder pH-Gradienten notwendig, wie sie bei nativer PAGE [161,162] oder isoelektrischer Fokussierung [163] angewendet werden. Die weitaus am häufigsten eingesetzte Elektrophoresetechnik ist aber die SDS-PAGE [155], da hierbei durch den Einsatz von SDS diese Probleme nicht auftreten und das Ladung-Masse-Verhältnis für alle Proteine gleich ist. Dies macht eine Molekülmassenbestimmung durch die Trennung im elektrischen Feld kontinuierlicher Gele möglich [157].

3.5.1.2 Besonderheiten der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Wichtig für aussagekräftige Elektrophoreseergebnisse ist, dass die Untersuchung in einem Medium durchgeführt wird, das nicht an die Probe bindet, nicht mit der Probe reagiert und in dem keine oder nur sehr geringe Diffusion oder Konvektion stattfinden kann. Zu diesem Zweck werden Gele aus Polyacrylamid verwendet. Die Ausgangssubstanzen der Gele sind Acrylamid und N,N'-Methylen-bisacrylamid, Tetramethylen-diamin (TEMED) als Katalysator und Ammoniumpersulfat als Radikalbilder. Die Radikale werden auf das Acrylamid übertragen und setzen somit die Polymerisation zu einer langen Kette in Gang. Acrylamidpolymere sind lange Ketten, die aneinander vorbeigleiten können und keine Poren bilden. Dies geschieht erst durch Zugabe von N,N'-Methylen-bisacrylamid, einem doppelten Acrylamidmolekül mit zwei reaktiven Enden. Das Ergebnis ist eine Quervernetzung der Acrylamidketten mit einer durchschnittlichen Porengröße, die vom Vernetzungsgrad und somit vom Verhältnis Acrylamid zu N,N'-Methylen-bisacrylamid abhängt. Mit der Porengröße kann man den optimalen Trennbereich eines Gels für bestimmte Molekülmassenbereiche festlegen. Schwere Moleküle trennt man mit niedrig konzentrierten Gelen, leichte Moleküle mit höher konzentrierten, um die gesamte Elektrophoresestrecke für den jeweils interessanten Massenbereich optimal auszunutzen [157]. Die Trenngenauigkeit dieser

Methode liegt bei etwa zwei Prozent Massendifferenz, d.h. eine 40 kD-Bande kann von einer 41 kD-Bande, deren Protein um etwa zehn Aminosäurereste länger ist, unterschieden werden [164].

Um während der Elektrophorese konstante Bedingungen zu haben, werden zu deren Durchführung Pufferlösungen verwendet, die die folgenden Eigenschaften haben sollten:

Die Pufferlösungen dürfen nicht mit den Makromolekülen in Wechselwirkung treten, da sie sonst die Wanderungseigenschaften beeinflussen könnten. Desweiteren sollen sie den pH-Wert während der Elektrophorese konstant halten, um Ladungsverschiebungen und somit Beweglichkeitsveränderungen zu verhindern. Außerdem muss bei der Wahl des Puffers auf die geeignete Ionenstärke geachtet werden: Bei zu vielen Elektrolyten im Gel resultiert eine hohe Stromstärke bei einer niedrigen Spannung, wodurch sich eine geringe Wanderungsgeschwindigkeit, aber eine hohe Wärmeentwicklung ergibt. Bei zu wenigen Elektrolyten im Gel leiten die Proteine den Strom, wodurch unscharfe Banden erzeugt werden.

Die oben angesprochenen Probleme von unterschiedlichen Ladung-Masse-Verhältnissen bei gleich schweren Molekülen werden bei der SDS-PAGE nach Laemmli [155] elegant gelöst. Das stark negativ geladene SDS bindet in einem konstanten Verhältnis von 1,4 g SDS/g Protein [165], das entspricht etwa einem Molekül SDS pro zwei Aminosäureresten [164], an die hydrophoben Regionen von Proteinen und beschichtet es so mit einer stark negativen Ladung, die viel stärker negativ ist als die native Ladung des Proteins. Dabei ist es unwichtig, ob die native Ladung positiv oder negativ bei den Elektrophoresebedingungen wäre. Eine falsche Wanderungsrichtung eines Proteins aufgrund seines isoelektrischen Punktes oberhalb des Puffer-pH ist damit ausgeschlossen [165]. Durch die SDS-Beschichtung erhalten alle Proteine ein konstantes Ladung-Masse-Verhältnis und die Beweglichkeit der Proteine ergibt eine lineare Funktion der Logarithmen ihrer Molekülmassen. Die Porengröße des Gels wird dabei zum einzigen Faktor für die Proteintrennung und eine Molekülmassenbestimmung wird möglich. Zusätzlich dissoziieren unter diesen Bedingungen die einzelnen nichtkovalent gebundenen Untereinheiten von zusammengesetzten Proteinen auseinander, so dass die Molekülmassen der einzelnen Untereinheiten bestimmt werden können [157]. Nur bei sehr

weit auseinanderliegenden Molekülmassen der zu bestimmenden Proteine oder Untereinheiten, z.B. von sechs bis über 250 kD, werden diskontinuierliche Gele mit Acrylamidkonzentrationsgradient nach wie vor eingesetzt [165].

Um das Ende der Elektrophorese rechtzeitig zu erkennen, bevor Proteine aus dem Gel herauswandern, wird ein Referenzfarbstoff, z.B. Bromphenolblau, den Proben zugesetzt, der schneller als die Proteine im Gel wandert. Bei Ankunft des Farbstoffes am unteren Gelrand wird die Elektrophorese gestoppt. Dadurch wird sichergestellt, dass kein Protein aus dem Gel in die Pufferlösung verlorenght [157].

Nach der Elektrophorese können die Proteinbanden im Gel mit verschiedenen Methoden sichtbar gemacht werden. Bei radioaktiv markierten Proteinen kann man durch Auflegen eines Röntgenfilmes die Banden detektieren. Daneben gibt es noch zahlreiche nichtradioaktive Farbnachweisverfahren der Banden im Gel. Eine der häufigsten Färbungen ist die mit Coomassie Brilliantblau. Dieser Farbstoff hat eine große Empfindlichkeit, besonders in Anwesenheit von SDS [157]. Bereits 0,1 µg eines Proteins können dadurch sichtbar gemacht werden. Mit der Silberfärbung liegt die Nachweisgrenze sogar bei 0,02 µg [164]. Eine Weiterverarbeitung, z.B. Blotten, ist dann allerdings nicht mehr möglich.

3.5.2 Durchführung

In dieser Arbeit wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [155,166] angewendet.

Mit der Elektrophorese werden die einzelnen Proteine, die in den Proben enthalten sind, nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Wahl der Gelkonzentration hängt davon ab, in welchem Gewichtsbereich die interessierenden Proteine erwartet werden. Je hochprozentiger das Trenngel ist, umso engmaschiger ist das Gel, desto langsamer wandern die Proteine und desto besser lassen sich niedermolekulare Proteine auftrennen. Bei hochprozentigen Gelen werden schärfere Banden erzielt, so dass auch sehr nahe beieinander liegende Molekülmassen getrennt detektiert werden können.

3.5.2.1 Gelherstellung

Für die SDS-PAGE wurden Gele verwendet, die aus einem niedrigprozentigen Sammelgel (3%) und einem hochprozentigen (8-12%) Trenngel bestanden. Zur Herstellung dieser Gele wurden folgende Lösungen benötigt:

Tabelle 7: 49:1 Acrylamid (AA)-Lösung für Sammelgel:

Substanz	eingesetzte Menge	Gewichtsanteil
Acrylamid	22,2 g	49
Bisacrylamid	0,453 g	1
Wasser	28,94 g	

ergibt 50 ml 49 Acrylamid : 1 Bisacrylamid-Lösung

Tabelle 8: 150:1 Acrylamid (AA)-Lösung für Trenngel:

Substanz	eingesetzte Menge	Gewichtsanteil
Acrylamid	88,8 g	150
Bisacrylamid	0,592 g	1
Wasser	116,86 g	

ergibt 200 ml 150 Acrylamid : 1 Bisacrylamid-Lösung

Tabelle 9: Vierfach-Sammelgelpuffer mit pH 6,8:

Substanz	eingesetzte Menge	Konzentration der Lösung
Tris	6,1 g	500 mM
SDS	0,4 g	0,4%
Wasser	ad 100 ml	
pH 6,8 mit 10 M HCl einstellen		

Tabelle 10: Vierfach-Trenngelpuffer mit pH 8,8:

Substanz	eingesetzte Menge	Konzentration der Lösung
Tris	90,8 g	3 M
SDS	1,0 g	0,4%
Wasser	ad 250 ml	
pH 8,8 mit 10 M HCl einstellen		

Die Elektrophorese wurde in der Elektrophoresekammer „Bio-Rad Mini Protean II“ (Bio-Rad, München) durchgeführt. Zuerst wurde das Trenngel gegossen und unmittelbar nach dem Gießen vorsichtig mit Wasser überschichtet. Dies gewährleistete eine gleichmäßige Polymerisation und ergab eine scharfe Grenze des auspolymerisierten Gels mit einer glatten Oberfläche. Ohne Überschichtung würde es zu einem konkaven Meniskus kommen und infolgedessen zu verzogenen Proteinbanden [157]. Nach 45-60 Minuten war das Trenngel auspolymerisiert. Nun wurde das überschichtete Wasser

abgegossen und Wasserreste mit Filterpapier vorsichtig abgesaugt. Dann wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Teflonkamm als Platzhalter für die Probestaschen luftblasenfrei eingesetzt. Nach ca. 20 Minuten war das Sammelgel auspolymerisiert und der Kamm konnte entfernt werden.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Gele

Bestandteile	Trenngel			Sammelgel 3%
	8%	10%	12%	
Wasser	5,6 ml	4,725 ml	3,85 ml	2,25 ml
AA 49:1				0,976 ml
AA 150:1	1,82 ml	2,26 ml	2,7 ml	
vierfach-Sammelgelpuffer				1,038 ml
vierfach-Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	
TEMED	3,3 µl	3,3 µl	3,3 µl	3,3 µl
APS	80 µl	80 µl	80 µl	17,4 µl

APS: 10%ige Ammoniumpersulfatlösung; Lagerung bei -20 °C

Die in Tabelle 11 angegebenen Volumina reichten für zwei Gele aus. TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) und APS (Ammoniumpersulfat) mussten schnell zugegeben werden, unmittelbar bevor das Gel gegossen wurde, da mit diesen beiden Komponenten die Polymerisation gestartet wurde. Bei zu langsamer Verarbeitung polymerisierte das Gel nicht gleichmäßig.

3.5.2.2 Probenvorbereitung für die SDS-PAGE

3.5.2.2.1 Grundlagen

Für die SDS-PAGE werden die Proben vor der Elektrophorese mit SDS und einem reduzierenden Agens, z.B. Mercaptoethanol oder Mercaptoessigsäure, für wenige Minuten gekocht. Dadurch denaturiert das Protein und durch Reduktion von Disulfid-Brückenbindungen kommt es zur Entfaltung der Polypeptidketten und Aufteilung in einzelne Untereinheiten bei zusammengesetzten Proteinen [167]. Durch die Zugabe von SDS werden die Proteine in einem konstanten Verhältnis von 1,4 g SDS/g Protein mit einer stark negativen Ladung beschichtet, wodurch alle Proteine ein konstantes Ladung-Masse-Verhältnis haben, die Grundlage zur Molekülmassenbestimmung mit Elektrophorese [157,165]. Mehrere Studien zeigten, dass es durch das routinemäßige fünfminütige Kochen der Proteinprobe in Anwesenheit von SDS und dem

reduzierenden Agens in bis zu zwei Prozent zu hydrolytischen Spaltungen des Proteinstrangs kommen kann, weshalb dieser Vorgang so kurz wie möglich gehalten werden soll [167,168]. Eine Verlängerung des Kochens auf mehr als 20 Minuten bewirkt eine deutliche Zunahme der Spaltprodukte [167]. Bevorzugte Bruchstellen sind Aspartyl-Prolyl-Bindungen, die noch vor allen anderen Aminosäureverbindungen unter sauren Bedingungen einer starken Hydrolyse unterliegen. Dadurch kann man reproduzierbare Bruchstücke erhalten und eine Sequenzanalyse von Proteinen durchführen [168]. Bei den meisten Anwendungen sind derartige Effekte jedoch unerwünscht und die Bedingungen werden nach Möglichkeit so gewählt, dass eine Säurehydrolyse von Proteinen nur in vertretbarem Maße stattfindet. Der Tris-Puffer nach Laemmli [155] hat beim verwendeten pH 6,8 (25 °C) bereits eine reduzierte Kapazität, da der pK_S (25 °C) bei 8,06 liegt. Der pK_S von Tris ist temperaturabhängig und liegt für 90 °C bei 6,24. Der experimentell bestimmte pH des nach Laemmli verwendeten Tris-Puffers bei 90 °C beträgt 5,2. Unter diesen Bedingungen ist es offensichtlich, dass säureempfindliche Bindungen sehr leicht hydrolysiert werden. Deshalb bietet sich die Verwendung eines Phosphatpuffers an, dessen pK_S nur sehr gering temperaturabhängig ist. Mit Phosphatpuffer pH 7,0 trat in den Versuchen von Cannon-Carlson [169] bei humanem IL-10 keine Spaltung auf, im Gegensatz zur Verwendung des Tris-Puffers pH 6,8. Bei Einsatz von Tris-Puffer pH 8,8 (25 °C) traten ebenfalls keine Spaltprodukte auf. Der bei 90 °C gemessene pH betrug 7,06. Dies läßt den Schluß zu, dass neutrale bis alkalische pH-Werte während der Präparation für die SDS-PAGE die Proteinstruktur, insbesondere die säureempfindlichen Aspartyl-Prolyl-Bindungen, stabilisieren und eine Hydrolyse verhindern.

3.5.2.2.2 Durchführung

Die Proben für die Elektrophorese wurden so bemessen, dass der Proteingehalt pro Geltasche 40 µg betrug. Zu viel Protein in der Geltasche führt aufgrund einer geringeren Aufkonzentrierung im Sammelgel zu unscharfen und verwaschenen Banden. Auch Wechselwirkungen mit den benachbarten Banden können vermehrt auftreten. Durch die geringe SeP-Konzentration in den Proben, musste diese relativ große Menge Protein pro Geltasche eingesetzt werden, da andernfalls die Signale bei der Detektion zu schwach

gewesen wären. Dafür wurde auch eine gewisse Unschärfe der Banden in Kauf genommen. Die Proben wurden mit dem reduzierenden Probenpuffer versetzt und auf annähernd gleiche Volumina gebracht. Unterschiedliche Volumina in zwei benachbarten Geltaschen bewirkten verzerrte und schiefe Banden bei der Elektrophorese.

Tabelle 12: Vierfach-Probenpuffer mit pH 6,8:

Substanz	eingesetzte Menge	Konzentration der Lösung
Tris	4,84 g	400 mM
LIDS 25%	16 ml	4%
Glycerin	30 ml	30%
MAC (98%)	1,453 ml	204 mM
Bromphenolblau	20 mg	0,02%
Wasser	ad 100 ml	
pH 6,8 mit 1 M HCl einstellen		

MAC: Mercaptoessigsäure

LIDS: Lithiumdodecylsulfat

Dieser vierfach-Probenpuffer wurde bei 4 °C gelagert.

Neben dem im Labor hergestellten vierfach-Probenpuffer wurde auch ein fertig käuflicher, reduzierender Phosphatprobenpuffer (Roti-Load; Roth, Karlsruhe) eingesetzt. Dieser wurde den Proben im Verhältnis 1:2 (Puffer : Probe) zugesetzt. Auch Verhältnisse von 3:4 und 1:1 (Puffer : Probe) wurden ausprobiert, fanden aber im weiteren Verlauf der Versuche keine Anwendung, da sie keine Verbesserung der Ergebnisse erbrachten. Zur besseren Durchmischung wurden alle mit Puffer versetzten Proben kurz auf dem Vortex gemischt.

Als Proteinmarker wurden zwei Marker der Firma Sigma (Deisenhofen) verwendet. Die Molekülmassen der Markerproteine sind in den beiden folgenden Tabellen aufgelistet.

Tabelle 13: Proteine und Molekülmassen des Markers P 1677

Proteine	Molekülmassen in kD
β-Galaktosidase (E. coli)	126,0
Fructose-6-P-Kinase (Kaninchenmuskel)	102,0
Pyruvatkinase (Hühnermuskel)	81,0
Ovalbumin (Hühnerei)	53,5
Lactatdehydrogenase	37,0
Triosephosphat-Isomerase	31,4

Tabelle 14: Proteine und Molekülmassen des Markers SDS 7

Proteine	Molekülmassen in kD
Albumin (Rind)	66,0
Albumin (Ei)	45,0
Glycerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase	36,0
Carboanhydrase (Rind)	29,0
Pankreas-Trypsinogen (Rind)	24,0
Trypsin-Inhibitor (Sojabohne)	20,0
α -Lactalbumin (Kuhmilch)	14,2

Die Proteine des Markers P 1677 sind kovalent vorgefärbt und dienen somit auch unter anderem als Laufweitenkontrolle während der Elektrophorese, die Angaben der Molekülmassen beziehen sich auf die Protein-Farbstoff-Komplexe.

Die Marker und die vorbereiteten Proben wurden für fünf Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt und danach bis zur Verwendung auf Eis aufbewahrt.

3.5.2.3 Elektrophorese

Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurde das Gel vom Gießstand genommen und in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Für die Durchführung wurden ein Anoden- und ein Kathodenpuffer benötigt.

Tabelle 15: Vierfach-Kathodenpuffer:

Substanz	eingesetzte Menge	Konzentration der Lösung
Tris	6,8 g	112 mM
Glycin	28,55 g	760 mM
SDS	2,0 g	0,4%
Wasser	ad 500 ml	

Der Kathodenpuffer wurde direkt vor Gebrauch fertiggestellt:

Tabelle 16: Gebrauchsfertiger Kathodenpuffer mit pH 8,4:

Substanz	eingesetzte Menge
vierfach Kathodenpuffer	100 ml
Wasser	ad 400 ml
MAC	84 μ l

Diese Menge ist für zwei Kammern ausreichend.

Der Kathodenpuffer wurde in die Elektrophoresezelle eingefüllt und die Zelle auf Dichtigkeit geprüft. Der Kamm wurde nun vorsichtig aus dem Gel gezogen und jede Geltasche zur Reinigung und zur Entfernung von Gelresten vorsichtig mit Kathodenpuffer gespült, so dass keine Gelschlieren mehr auftraten. Anschließend wurden die Proben eingefüllt (10-20 µl pro Geltasche). Die Randbahnen wurden mit Probenpuffer oder einem Standard bestückt, damit sich die Randeffekte nicht ins Gellinnere fortsetzen konnten. Nachdem alle Geltaschen gefüllt waren, wurde die Kammer zur Hälfte mit Anodenpuffer gefüllt.

Tabelle 17: Zehnfach-Anodenpuffer (Stocklösung):

Substanz	eingesetzte Menge	Konzentration der Lösung
Tris	15,1 g	250 mM
Glycin	71,4 g	1,9 M
Wasser	ad 500 ml	

Vor Gebrauch wurde der Anodenpuffer durch Verdünnung der Stocklösung im Verhältnis 1:10 fertiggestellt. 1000 ml gebrauchsfertiger Anodenpuffer war für zwei Kammern ausreichend.

Anfangs wurde eine Spannung von 110 V angelegt, bis die Proben nach 10-15 Minuten die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel erreicht hatten. Dann wurde die Spannung auf 220 V erhöht und solange belassen, bis die Farbbande des Probenpuffers nach etwa 40 Minuten die untere Gelgrenze erreicht hatte. Wenn das Gel nicht am selben Tag verarbeitet wurde, konnte es in Klarsichtfolie eingewickelt über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt werden.

3.6 Elektroblob

3.6.1 Grundlagen

Unter Elektroblob versteht man den quantitativen Transfer und die Immobilisation von elektrophoretisch getrennten Proteinen vom Polyacrylamidgel auf eine proteinabsorbierende Membran in einem elektrischen Feld. Diese Technik, die von Renart [170] und Towbin [171] erstmals 1979 als Western Blot etabliert wurde, macht eine Detektion und Auswertung aufgrund der spezifischen Proteineigenschaften mit Antikörpern und Substraten möglich. Es können dabei sehr geringe Mengen mit hoher Ausbeute bear-

beitet werden. Das Blotten wird erleichtert, wenn die Proteinkonzentration pro Bande im Gel möglichst hoch und der Vernetzungsgrad im Gel möglichst niedrig ist [167].

Es gibt zwei Prinzipien des Blottens: das Tank-Blotten und das Semidry-Blotten. Beim Tank-Blotten [172] werden Gel und Membran aneinander gelegt und von Filterpapier umgeben in einer Kassette zusammengepresst, um Verschiebungen zu verhindern, und vertikal in einen mit Transferpuffer gefüllten Behälter mit Platinelektroden an den Seiten gestellt. Um das blasenfreie Aneinanderliegen von Gel und Membran beim Packen der Kassette zu gewährleisten, sollte dies in einer mit reichlich Transferpuffer gefüllten Wanne erfolgen. Auf die korrekte Polung der Elektroden mit Anode auf der Seite der Membran ist zu achten, da sonst die Proteine aus dem Gel heraus in das Filterpapier und nicht auf die Membran wandern. Da beim Tank-Blotten mit einer Spannung von etwa 50 V Stromstärken von etwa 500 mA auftreten, ist eine effiziente Kühlung während des gesamten Blotvorganges erforderlich.

Im Gegensatz dazu erfolgt das Semidry-Blotten [173] in horizontaler Anordnung. Gel und Membran werden dabei zwischen puffergetränkte Filterpapierlagen gepackt. Um einen guten Kontakt von Gel und Membran zu gewährleisten, wird der fertig gepackte Stapel mit einem Gewicht von etwa 500 g beschwert. Die Semidry-Methode wird meist mit einer konstanten Stromstärke von 1 mA/cm^2 durchgeführt. Die Spannung während des Blottens hängt vor allem vom verwendeten Puffersystem, von der absoluten Puffermenge, d.h. von der Anzahl der Filterpapierlagen, der Geldicke und dem Elektrodenmaterial ab. Normalerweise treten Spannungen von 20-50 V auf. Da keine so hohen Stromstärken wie beim Tank-Blotten auftreten, kann auf die intensive Kühlung verzichtet werden.

Beim Blotten nach SDS-PAGE treten einige Probleme durch die Anwesenheit von SDS auf. In der Elektrophorese bewirkt die SDS-Zugabe zum Puffer die Beschichtung der Proteine mit negativen Ladungen und damit die Wanderung im elektrischen Feld mit konstantem Ladung-Masse-Verhältnis. Zusätzlich wird die Präzipitation der Proteine im Gel verhindert. Beim Blotten jedoch verhindern schon geringe Mengen SDS die Proteinadsorption an die Membran. Wie bei der Elektrophorese wandert auch beim Blotten der SDS-Protein-Komplex aufgrund der stark negativen Ladung des SDS. Da im Transferpuffer beim Blotten kein SDS enthalten ist und das SDS nur noch von der

Beschichtung der Proteine und den Resten des Elektrophoresepuffers im Gel stammt, wandert der SDS-Protein-Komplex auf die Anode zu in einem Medium kontinuierlich abnehmender Konzentration von freiem SDS. Dabei kommt es zu zunehmender Dissoziation des Komplexes und Freilegung von hydrophoben Regionen an der Proteinoberfläche, die mit der Membran interagieren. Durch die Dissoziation reduziert sich auch die Wanderungsgeschwindigkeit der SDS-Protein-Komplexe. Sehr leichte Proteine wandern aber so schnell, dass es nur zu einer geringen Dissoziation kommen kann und dadurch die Proteinbindung auf der Membran relativ schlecht ist. Durch Zugabe von Methanol zum Transferpuffer (bis zu 40%) wird die Dissoziation des Komplexes beschleunigt. Dies führt zu einer erhöhten Interaktion zwischen Protein und Membran, aber auch zwischen Protein und Gel, was besonders bei schweren und hydrophoben Proteinen nachteilig ist. Sehr schwere Proteine wandern so langsam aus dem Gel heraus, dass die Dissoziation bereits so weit fortgeschritten und die Wanderungsgeschwindigkeit dadurch so stark reduziert ist, dass sie im Gel präzipitieren. Hydrophobe Proteine präzipitieren sehr leicht bei zu geringer SDS-Beschichtung. Daher sollte bei schweren oder hydrophoben Proteinen keine Methanolzugabe zum Transferpuffer erfolgen. Jedoch muss bei ungeladenen, hydrophoben Membranen eine gewisse Methanolvorgabe vorhanden sein (10-20%), um Interaktionen zwischen Protein und Membranoberfläche zu ermöglichen. Bei schweren oder hydrophoben Proteinen empfiehlt sich eine minimale SDS-Zugabe zum Transferpuffer (bis zu 0,01%), um eine zu frühe Abdissoziation des SDS zu verhindern. Wie oben beschrieben wird dadurch aber die Proteinbindung an die Membran gestört und die Transferrate für hydrophile und leichte Proteine sinkt. Die jeweilige Stärke der Interaktionen eines Proteins mit SDS, Polyacrylamidgel und Membranoberfläche hängen von seiner Aminosäuresequenz ab [167].

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran kann zur Kontrolle des Blottens vor der immunchemischen Detektion mittels Antikörpern eine reversible Färbung der Banden mit Ponceau S erfolgen. Ein Vergleich mit einem identisch beladenen und nicht geblotteten, gefärbten Gel gibt Auskunft darüber, ob das Bandenmuster im Gel auch auf der Membran adäquat abgebildet ist.

3.6.2 Durchführung

Zur Immobilisation, Färbung und weiteren immunchemischen Detektion wurden die Proteine mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine mit Nitrocellulose beschichtete Kunststoffmembran (Optitran BA-S 85 0,45 μm ; Schleicher und Schuell, Dassel) geblottet (Tank-Blot). Der Puffer mußte vor Gebrauch gut gekühlt werden. Die einzelnen Schichten der Blotapparatur wurden in einer Wanne mit Transferpuffer getränkt und anschließend zusammengelegt. Die Reihenfolge der Schichten war wie folgt: Kunststoffvlies, Filterpapier, Nitrocellulosemembran, Gel, Filterpapier, Kunststoffvlies. Zum Blotten wurde folgender Transferpuffer benötigt:

Tabelle 18: Zehnfach-Transferpuffer mit pH 10 (Stocklösung):

Substanz	eingesetzte Menge
Tris	30 g
Glycin	144 g
Wasser	ad 1000 ml
pH 10 mit NaOH-Plätzchen einstellen	

Kurz vor Gebrauch wurde der Transferpuffer fertiggestellt:

Tabelle 19: gebrauchsfertiger Transferpuffer:

Substanz	eingesetzte Menge
zehnfach-Transferpuffer	100 ml
Methanol	200 ml
Wasser	ad 1000 ml
pH 10 kontrollieren	

Diese Menge ist für eine Kammer ausreichend.

Geblottet wurde für zwei Stunden bei 250 mA, wobei sich Spannungen zwischen 20 V und 30 V ergaben. Bei höheren Stromstärken bestand die Gefahr, dass die Membran Schaden durch zu hohe Temperaturen nahm. Um eine ausreichende Wärmeableitung zu gewährleisten wurde ein Eisblock in die Blotkammer eingesetzt und die gesamte Blotkammer in ein Eisbad gestellt.

3.7 Färbungen

Im Anschluß an den Blotvorgang wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau S reversibel gefärbt. Zusätzlich konnten im Gel zur Kontrolle, ob die Proteine vollständig auf die Nitrocellulosemembran übergegangen waren, eventuell im Gel verbliebene

Proteine mit anderen, meist irreversiblen Methoden (z.B. Coomassie-Blau oder Bio-Rad Silver Stain) gefärbt werden.

3.7.1 Membranfärbung mit Ponceau S

Die Arbeitslösung wurde durch die Verdünnung 1:10 der Stocklösung erhalten. Beide Lösungen mußten lichtgeschützt aufbewahrt werden.

Tabelle 20: Ponceau S (Stocklösung):

Substanz	eingesetzte Menge
Ponceau S	2 g
Trichloressigsäure	30 g
Sulfosalicylsäure	30 g
Wasser	ad 100 ml

Die Membran wurde für fünf bis zehn Minuten in die Färbelösung eingelegt und dabei leicht geschwenkt. Anschließend wurde die Färbelösung in ein lichtundurchlässiges Aufbewahrungsgefäß zurückgegeben, denn sie konnte wiederverwendet werden. Die Membran wurde anschließend mit entsalztem Wasser entfärbt, bis keine roten Schlieren beim Waschen mehr entstanden. Die Färbung der Banden sollte durch den Entfärbeprozess jedoch nicht verblassen. Zur Dokumentation wurde die gefärbte Membran photokopiert oder eingescannt. Da diese Färbung reversibel war und die Antikörper-Antigen-Reaktion nicht störte, konnte mit der Membran ein Western Blot durchgeführt werden.

3.7.2 Gelfärbung mit Coomassie-Blau

Die Coomassie-Färbung ist ein Nachweis für Proteine im Gel. Sie ist irreversibel. Diese Färbung kann sowohl vor als auch nach dem Blotten durchgeführt werden. Eine Färbung vor dem Blotten diente dem Sichtbarmachen des Bandenmusters der durch die Elektrophorese aufgetrennten Proteine der Probe im Gel. Das Gel konnte anschließend aber nicht mehr zum Blotten verwendet werden. Die Färbung nach dem Blotten diente der Kontrolle, ob im Gel noch Banden sichtbar wurden. Waren nach dem Blotten im Gel blaue Banden detektierbar, so wurden die Proteine nicht vollständig auf die

Membran transferiert. Auch hier konnte das Gel nicht weiter zur Durchführung eines Western Blots eingesetzt werden.

Tabelle 21: Zehnfach-Coomassie-Färbelösung (Stocklösung):

Substanz	eingesetzte Menge	Konzentration der Lösung
Coomassie-Blau 250 R	1 g	0,1%
Methanol	500 ml	50%
Essigsäure	100 ml	10%
Wasser	400 ml	40%

Die zehnfach-Coomassie-Färbelösung wurde filtriert und lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert. Auch die Arbeitslösung mußte lichtgeschützt aufbewahrt werden.

Tabelle 22: Coomassie-Arbeitslösung:

Substanz	eingesetzte Menge
zehnfach-Färbelösung	50 ml
Eisessig	50 ml
Methanol	250 ml
Wasser	ad 500 ml

Das Gel wurde für ca. 30 Minuten in die Coomassie-Arbeitslösung gelegt und anschließend unter leichter Schüttelbewegung zwei- bis dreimal mit Entfärbelösung entfärbt, um die Proteinbanden vor dem Gelhintergrund sichtbar zu machen.

Tabelle 23: Entfärbelösung 7%:

Substanz	eingesetzte Menge
Glycerin	35 g
Eisessig	50 ml
Methanol	59 ml
Wasser	ad 500 ml

3.7.3 Gelfärbung mit Bio-Rad Silver Stain

Die Silberfärbung ist ein sehr empfindlicher, irreversibler Nachweis für Proteine im Gel. Sie kann vor dem Blotting des Gels erfolgen, um das Verteilungsmuster und die Intensität der einzelnen Proteinbanden im Gel sichtbar zu machen.

Die Silberfärbung wurde in der vorliegenden Arbeit gemäß dem Protokoll von Bio-Rad (München) durchgeführt, um durch den Vergleich des gefärbten, nicht geblotteten Gels

mit einem von einem identisch beladenen Gel angefertigten Blot sicher zu sein, dass die wichtigsten Banden auch nach dem Blotten in der Ponceau S-Färbung sichtbar wurden.

3.8 Immunochemische Detektion mit Antikörpern

3.8.1 Grundlagen

Im Anschluß an den Transfer auf eine Membran sind die Proteinbanden einer immunochemischen Detektion zugänglich. Der große Vorteil dieser Methode ist die hohe Spezifität und das hohe Auflösungsvermögen. Es sind Bestimmungen bis in den Piktogramm-Bereich möglich. Dabei werden Antikörper gegen spezifische antigene Regionen für Antikörperreaktionen, sogenannte antigene Determinanten, eingesetzt. Ein Antikörper und sein entsprechendes Antigen bilden einen sehr stabilen Komplex, dessen maximale Bindungsstärke nur bei perfekter Komplementarität erzielt wird. Aber auch ohne vollständige Komplementarität können gute Bindungskomplexe zustandekommen. Es muss sich beim Antigen nicht um ein vollständiges Protein handeln, es genügt auch ein künstlich synthetisiertes Peptidstück der Aminosäuresequenz des Vollproteins (antigene Determinante), das an ein Trägermolekül, wie z.B. Rinderserumalbumin oder Keyhole Limpet Hämocyanin, gekoppelt ist [157].

Die Auswahl des Peptids erfolgt nach verschiedenen Kriterien, die für die Existenz einer antigenen Determinante innerhalb dieses Peptids sprechen. Der Grundgedanke ist, dass eine flexible oder oberflächenorientierte Region des Proteins am besten mit einem Antikörper reagieren kann. Besonders flexibel sind die Carboxyl- und Aminoterminalen eines Proteins. Bei der Aminoterminalen besteht jedoch das Problem, dass durch posttranslationale Modifizierung genau das ausgewählte Peptid abgespaltet wird und somit der Antikörper nicht mehr bindet. Für die Suche nach geeigneten proteininternen Regionen bieten sich zwei Analysemethoden an, die in der Primärstruktur eines Proteins besonders flexible (β -Schleifen) oder oberflächenorientierte (hydrophile) Regionen erkennen [174].

Chou und Fasman entwickelten eine Methode, mit der man aus der Primärstruktur eines Proteins auf dessen Sekundärstruktur schließen kann [175]. Dabei werden jeder Aminosäure Werte zugewiesen, die in Beziehung stehen zur Häufigkeit der Aminosäure in den Konformationen α -Helix (P_α), β -Faltblatt und β -Schleife (P_β) in 15 untersuchten

Proteinen, deren Struktur durch Röntgenkristallographie bekannt ist. Bei maximalen P_{α} -Werten in einer Region wird eine α -Helix gestartet und in beide Richtungen fortgesetzt bis P_{α} ein Minimum erreicht, wo die Helix endet. Analog wird bei maximalen P_{β} -Werten ein β -Faltblatt oder eine β -Schleife begonnen und beim Minimum beendet. Die Aminosäuren Glutamin, Alanin und Leucin haben die höchsten P_{α} -Werte und werden daher als starke α -Former bezeichnet, sie haben ein hohes Potential zur Bildung einer α -Helix. Dagegen werden Prolin und Glycin wegen der niedrigsten P_{α} -Werte als starke α -Brecher bezeichnet, sie beenden eine α -Helix. Für β -Faltblatt und β -Schleife gelten analog die Aminosäuren Methionin, Valin und Isoleucin als starke β -Former, Glutamin als starker β -Brecher. Wenn innerhalb von sechs Aminosäuren vier Helixformer oder innerhalb von fünf Aminosäuren drei β -Former vorhanden sind, startet die entsprechende Sekundärstruktur in beide Richtungen, bis sie von Tetrapeptiden aus α - bzw. β -Brechern beendet wird. Die Vorhersagegenauigkeit dieser Methode liegt für die α -Helix bei 80%, für die β -Strukturen bei 86% [176].

Hopp und Woods entwickelten ein Computerprogramm, mit dem man antigene Determinanten in der Primärstruktur erkennen kann [177]. Das Programm basiert auf der Annahme, dass es Regionen lokaler Hydrophilie entlang der Peptidkette gibt. Antigene Determinanten sind oberflächenorientiert und haben eine überdurchschnittlich hohe Exposition zu wässrigen Flüssigkeiten im Körper. Regionen in der Primärstruktur mit zahlreichen hydrophilen, polaren und geladenen Aminosäureseitenketten sind daher potentiell antigen. Jeder Aminosäure wird entsprechend ihrer hydrophilen Eigenschaften ein Wert zugewiesen. Diese Werte werden in der gesamten Peptidkette für Abschnitte von je sechs Aminosäuren gemittelt, da diese Länge der durchschnittlichen Länge einer antigenen Determinante entspricht [178]. Der Maximalwert dieser Analyse liegt in oder direkt bei einer antigenen Determinante, wobei zu beachten ist, dass nicht alle weiteren Maxima der Analyse eine antigene Determinante darstellen, genauso wie nicht jede antigene Determinante einen Hochpunkt darstellt. Die mit dieser Methode postulierten antigenen Determinanten können eventuell bisher unbekannte Determinanten des Proteins sein oder eine Antikörperbindungsstelle darstellen, die in der Natur nicht vorkommt. Zur

Immunisierung werden aber mehr als die sechs Aminosäuren synthetisiert, um die Antigenität zu erhöhen und eine gute Überlappung von synthetischem Peptid mit der natürlichen antigenen Determinante zu haben, für den Fall, dass die vorhergesagte am äussersten Ende der natürlichen antigenen Determinante liegt. Optimale Ergebnisse werden mit Peptiden aus 10-15 Aminosäuren erzielt [174,177,178].

Zur Herstellung spezifischer Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen wird dieses in ein Versuchstier injiziert. Im Tier kommt es zu einer Antikörperbildung gegen das Antigen durch zu Plasmazellen differenzierte B-Lymphozyten. Dieses Antigen muss möglichst in Reinform appliziert werden, da kontaminierende Antigene zur Produktion unspezifischer Antikörper für das eigentlich interessierende Antigen führen. Ein signifikanter Anstieg spezifischer Antikörper im Versuchstier-Serum ist fünf bis sieben Tage nach Primärinjektion festzustellen, ein Maximum an Antikörperkonzentration nach neun bis elf Tagen. Durch Zugabe von Adjuvantien zum Antigen, z.B. Freundsche Adjuvantien, kann die Immunantwort verstärkt werden. Eine deutliche Steigerung der Antikörperausbeute wird durch ein sogenanntes Boostern erreicht, eine erneute aber niedriger dosierte zweite Antigeninjektion nach Abklingen der Primärantwort, der eventuell noch weitere folgen können. Durch das Boostern tritt eine erneute Immunantwort des Organismus auf, die aber durch die bereits erfolgte Sensibilisierung und Bildung von Gedächtniszellen schneller, mit höheren Antikörperkonzentrationen und länger anhaltend erfolgt. Die applizierte Antigenmenge darf nicht zu groß sein, da sonst auch unspezifischere B-Lymphozyten aktiviert werden und unspezifische Antikörper gebildet werden. Das durch Aderlässe der Versuchstiere gewonnene Blut wird zentrifugiert und das Serum abdekantiert. Das Fibrin wird durch ein Holzstäbchen entfernt, um das sich beim Drehen die Fibrinfäden wickeln. Das Komplement, das sich an Antigen-Antikörper-Komplexe bindet, wird durch Erhitzen auf 56 °C für 10-20 Minuten inaktiviert, während die Immunglobuline nicht beschädigt werden. Um die Spezifität der Antikörper in diesem polyklonalen Antikörpergemisch zu erhöhen, kann eine Affinitätschromatographie mit dem ursprünglichen, dem Tier applizierten Antigen als Liganden durchgeführt werden [157].

Um möglichst geringe Hintergrundsignale von unspezifisch auf der Membran gebundenen Antikörpern zu erhalten, ist es nötig, die freien Plätze auf der Membran mit einer

inerten Substanz zu belegen, bevor Antikörper auf die Membran gegeben werden.

In einem weiteren Schritt wird gegen den ersten spezifischen, gegen das interessierende Protein gerichtete Antikörper ein zweiter radioaktiv markierter oder mit einem Enzym gekoppelter Antikörper eingesetzt. Mit ihm kann man die Lokalisation des ersten, spezifischen Antikörpers detektieren.

3.8.2 Durchführung

3.8.2.1 Blockieren der Membran

Um unspezifische Bindungen des Antikörpers gegen SeP auf der Membran zu verhindern, wurde die Membran für zwei Stunden bei Raumtemperatur in ca. 20 ml Blockierlösung eingelegt. Dabei wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran belegt. Der Antikörper reagierte dann nur noch mit seinem spezifischen Antigen, wodurch die Hintergrundsignale bei der späteren Filmentwicklung reduziert wurden.

Tabelle 24: Blockierlösung:

Substanz	Konzentration der Lösung
BSA	2,5%
Magermilchpulver	2,5%
Pferdeserum	2%
Tween 20	0,1%
in PBS	

BSA: Rinderserumalbumin

Das Pferdeserum wurde erst am Ende zupipettiert, um Aggregationen zu vermeiden.

3.8.2.2 Inkubation mit Antikörper und Waschen der Membran

3.8.2.2.1 Antikörper- und Waschlösungen

Für die Herstellung der Waschlösungen wurden folgende Stammlösungen benötigt:

Tabelle 25: Stammlösungen der Waschlösungen

Substanz	eingesetzte Menge	in Volumen Wasser	Konzentration der Lösung
NaCl	292,2 g NaCl	1000 ml	5 M
Triton X-100	10 g Triton X-100	100 ml	10%
EDTA	9,305 g EDTA	100 ml	0,25 M
Tris pH 7,5	12,113 g Tris	100 ml	1 M

Die Antikörperlösungen wurden hergestellt, indem der erste und zweite Antikörper jeweils in folgende Grundlösung gegeben wurden:

Tabelle 26: Antikörper-Grundlösung:

Substanz	Konzentration der Lösung
BSA	1%
Magermilchpulver	1%
Pferdeserum	1%
Tween 20	0,1%
in PBS	

Das Pferdeserum wurde erst am Ende zupipettiert, um Aggregationen zu vermeiden.

Für die Waschvorgänge nach der Inkubation mit dem ersten und zweiten Antikörper wurden aus den Stammlösungen die Waschlösungen 1 und 2 hergestellt. Diese Lösungen wurden bei Raumtemperatur oder besser im Kühlraum bei 4 °C aufbewahrt. Direkt vor dem Waschen wurde beiden Waschlösungen 1% BSA, 1% Magermilchpulver und 1% Pferdeserum zugesetzt.

Tabelle 27: Waschlösung 1:

Substanz	Stammlösung	eingesetzte Menge	Konzentration der Waschlösung
Tris pH 7,5	1 M Stammlösung	10 ml	10 mM
NaCl	5 M Stammlösung	30 ml	150 mM
EDTA	0,25 M Stammlösung	8 ml	2 mM
Triton X-100	10%ige Stammlösung	10 ml	0,1%
Wasser		ad 1000ml	

Tabelle 28: Waschlösung 2:

Substanz	Stammlösung	eingesetzte Menge	Konzentration der Waschlösung
Tris pH 7,5	1 M Stammlösung	10 ml	10 mM
NaCl	5 M Stammlösung	200 ml	1 M
EDTA	0,25 M Stammlösung	8 ml	2 mM
Triton X-100	10%ige Stammlösung	10 ml	0,1%
Wasser		ad 1000ml	

3.8.2.2.2 Inkubation mit dem ersten Antikörper, erstes Waschen

Als erster Antikörper wurden polyklonale Antiseren vom Kaninchen oder vom Huhn gegen synthetische, immunogene Peptide des humanen SeP eingesetzt, die nach den

Methoden von Chou und Fasman [176] und Hopp und Woods [177,178] bestimmt worden waren. Diese Antikörper wurden auch schon in vorangegangenen Experimenten zu diesem Thema verwendet [133,179,180]. Diese Peptide befinden sich bei den Aminosäuren 14-28 im N-terminalen Bereich von SeP (P1-Antikörper) bzw. 252-265 im C-terminalen Bereich von SeP (P2-Antikörper) (Abbildung 3). Sie wurden an Keyhole Limpet Hämocyanin als Träger gekoppelt und den Versuchstieren wiederholt injiziert (Kaninchen: Eurogentec, Seraing, Belgien; Huhn: Davids Biotechnology, Regensburg). In der Folgezeit wurde den Versuchstieren in Abständen Blut entnommen und daraus durch Präzipitation mit Natriumsulfat nach Kekwick [181], Zentrifugation und Dialysieren das polyklonale Serum gegen das entsprechende Peptid gewonnen. Die hieraus gewonnenen Immunglobulin-G (IgG)-Präparationen wurden in Versuchsreihen auf ihre Detektionsfähigkeit und Sensitivität bezüglich SeP miteinander verglichen, um die am besten geeignete IgG-Präparation herauszufinden. Nach den Vorversuchen mit Kaninchen- und Huhn- IgG-Präparationen wurden die Proteinbanden der Biopsieproben schließlich mit den Antikörpern aus dem Serum der fünften Blutung des Kaninchens SA 3039 vom 25.11.1996 mit der Laborbezeichnung „anti P 383“ detektiert. Es handelt sich hierbei um P2-Antikörper gegen das synthetische Peptid der C-terminalen Region (rp2). Die IgG-Präparationen wurden 1:750 (Kaninchen) bzw. 1:1000 (Huhn) mit der Antikörper-Grundlösung verdünnt. Daneben wurden auch einzelne Versuche mit Verdünnungen der Kaninchen-IgG-Präparation von 1:500 und 1:1000 durchgeführt. Die Membran wurde mit der Antikörperlösung in Folie eingeschweißt und über Nacht auf einem Schüttler im Kühlraum bei 4 °C inkubiert. Durch das Einschweißen konnte sehr sparsam mit der Antikörperlösung gearbeitet werden, da wenig Antikörperlösung benötigt wurde. Zum Waschen wurden pro Membran ca. 100 ml Waschlösung benötigt. Die Membran wurde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler viermal zehn Minuten mit der mit BSA, Magermilchpulver und Pferdeserum versetzten Waschlösung 1 gewaschen. Die Waschlösung wurde zwischen den Waschgängen im Kühlschrank aufbewahrt.

3.8.2.2.3 Inkubation mit zweitem Antikörper, zweites Waschen

Der zweite Antikörper (Peroxidase-gekoppelt) wurde mit der Antikörperlösung 1:2000 (anti-Kaninchen, Sigma) bzw. 1:5000 (anti-Huhn, Dianova, Hamburg) verdünnt. Die Membran wurde auf einem Schüttler im Kühlraum bei 4 °C für eine Stunde in ca. 20 ml verdünnter Antikörperlösung inkubiert. Der Waschvorgang entsprach dem beim ersten Waschen mit dem Unterschied, dass die Waschlösung 2 statt Waschlösung 1 verwendet wurde.

3.8.2.2.4 Amersham-Methode mit RIPA-Puffer

Ein Protokoll der Firma Amersham (Freiburg) zur Reduktion des Hintergrundes wird im Folgenden beschrieben [182]. Hierzu wurden folgende Blockierlösung und Waschlösung benötigt:

Tabelle 29: Blockierlösung:

Substanz	Konzentration der Lösung
Magermilchpulver	10%
Tween	0,2%
in PBS	

Tabelle 30: Waschlösung:

Substanz	Konzentration der Lösung
Magermilchpulver	1%
Tween	0,2%
in PBS	

Die Membran wurde bei 4 °C über Nacht in die Blockierlösung gelegt. Noch vor der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde die Membran mit der Waschlösung zweimal kurz, einmal 15 Minuten und zweimal fünf Minuten gewaschen. Der erste Antikörper wurde in Waschlösung 1:750 (Kaninchen) bzw. 1:1000 (Huhn) verdünnt. Die Membran wurde darin für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran wieder mit der Waschlösung zweimal kurz, einmal 15 Minuten und zweimal fünf Minuten gewaschen. Die zweite Waschlösung, mit der auch der zweite Antikörper verdünnt wurde, ist der RIPA-Puffer (Radio-Immuno-Protection-Assay) [183].

Tabelle 31: RIPA-Puffer:

Substanz	Konzentration der Lösung
Tris pH 7,5	20 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
Nonidet P-40	1%
Desoxycholat	0,5%
SDS	0,1%
NaF	5 mM
in Wasser	

Dieser RIPA-Puffer wurde mit der Waschlösung 1:1 verdünnt (ergab 50%igen RIPA-Puffer). Der zweite Antikörper wurde in 50%igem RIPA Puffer 1:2000 (anti-Kaninchen) bzw. 1:5000 (anti-Huhn) verdünnt. Die Membran wurde dann eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluß wurde die Membran dreimal zehn Minuten mit 50%igem RIPA-Puffer gewaschen.

3.9 Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Reaktion

3.9.1 Grundlagen

Im Gegensatz zur Fluoreszenz, bei der eine Lichtreaktion durch einfallende Strahlungsenergie erzeugt wird, findet bei der Chemilumineszenz eine chemische Lichtproduktion statt, die ihre Energie für die Lichtreaktion aus chemischen Bindungen erhält. Unter Biolumineszenz versteht man eine spezielle Form der Chemilumineszenz, die in biologischen Systemen unter Einsatz eines katalytischen Proteins zur Verstärkung der Lumineszenzreaktion stattfindet. Dieses Phänomen ist schon sehr lange bekannt. Schon Aristoteles (384-322 v.Chr.) beschrieb die Biolumineszenz von Bakterien auf totem Fisch und Pilzen in seinem Werk „De Anima“. Heute setzt man die Chemilumineszenz als kostengünstige, sensitive und nichtradioaktive Alternative zu anderen Nachweismöglichkeiten ein. Chemilumineszenz von Luminol wurde erstmals 1928 von Albrecht beschrieben [184]. Seither sind viele Acylhydrazide auf ihre Fähigkeit zur Lumineszenz getestet worden, aber starke Chemilumineszenz wurde nur bei zyklischen Diacylhydrazidverbindungen vom Luminoltyp beobachtet. Elektrophile Substituenten im Benzolring verringern, elektrophobe erhöhen die Lumineszenz, wobei eine Substitution in Position 5 und 8 effektiver ist als in Position 6 und 7. Es wurden annelierte Analoge von

Luminol hergestellt, die bis zu 300% effektiver als Luminol sein können. Chemilumineszenz kann in Gasen, Flüssigkeiten und Festkörpern auftreten. Die dabei beobachteten Lichtemissionen variieren von Lichtblitzen von unter einer Sekunde Dauer bis hin zu einem langsamen Glimmen, wodurch auf Röntgenfilmen eine Schwärzung hervorgerufen wird, die anschließend densitometrisch ausgewertet werden kann. Die genauen Vorgänge der Chemilumineszenz sind noch nicht vollständig geklärt, was eine exakte Kontrolle der Reaktionen bis jetzt ausschließt [185].

Es gibt ausgiebige Studien zur Anwendung von verstärkter Chemilumineszenz (ECL) mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Antikörpern (HRP-Fab). Phenol-derivate, wie z.B. p-Iodophenol oder p-Phenylphenol, dienen hierbei als Verstärker. Sie machen das System durch Beschleunigung der peroxidasekatalysierten Chemilumineszenz und Unterdrückung der Lichtproduktion in Abwesenheit von Peroxidase sensitiver. Dabei fungieren die Verstärker nicht als effizientere Lichtemitter, sondern sind in die komplexe Reaktion zwischen Peroxidase, Oxidans (meistens Wasserstoffperoxid) und Lichtemitter eingebunden. Die genauen Vorgänge sind aber noch unbekannt. Die Konzentrationsbereiche der einzelnen Reaktanden für eine optimales Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis sind sehr eng. Die optimalen Konzentrationen sind: p-Phenylphenol 20 $\mu\text{mol/l}$, Wasserstoffperoxid 0,75 mmol/l und Luminol 300 $\mu\text{mol/l}$. Durch Verwendung einer Verstärkersubstanz kann die Nachweisgrenze der HRP-Fab-Konzentration von 3 pmol/l auf 0,2 pmol/l gesenkt werden. Bei 3 pmol/l ist die Lichtausbeute mit Verstärkersubstanz 1000fach größer als ohne. Im Gegensatz zur unverstärkten ist die verstärkte Chemilumineszenz im Bereich von 0-18 pmol/l nicht linear. Zusätzlich tritt bei Verstärkung und HRP-Fab-Konzentrationen unter 30 pmol/l eine zeitliche Verzögerung von etwa drei Minuten zwischen Wasserstoffperoxidzugabe und signifikanter Lichtproduktion auf. Auch hier sind die genauen Zusammenhänge noch unbekannt [186].

3.9.2 Durchführung

Durch die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase wurde bei der ECL-Reaktion (Amersham, Freiburg) Chemilumineszenz hervorgerufen, diese mit Röntgenfilmen detektiert und dann densitometrisch ausgewertet.

Tabelle 32: ECL-Reagenzlösung:

Substanz	eingesetzte Menge
PBS-Tween 20 0,05%	10 ml
ECL-Lösung 1	5 ml
ECL-Lösung 2	5 ml

Die Membran wurde für eine Minute mit der ECL-Reagenzlösung bedeckt und anschließend zwischen Kunststoffolie gelegt. Auf diese Folien wurden in einer Filmkassette in Dunkelheit Röntgenfilme (X-OMAT oder BIOMAX von Kodak) aufgelegt. Nach 24 Stunden Belichtung wurden die Filme entwickelt. Die fluoreszierenden Banden waren als Schwärzung auf den Filmen zu erkennen.

3.10 Erstellung der densitometrischen Messergebnisse

Nach der Entwicklung wurden die Röntgenfilme mit Hilfe eines Densitometers (Vilber Lourmat, Marne La Vallee Cedex, Frankreich; Bio-Profil Image Analysis Software Bio1D Version 99.01) eingescannt. Für die Bestimmung der Molekülmassen der einzelnen detektierten Banden auf den eingescannten Röntgenbildern wurde mit dem Computer die Ponceau S-Färbung des Markers SDS 7 auf der jeweiligen Membran in das entsprechende Röntgenbild exakt eingepaßt. Hierbei wurden die mitdetektierten Banden des Markers als Orientierung gewählt. Somit konnte EDV-gestützt von jeder Bande die Molekülmassen anhand des Markers SDS 7 bestimmt werden.

Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der einzelnen Banden stützten sich auf gut sichtbare Banden mit den Molekülmassen 87 kD, 73 kD, 70 kD, 65 kD, 56 kD, 41 kD, 40 kD und 30 kD. Da die Banden bei 41 kD und 40 kD bzw. bei 73 kD und 70 kD nicht bei allen Proben als Doppelbande, sondern auch oft nur als eine Bande sichtbar waren, wurde in der Molekulargewichts- und densitometrischen Auswertung die Doppelbande zu einer Bande (41 kD bzw. 72 kD) zusammengefasst.

Das Interesse lag sowohl auf der Intensitätsverteilung dieser Banden innerhalb einer Probe, als auch auf der Veränderung der Werte bei den Patienten, die mit Selen substituiert worden waren gegenüber nicht substituierten Individuen. Besondere Aufmerksamkeit wurde dem Vergleich der Biopsien aus Rektumschleimhaut und Polypen von fünf Patienten geschenkt, von denen jeweils beide Gewebeproben vorlagen. Aufgrund

der geringen Patientenzahl war eine statistische Auswertung jedoch nicht aussagekräftig.

Die Methode beinhaltet, dass unterschiedliche Filme eine leicht differente Belichtung erhalten konnten und einzelne Membranen trotz gleichem Verfahren eine etwas stärkere oder schwächere Schwärzung aller Banden hervorrufen konnten. Aus diesem Grund lief in jedem Gel ein Standard (Lysat einer Rektummukosa-Präparation) mit gleichbleibender Proteinkonzentration (40µg) mit. Da die 56 kD-Bande bei allen Proben gut erkennbar war und sie die Haupt-SeP-Fraktion darzustellen schien, wurde diese Bande ausgewählt, um die Intensitäten sämtlicher ausgewerteter Banden in Relation zur densitometrischen Dichte der 56 kD-Bande des Standards anzugeben. Auf jedem einzelnen Filmabbild der Membranen wurde die densitometrische Dichte der 56 kD-Bande des Standards mit 100 festgelegt. Diese Bande müßte theoretisch bei absolut identischen Bedingungen auf allen Membranen die gleiche Intensität aufweisen. Somit konnten alle Banden auf allen Membranen miteinander verglichen werden.

3.11 Optimierter Versuchsablauf

Folgende Methode hat sich als die geeignetste herausgestellt und wurde als Standard-Methode für Patientenproben angewendet:

Die Biopsien wurden mit Ultraschall lysiert, zentrifugiert und ohne weitere Zwischenschritte zur Bio-Rad-Proteinbestimmung verwendet. Volumina mit 40 µg Proteingehalt wurden mit dem Probenpuffer Roti-Load versetzt, im 12%igen Trenngel aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulosemembranen gebロットet. Die Proteinfärbung erfolgte mit Ponceau S, bevor die Membran mit den Blockier-, Wasch- und Antikörperlösungen (rp2; Anti-Kaninchen, Verdünnung 1:750) wie in den Kapiteln 3.8.2.2.1-3.8.2.2.3 beschrieben weiterbehandelt wurde. Nach der ECL-Reaktion wurde der X-OMAT-Film für 24 Stunden belichtet und die Schwärzung der Banden densitometrisch ausgewertet.

4 Resultate

4.1 Herstellung der Proben zur Elektrophorese

Es wird vermutet, dass es sich bei SeP um ein sezerniertes extrazelluläres Protein handelt [70,71,82]. Daher wurde in den Biopsien ein niedriger SeP-Gehalt angenommen. Unter den Aufbereitungsverfahren stellte sich die Methode mit der Ultraschallaufbereitung als die zweckmäßigste heraus, da hierbei am wenigsten Volumen zur Biopsie zugegeben wurde und somit der Verdünnungseffekt gering war. Sowohl bei der Probenaufbereitung mit Potter als auch mit Dismembrator verdünnten die notwendigerweise zugegebenen Volumina die geringe Proteinmenge so stark, dass die SeP-Banden auf dem Film nur sehr schwach zu erkennen waren.

Bei den Probenaufbereitungen mit Centricon 100 und der Heparin HiTrap-Säule waren die Verluste bzw. die Verdünnung von SeP so groß, dass diese Aufbereitungen keinen Vorteil brachten. Daraus ergab sich die Aufbereitung der Schleimhautbiopsie mit Ultraschall ohne weitere Aufbereitung als die Standard-Methode der Probenaufbereitung in dieser Arbeit.

4.2 Proteinbestimmung

Mit der Bio-Rad-Methode wurde mittels definierter Proteinmengen (ein Standard-IgG) eine Eichgerade erstellt. Mit dieser Eichgerade konnte anschließend auch der Proteingehalt der Proben bestimmt werden. In der EDV-gestützten Auswertung der Proteinbestimmung wurde das Volumen der jeweiligen Proben berechnet, in dem 40 µg Protein enthalten sind. Da diese Volumina in einem weiten Bereich lagen (1,8 - 19 µl), wurden die Proben zur Elektrophorese so zusammengestellt, dass in einem Gel die Volumenunterschiede der aufgetragenen Volumina möglichst gering ausfielen, um verzerrte und schiefe Banden zu vermeiden.

4.3 Elektrophorese

Für die Auftrennung des Proteingemisches der Proben wurden Trenngele mit 8%, 10% und 12% Polyacrylamid ausprobiert. Für die Darstellung der Banden im Bereich von 30 kD bis 65 kD stellte sich die Verwendung des 12%igen Trenngels als am

zweckmäßigsten heraus, da die Proteine im interessierenden Bereich hierbei am besten aufgetrennt wurden. Bei den niedrigprozentigen Gelen war die Auswertung der Banden im Bereich zwischen 30 kD und 40 kD nicht oder nur eingeschränkt möglich (Abbildung 5 a, b).

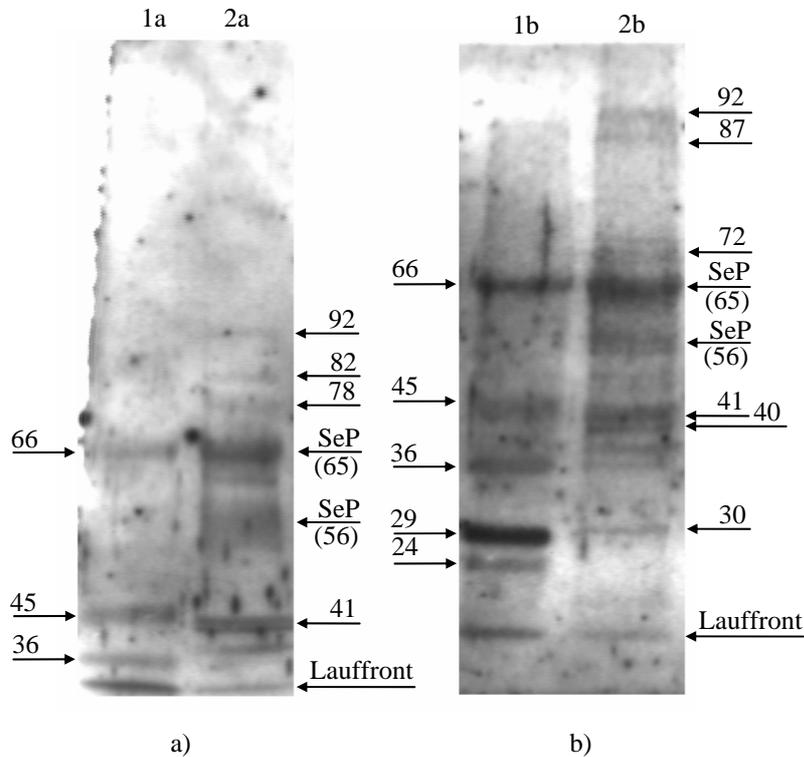


Abbildung 5 a, b:

Detektion des Markers SDS7 (1a, 1b) und des Mukosastandards (2a, 2b) nach ECL-Reaktion auf dem Röntgenfilm.

a) Nach Elektrophorese auf einem 10%igen Gel. b) Nach Elektrophorese auf einem 12%igen Gel. Molekülmassen in kD (→).

Als Probenpuffer wurde der Roti-Load-Puffer der Firma Roth (Karlsruhe) aufgrund der schärferen Banden, die bei seiner Verwendung erzielt wurden, eingesetzt. Gegenüber dem selbst hergestellten vierfach-Probenpuffer ergaben sich geringfügige Laufweitenunterschiede bei den Banden für SeP. Die Bande um 65 kD lief mit dem vierfach-Puffer in der Elektrophorese etwas weiter als mit Roti-Load-Puffer (Abbildung 6).

Neben der standardmäßig verwendeten Zugabe des Roti-Load-Puffers im Verhältnis 1:2 (Puffer : Probe) wurden auch Verhältnisse von 3:4 und 1:1 (Puffer : Probe) ausprobiert. Diese Variationen erbrachten aber keine Verbesserungen der Ergebnisse und auch die Unterschiede in der Laufweite der Proteine im Vergleich zum vierfach-Puffer wurden durch die Änderung des Verhältnisses Roti-Load-Puffer zu Probe nicht beseitigt.

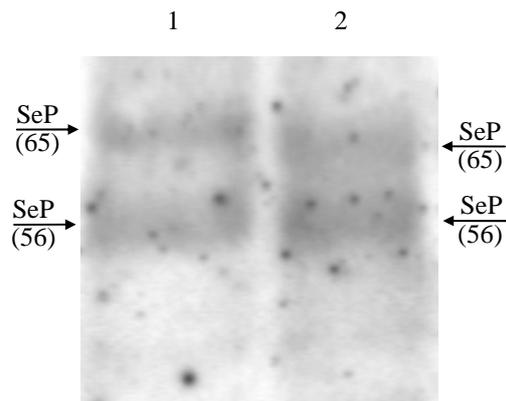


Abbildung 6:

Vergleich der Bandenstruktur bei Verwendung des käuflichen Roti-Load-Puffers (1) und des selbst hergestellten vierfach-Probenpuffer (2) nach ECL-Reaktion auf dem Röntgenfilm. Molekülmassen in kD (→).

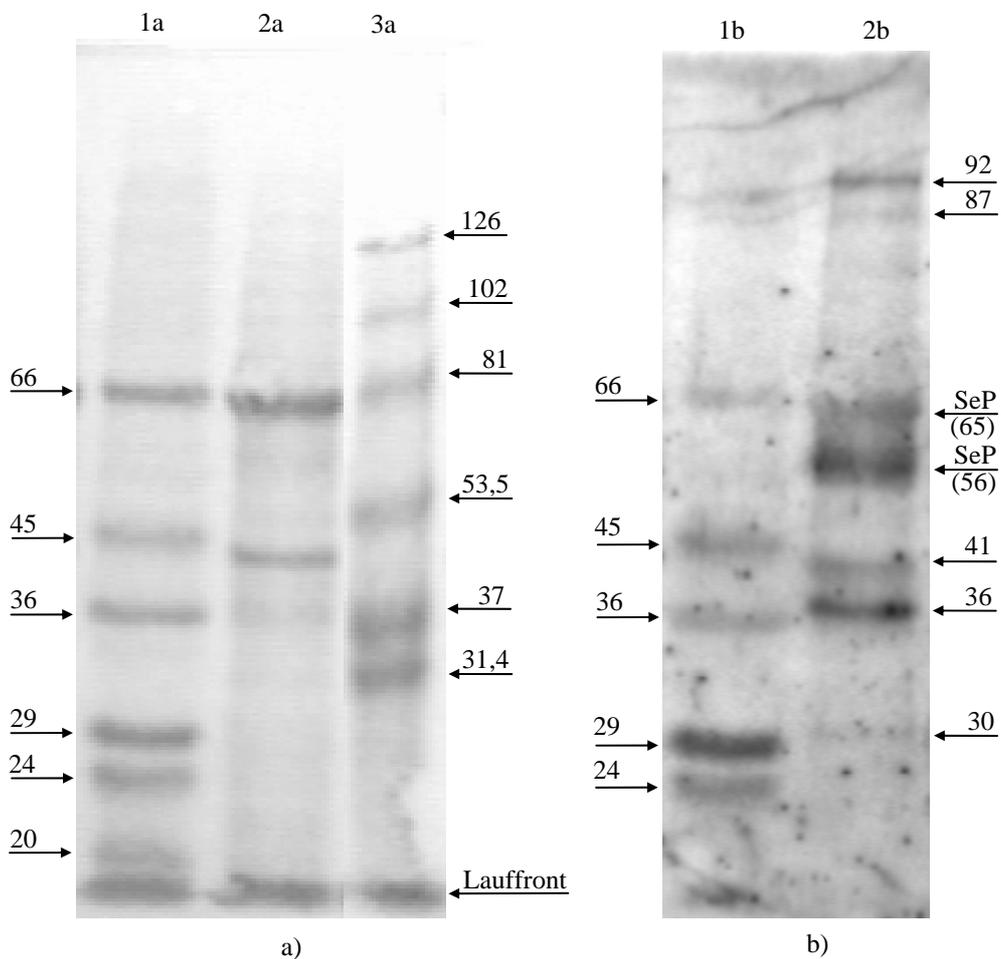


Abbildung 7 a, b:

- a) Ponceau S-Färbung der Marker SDS 7 und P 1677, sowie des Mukosastandards.
 1a: Marker SDS 7; 2a: Mukosastandard; 3a: Marker P 1677. Molekülmassen in kD (→).
 b) Marker SDS 7 und Mukosastandard nach ECL-Reaktion auf dem Röntgenfilm.
 1b: Marker SDS 7; 2b: Mukosastandard. Molekülmassen in kD (→).

Für die spätere densitometrische Auswertung wurde der Marker SDS 7 herangezogen, da seine Molekülmassen nahe an den ausgewerteten Banden im Bereich von 30-87 kD liegen. Außerdem reagierte der Marker SDS 7 bei der ECL-Reaktion mit und war somit auch auf den Filmen zu sehen. Dies vereinfachte die Auswertung wesentlich (Abbildung 7a, b).

4.4 Elektroblot

Beim Elektroblot war es besonders wichtig, für eine ausreichende Kühlung der Blotapparatur zu sorgen. Bei ungenügender Kühlung oder zu hohen Stromstärken während des Blotvorganges nahm die Nitrocellulosemembran Schaden, was durch eine Gelbfärbung der Membran sichtbar wurde. Daher wurde die Stromstärke während des Blotvorganges auf 250 mA begrenzt. Nach zwei Stunden waren die Proteine nahezu vollständig vom Gel auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Eine Kontrollfärbung des Gels mit Coomassie-Blau nach dem Blotten ergab nur noch minimale Proteinspuren im Gel.

4.5 Färbungen

Die irreversiblen Färbungen mit Coomassie-Blau und Silber wurden bei der Optimierung der Methode eingesetzt. Mit der Coomassie-Blau-Färbung wurde die Vollständigkeit des Blotvorganges kontrolliert. Die Silberfärbung mit Bio-Rad Silver Stain wurde nur einmal durchgeführt, um das Proteinmuster nach der Elektrophorese im Gel mit einer sehr empfindlichen Methode sichtbar zu machen. Dieses wurde mit einer Ponceau S-gefärbten, mit den identischen Proben bestückten, geblotteten Membran verglichen. Anhand dieses Vergleiches konnte festgestellt werden, dass das Proteinmuster des Gels mit dem Proteinmuster nach dem Blotten auf der Membran übereinstimmte. Da die Färbung mit Ponceau S bei weitem nicht so intensiv und empfindlich ist wie mit Silber, beschränkte sich der Vergleich der Ergebnisse dieser beiden Färbetechniken auf die prominentesten Banden, die auch in der Ponceau S-Färbung sichtbar waren.

Die Färbung mit Ponceau S wurde standardmäßig mit jeder Membran nach dem Blotten durchgeführt. Dies diente der Dokumentation des Bandenmusters der Proben und der Proteinmarker. Somit konnte die spätere Auswertung der Molekülmassen durch Ver-

gleich mit den bei der ECL-Reaktion auf dem Röntgenfilm detektierten Banden erfolgen.

Eine Aussage über die Art des Gewebes (normale Rektumschleimhaut oder Polypenge-webe) war anhand der Bandenintensitäten und Intensitätenmuster mit Ponceau S nicht möglich, da keine regelmäßigen Veränderungen festzustellen waren. Auch Gesetzmäßigkeiten bei den Intensitäten der Banden, die auf eine Placebo- oder Verumgabe bei der Selensubstitution schließen ließen, waren nicht festzustellen (Abbildungen 8 und 9).

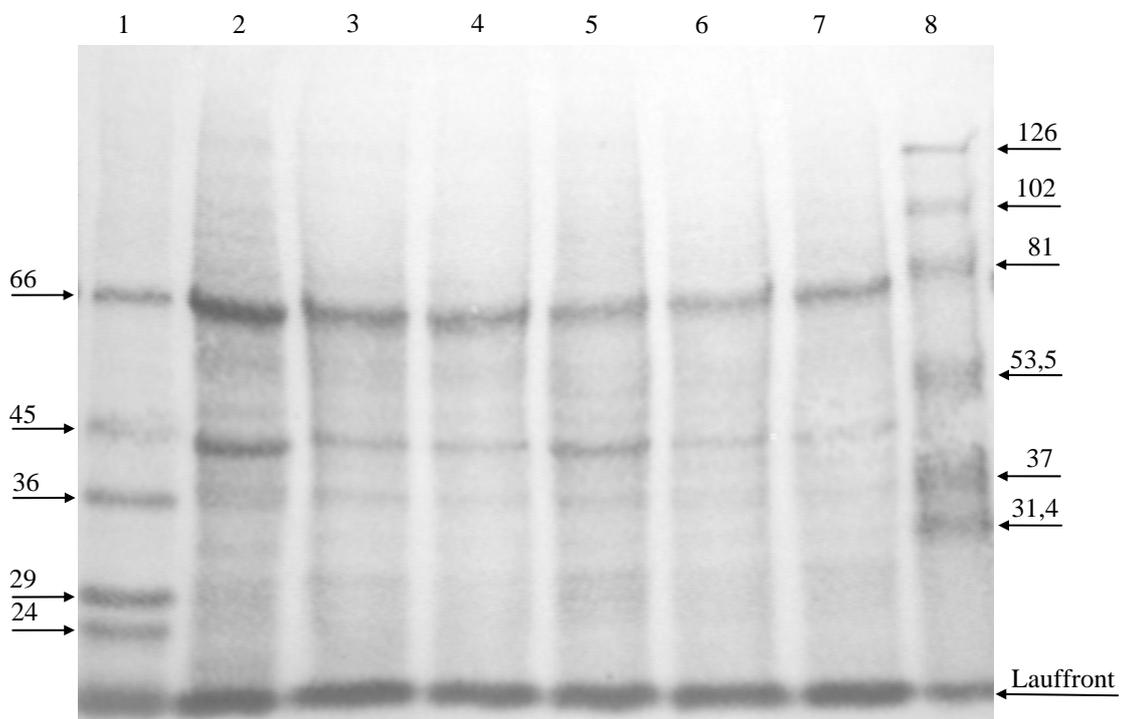


Abbildung 8:

Ponceau S-Färbung von Proben mit und ohne Selensubstitution. 1: Marker SDS 7; 2: Mukosastandard; 3: Probe 22 R- ; 4: Probe 10 R- ; 5: Probe 5 R- ; 6: Probe 3 R+ ; 7: Probe 1 R+ ; 8: Marker P 1677. Molekülmassen in kD (→).

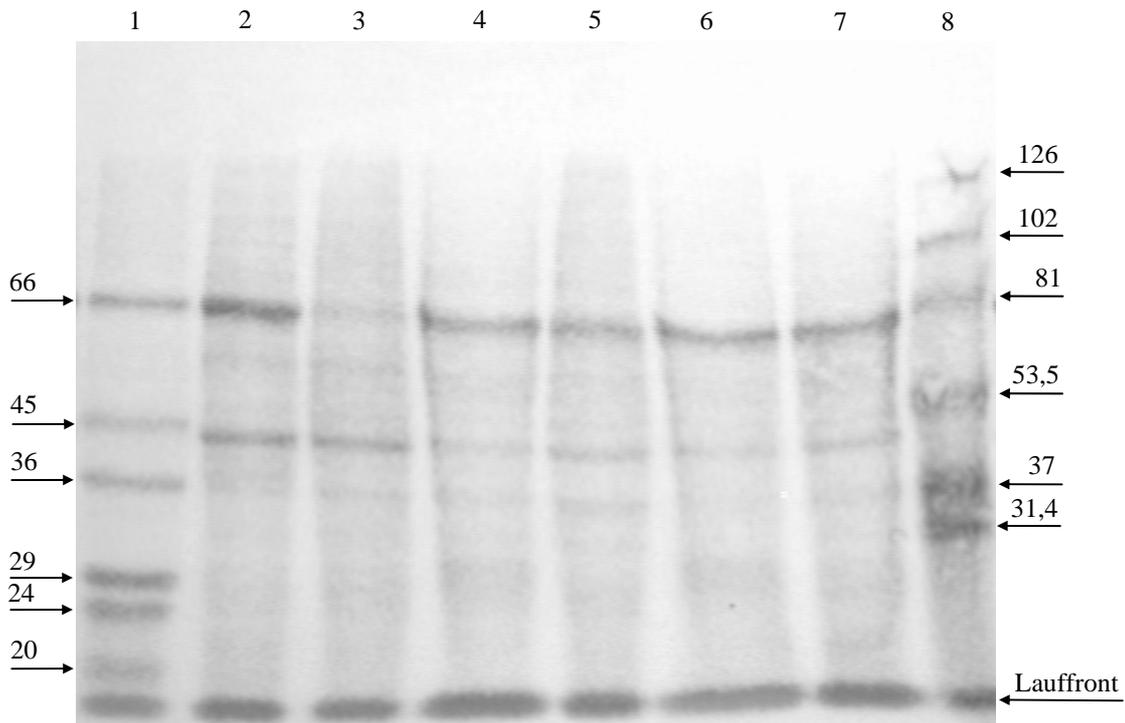


Abbildung 9: Ponceau S-Färbung von Adenomproben und Proben normaler Rektumschleimhaut. 1: Marker SDS 7; 2: Mukosastandard; 3: Probe 15 P- ; 4: Probe 15 R- ; 5: Probe 12 P- ; 6: Probe 12 R- ; 7: Probe 8 R+ ; 8: Marker P 1677. Molekülmassen in kD (→).

4.6 Antigen-Antikörper-Reaktion

Als spezifischer Antikörper, der mit antigenen Regionen des humanen SeP reagiert, kamen verschiedene IgG-Präparationen zum Einsatz. Die Vergleiche der IgG-Präparationen von Kaninchen und Huhn für die immunogenen Peptide P1 und P2 ergaben, dass die besten Ergebnisse mit der Kaninchen-IgG-Präparation rp2 erzielt wurden. Besonders die niedermolekularen Banden (ca. 30-40 kD) unterhalb der beiden Hauptbanden (65 kD, 56 kD) wurden hiermit am besten detektiert.

Die Variation der standardmäßig angewandten Verdünnung der IgG-Präparation (1:750) mit den Verdünnungen 1:1000 und 1:500 ergab keine intensiveren Signale, weshalb für den weiteren Verlauf der Arbeit die Verdünnung 1:750 angewendet wurde.

Mit der Verwendung der IgG-Präparationen, Blockier- und Waschlösungen nach der Amersham-Methode wurde versucht, die Hintergrundsignale auf der Membran zu verringern. Es konnte aber keine bessere Unterdrückung der Hintergrundsignale erreicht werden, weshalb diese Methode nicht weiter angewandt wurde.

4.7 ECL-Reaktion

Die sehr geringen SeP-Mengen in den Proben machte die Belichtung des Filmes X-OMAT (Kodak) über 24 Stunden notwendig, obwohl die ECL-Reaktion ihren Höhepunkt nach 5-20 Minuten hatte und anschließend mit einer Halbwertszeit von ungefähr 60 Minuten abklang [182]. Auf kürzer belichteten Filmen waren keine deutlichen Banden zu erkennen. Auch die Verwendung des hochempfindlichen Filmes BIOMAX (Kodak) ergab keine Verbesserung des Ergebnisses, weshalb die 24-Stunden-Belichtung des Filmes X-OMAT beibehalten wurde.

4.8 Reduktion der Hintergrundsignale

Nach der Entwicklung der Filme waren auf den Membranen neben den Banden auch kleine schwarze Punkte zu sehen, die die Auswertung der Banden teilweise unmöglich machten. Trotz intensiver Ursachenforschung konnten die Punkte nicht gänzlich eliminiert werden.

Bei den im folgenden beschriebenen Versuchen wurde zur Kontrolle eine Membran im Standard-Verfahren als Vergleich mitentwickelt. Da die Punkte auch auf nicht gebloteten Membranen in geringer Menge auftraten, wurden vor allem die verschiedenen Lösungen variiert.

Ein kompletter Neuansatz aller Zutaten für die Gele und der Einsatz unterschiedlicher Vernetzungsdichten im Trenngel erbrachten keine Verbesserung. Um grobe Partikel in den Blockier-, Wasch- und Antikörperlösungen als Ursache für die Punkte auszuschließen, wurden diese Lösungen vor ihrer Anwendung bei 2300 U/min zehn Minuten zentrifugiert, der Überstand abgezogen und weiterverwendet, jedoch ohne nennenswerte Reduktion der Punkte. Ein weiterer Ansatzpunkt waren die Konzentrationen der Komponenten der Blockier-, Wasch- und Antikörperlösungen. Deshalb wurden in einzelnen Durchgängen jeweils die Konzentrationen von Protein (Magermilchpulver, BSA und Pferdeserum), Triton X-100 und Tween 20 erhöht. Durch vermehrtes Blockieren der Membran sollte die Entstehung der Punkte verhindert werden. Die Ergebnisse zeigten jedoch keine Vorteile. Bei der erhöhten Konzentration von Tween 20, und besonders bei Triton X-100, waren die Hintergrundsignale deutlich erhöht, so dass bei der erhöhten Triton X-100-Konzentration die Abgrenzung der einzelnen Banden gegen den

Hintergrund nur begrenzt möglich war. Bei Versuchen, die Proteine, das Tween 20 und das Triton X-100 aus den verschiedenen Lösungen wegzulassen, traten erwartungsgemäß zu hohe Hintergrundsignale wegen der ungenügenden Blockierung auf. Auch bei der ECL-Reaktion wurden Abweichungen vom Standardverfahren durchgeführt. Bei der Anwendung der ECL-Reagenzien ohne die Verdünnung mit PBS-Tween 20 0,05% ergaben sich viel zu hohe Hintergrundsignale und auch vor bzw. nach der ECL-Reaktion durchgeführtes kurzes Waschen in PBS oder PBS-Tween 20 0,1% hatte zwar auf den Hintergrund, nicht aber auf die Entstehung der Punkte einen nennenswerten Einfluss. Die Anzahl und Intensität der Punkte konnte aber letztendlich durch Aufbewahrung der Stammlösungen im Kühlschrank auf ein vertretbares Maß reduziert werden, bei dem auch eine Auswertung der Banden möglich war (z.B. Abbildung 10).

4.9 Auswertung der densitometrischen Messergebnisse

Die beiden Banden mit der größten Intensität waren die bei 56 kD und 65 kD, welche zwei Isoformen von SeP entsprechen. Bei den meisten Proben waren auch weitere, allerdings deutlich schwächere Signale bei 87 kD, 72 kD, 48 kD, 41 kD und 30 kD detektierbar. Vereinzelt waren auch noch Banden bei 92 kD, 82 kD, 78 kD und 36 kD detektierbar, die aber aufgrund des seltenen Auftretens nicht in die Auswertung mit aufgenommen wurden. Die Signale bei 41 kD stellten sich bei sehr scharfen Bildern als eine Doppelbande mit den Molekülmassen 41 kD und 40 kD heraus. Dasselbe gilt für die Bande bei 72 kD, die sich aus zwei Banden mit den Molekulargewichten 73 kD und 70 kD zusammensetzte. Da aber nicht alle Bilder die notwendige Auflösung dieser Doppelbande ergaben, wurden für die Auswertung die Doppelbanden als eine Bande bei 41 kD bzw. 72 kD ausgewertet, um somit auch die unschärferen Blots mit den übrigen vergleichen zu können.

Die densitometrische Auswertung der Banden ergab für die einzelnen Banden zum Teil sehr große Schwankungsbreiten der Intensitäten. Die in den Tabellen und Diagrammen angegebenen Werte stellen die gemittelten Intensitäten dar, um die Tendenzen aufzuzeigen. Da nicht bei jeder Probe alle Banden zu detektieren waren, steht in den Tabellen hinter den densitometrischen Werten in Klammern die Anzahl der Biopsien, bei denen

die betreffende Bande detektierbar war, in Bezug auf die Gesamtheit der jeweiligen Gruppe. Eine statistische Auswertung war wegen der geringen Patientenzahlen nicht aussagekräftig.

4.9.1 Auswertung des Mukosastandards

Bei der Auswertung fiel auf, dass die Mukosapräparation der Rektumschleimhaut, die als Standard auf allen Membranen aufgetragen und zur Kalibrierung der densitometrischen Dichte herangezogen worden war, ein intensiveres Bandenmuster zeigte als die übrigen Rektumbiopsien. Dabei waren sowohl der Standard, als auch die Rektumproben mit einer Gesamtproteinmenge von 40 µg pro Geltasche aufgetragen worden. Auch Banden, die bei den übrigen Rektumproben nur in Einzelfällen auftraten, konnten beim Standard detektiert werden (92 kD, 82 kD, 78 kD und 36 kD).

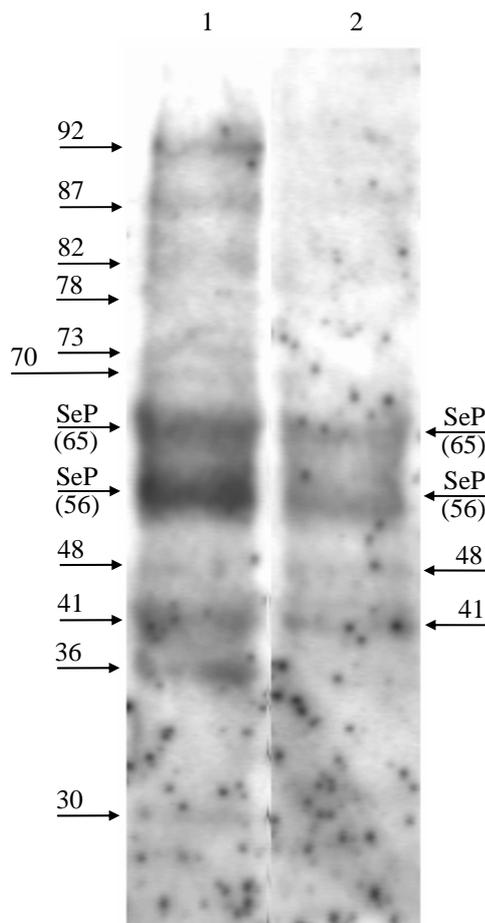


Abbildung 10: Mukosastandard und normale Rektumschleimhaut nach ECL-Reaktion auf dem Röntgenfilm. 1: Mukosastandard; 2: Probe 53 R. Molekülmassen in kD (→).

4.9.2 Auswertung der Proben

4.9.2.1 Auswertung der Proben „mit Selensubstitution“ versus „ohne Selensubstitution“

In diese Auswertung wurden die Biopsien normaler Rektumschleimhaut aller zur Verfügung stehenden Patienten aufgenommen, d.h. sowohl die der Studienteilnehmer als auch die fünf Biopsien der Patienten, die nicht an der Studie teilgenommen hatten. Die Nichtstudienteilnehmer wurden zusammen mit den Patienten gewertet, die Placebo eingenommen hatten. Polypenbiopsien fanden in diesem Teil der Auswertung keine Beachtung.

Bei den gemittelten Werten der Intensitäten der ausgewerteten Banden ergaben sich mit Ausnahme der Bande bei 87 kD bei den Proben selensubstituierter Patienten niedrigere Werte im Vergleich zu den nicht substituierten (Tabelle 33, Abbildung 11). Die große Schwankungsbreite der Intensitäten der einzelnen Banden machte aber eine klare Zuordnung in eine der beiden Gruppen für die einzelne Probe unmöglich.

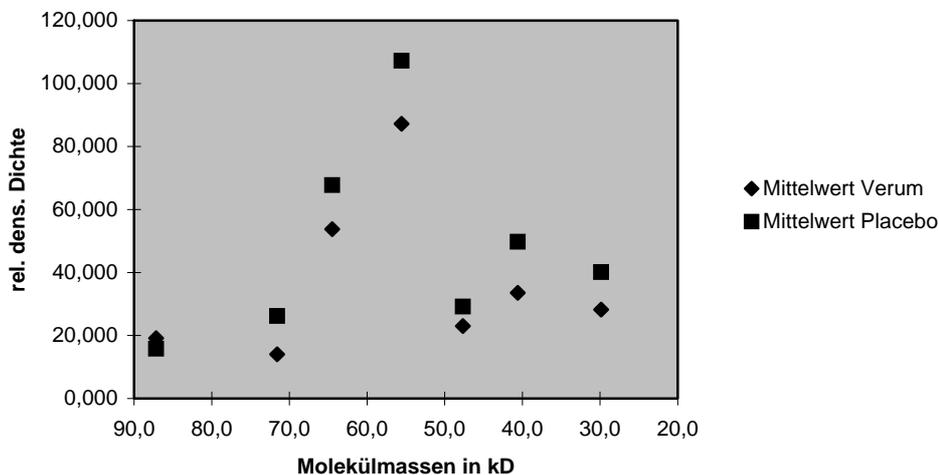


Abbildung 11:

Vergleich der relativen densitometrischen Dichte der Banden der Proben normaler Rektumschleimhaut der Patienten mit Verum bzw. Placebo.

Tabelle 33: Densitometrische Daten zu Abbildung 11

Molekülmassen in kD	Mittelwerte der Banden der Normal-schleimhautproben mit Selensubstitution (rel. dens. Dichte)	Mittelwerte der Banden der Normal-schleimhautproben ohne Selensubstitution (rel. dens. Dichte)
87	19,2 (3 von 9)	15,8 (11 von 15)
72	14,0 (2 von 9)	26,2 (10 von 15)
65	53,8 (9 von 9)	67,7 (15 von 15)
56	87,2 (9 von 9)	107,2 (15 von 15)
48	23,0 (7 von 9)	29,2 (12 von 15)
41	33,6 (8 von 9)	49,8 (15 von 15)
30	28,2 (5 von 9)	40,1 (12 von 15)

In Klammern jeweils die Anzahl der Biopsien, bei denen die Bande auftrat.

4.9.2.2 Auswertung der Probenpaare von Rektumschleimhaut und Polypen

In diese Auswertung wurden vier der fünf Probenpaare von normaler Rektumschleimhaut und Polypen von jeweils einem Patienten aufgenommen. Diese vier Probenpaare stammten allesamt von Patienten, die in der doppelblinden, prospektiven Studie keine Selensubstitution erhalten hatten. Ein Probenpaar wurde nicht in die Auswertung mit aufgenommen, da dieser Patient Selensubstitution erhalten hatte und diese Werte das Ergebnis verfälschen könnten. Die Werte des Polypen des Patienten mit Selensubstitution wurden gesondert in das Diagramm und die Tabelle eingetragen.

Bei den Polypenproben war öfters als bei den Proben von normaler Rektumschleimhaut eine deutliche Bande bei 87 kD erkennbar. Was anhand der Zahlen angedeutet wird (Tabelle 34), ist bei der Betrachtung der Filme deutlich zu sehen: Eine Verschiebung der Gewichtung der Banden hin zu den größeren Proteinen bei den Polypenproben. Bei normaler Rektumschleimhaut traten neben den zwei intensivsten Banden bei 56 kD und 65 kD vor allem kleinere Proteine zusätzlich auf. Dagegen waren bei Polypen neben einer deutlichen Abnahme der zwei intensivsten Banden (56 kD und 65 kD) im Vergleich zur normalen Rektumschleimhaut vor allem noch größere Proteine detektierbar (Abbildung 12).

Bei der Probe 16 P+ handelte es sich um die einzige Biopsie eines Polypen eines selensubstituierten Patienten im Probenmaterial dieser Arbeit. Da die Werte der einzelnen Banden Einzelwerte darstellten, besaßen sie nur sehr eingeschränkte Aussagekraft. Mit Ausnahme der Banden bei 87 kD und 72 kD (niedrigere Werte) und bei 56 kD

(höherer Wert) ergaben sich ähnliche Werte wie bei den Polypen nicht selensubstituierter Patienten.

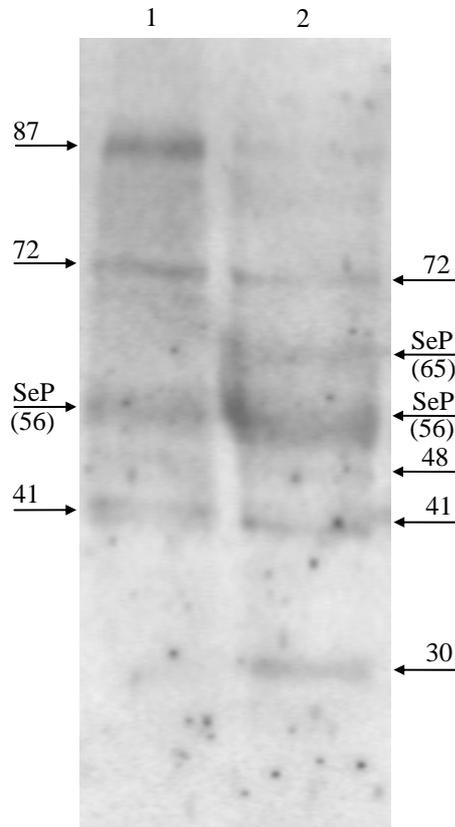


Abbildung 12: Vergleich von Adenom mit normaler Rektumschleimhaut bei einem Patienten ohne Selensubstitution nach ECL-Reaktion auf dem Röntgenfilm. 1: Probe 15 P-; 2: Probe 15R-. Molekülmassen in kD (→).

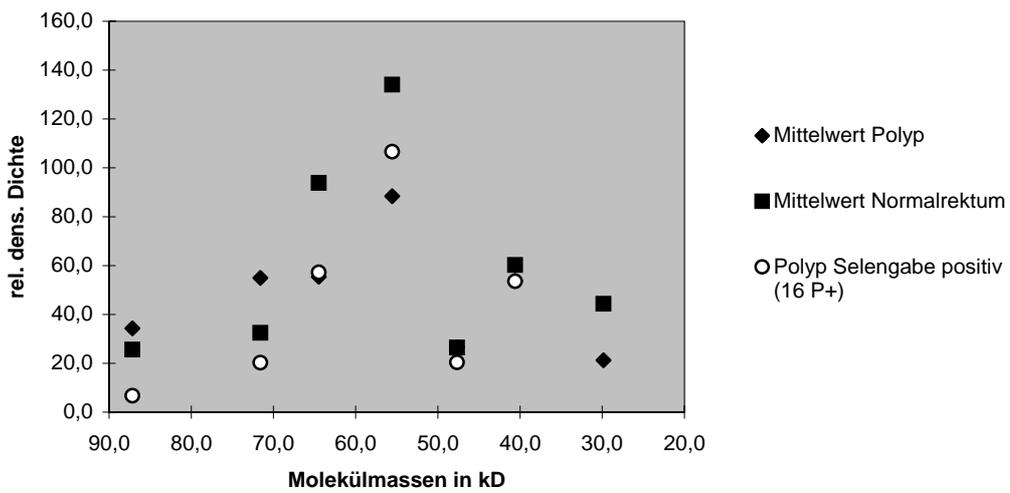


Abbildung 13:

Vergleich der relativen densitometrischen Dichte der Banden der Polypenproben mit denen der normalen Rektumschleimhaut. Zusätzlich die Werte des Polypen eines selensubstituierten Patienten (Probe 16 P+).

Tabelle 34: Densitometrische Daten zu Abbildung 13

Molekülmassen in kD	Mittelwerte der Banden der Polypenproben (rel. dens. Dichte)		Mittelwerte der Banden der Normalschleimhautproben (rel. dens. Dichte)	
87	34,3	(3 von 4)	(6,8)*	25,6 (2 von 4)
72	54,9	(3 von 4)	(20,3)*	32,5 (3 von 4)
65	55,4	(2 von 4)	(57,2)*	93,8 (4 von 4)
56	88,4	(4 von 4)	(106,6)*	134,0 (4 von 4)
48	26,5	(3 von 4)	(20,4)*	26,5 (3 von 4)
41	53,7	(3 von 4)	(53,6)*	60,3 (4 von 4)
30	21,2	(3 von 4)		44,4 (4 von 4)

* Werte des Polypen eines selensubstituierten Patienten in Klammern (Probe 16 P+).

5 Diskussion

Die Etablierung des Western Blots zum Nachweis von SeP in Schleimhautbiopsien war ein zentraler Punkt der vorliegenden Arbeit. Bisher wurde in den meisten Studien der SeP-Gehalt im Serum bestimmt. Dies erscheint auch als sinnvoller Ansatz bei der Bestimmung des SeP-Status eines Individuums, da vermutet wird, dass es sich bei SeP um ein sezerniertes Protein handelt [70,71,82]. Die antioxidative Potenz von SeP [57,82,105,112,113,116,136] im Zusammenhang mit der Differenz des Serumselenpiegels zwischen Gesunden und an Krebsformen des Gastrointestinaltraktes Erkrankten (siehe Kapitel 1.3.3) lenkte das Interesse auf die Funktion von SeP im Gastrointestinaltrakt. Northern Blot-Analysen von normaler Kolonschleimhaut ergaben starke SeP-mRNA-Signale [115], in kolorektalen Adenomen jedoch deutlich reduzierte Transkriptspiegel [133], was eine wichtige Funktion von SeP im kolorektalen Bereich vermuten läßt.

Grundsätzlich ist der Western Blot durchaus ein zur SeP-Bestimmung in Schleimhautbiopsien geeignetes Verfahren. Es zeigte sich aber, dass der SeP-Gehalt in den Rektumschleimhautbiopsien sehr gering war. Dies äußerte sich besonders in der notwendigen langen Belichtungszeit der Röntgenfilme während der ECL-Reaktion, die 24 Stunden im Vergleich zu ein bis zwei Stunden für Serum-SeP-Analysen betrug.

Der geringe SeP-Gehalt der Biopsien stützt die Annahme, dass es sich bei SeP um ein sezerniertes Protein handelt. Es stellte sich die Frage, ob eine Selensubstitution zu einer Erhöhung des intrazellulären SeP-Gehalts führen kann. In dieser Arbeit wurde in den Biopsien selensubstituierter Patienten sogar ein tendenziell geringerer SeP-Gehalt als bei nicht substituierten festgestellt. Mit Ausnahme der Bande bei 87 kD ergaben alle übrigen ausgewerteten Banden im Mittel für die nicht substituierten Patienten höhere Werte als die Banden der substituierten Patienten. Die Selensubstitution führte somit nicht zu einer intrazellulären Zunahme des SeP-Gehalts, was durch einen Intensitätsanstieg der Banden bei 65 kD und 56 kD sichtbar geworden wäre. Ob es unter Selensubstitution zu einer verminderten Speicherung von SeP intrazellulär bzw. zu einer früheren Ausschleusung des SeP aus der Zelle kommt, ist nicht bekannt. Der fehlende SeP-Anstieg intrazellulär ist verständlich, wenn man annimmt, dass SeP sehr schnell nach seiner abgeschlossenen Biosynthese sezerniert wird. Im Rahmen einer

Selensubstitution könnte es somit zu Veränderungen im SeP-mRNA-Gehalt in den Zellen der kolorektalen Schleimhaut kommen, ohne dass es zu einem Anstieg des SeP-Gehalts in der Schleimhaut selbst kommt. Ein weiterer Erklärungsansatz ist die Plateaubildung von SeP im Plasma bei suffizient mit Selen versorgten Personen [144,145]. Analog hierzu wäre bei einer bereits vor der Selensubstitution bestehenden Sättigung der Schleimhaut mit Selen kein Effekt auf den SeP-Gehalt bei einer Selengabe zu erwarten, da sich bereits ein Plateau ausgebildet hat. Wohin das von der Schleimhaut synthetisierte SeP sezerniert wird, ist bislang unbekannt. Sowohl die Sekretion ins Plasma analog zum Hauptsyntheseort in der Leber zur Verteilung des mit der Nahrung aufgenommenen Selens zu anderen Organen, als auch die Sekretion ins Lumen des Gastrointestinaltraktes oder in den Interzellularraum zur antioxidativen Abwehr mit der Nahrung aufgenommener reaktiver Sauerstoffspezies erscheint sinnvoll.

Es ist bekannt, dass SeP in mehreren Isoformen vorliegt. Für das Ratten-SeP wurden die Molekülmassen für das komplett translatierte bzw. am zweiten UGA-Codon trunkeierte SeP mit 57 kD bzw. 45 kD bestimmt [57,83]. Für das menschliche SeP wurden die analogen Molekülmassen von Åkesson et al. mit 61 kD und 55 kD [108], von Mostert et al. mit 61 kD und 51 kD bestimmt [124]. In guter Übereinstimmung mit diesen Werten wurden die Molekülmassen der Hauptfraktionen des SeP in dieser Arbeit mit 65 kD und 56 kD bestimmt. Auffallend bei der Auswertung der Bandenmuster waren die zahlreichen, vor allem niedermolekularen Banden geringer Intensität, die zusätzlich zu den erwarteten SeP-Banden bei 65 kD und 56 kD detektiert wurden. Es gibt mehrere Vermutungen über den Ursprung dieser Banden.

Mit Tris-Puffer nach Laemmli [155] kann es während des mehrminütigen Kochens der Proben zur Aufbereitung für die SDS-PAGE durch die Temperaturabhängigkeit des Puffers zur Säurehydrolyse von Proteinen kommen [167-169]. Zur Vermeidung dieser Hydrolyse und Bildung artifizieller SeP-Bruchstücke wurde in dieser Arbeit ein temperaturstabiler Phosphatpuffer verwendet. Die niedermolekularen Banden stellen daher wohl keine aufbereitungsbedingten SeP-Bruchstücke dar.

Möglicherweise sind diese Banden Produkte einer schwachen Kreuzreaktion der aus polyklonalen Antiseren gewonnenen IgG-Präparation mit anderen Proteinen [179]. Aufgrund der langen Belichtungsdauer könnten auch diese kreuzreagierenden Proteine

zur Abbildung gelangt sein. Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe mit Antikörpern gegen andere Peptide des SeP als die hier verwendeten ergaben ebenfalls zusätzliche Banden zu den beiden erwarteten SeP-Banden, wenn auch in geringerem Ausmaß. Tujebajeva et al. (2000) [99] ist erstmals die Expression von rekombinantem Ratten-SeP gelungen. Analoge Erfolge mit humanem SeP könnte die Entwicklung spezifischerer Antikörper ermöglichen und die Herkunft dieser Banden klären helfen.

In verschiedenen anderen Studien sind ebenfalls niedermolekulare Banden bei der Charakterisierung von SeP aufgetreten. Nach Deglykosylierung von Ratten-SeP konnte eine Molekülmassenveränderung von 57 kD bzw. 45 kD zu 48 kD bzw. 36 kD nachgewiesen werden [83,99,104]. Dass dies eine heterogene Glykosylierung ist, zeigt das zusätzliche Auftreten von noch geringer glykosyliertem SeP mit einer Molekülmasse von 43 kD [104]. Auch beim humanen SeP sind nach Deglykosylierung anstelle der Banden bei 61 kD und 55 kD zahlreiche niedermolekulare Banden zwischen 32 kD und 45 kD aufgetreten [99,124]. Da es sich bei dem aktuell untersuchten Material um Biopsien und nicht um Plasma, in das das fertig synthetisierte SeP sezerniert wird, handelt, ist es durchaus möglich, dass die niedermolekularen Proteine noch nicht vollständig glykosylierte SeP-Vorstufen darstellen [179].

Nach Trypsinverdauung des Ratten-SeP wurden Peptide mit den Molekülmassen 15 kD, 19 kD, 21 kD, 34 kD und 40 kD nachgewiesen [104]. In einer Arbeit von Tujebajeva et al. (2000) [99] wurde der gleiche Protease-Inhibitor wie in der vorliegenden Arbeit bei der Aufbereitung von Zellkulturen verwendet, ohne Effekt auf das SeP-Bandenmuster. Eine Proteolyse als Ursache der niedermolekularen Banden erscheint somit weniger wahrscheinlich, da die Biopsien unmittelbar nach Entnahme in flüssigen Stickstoff gegeben und anschließend bei -80 °C gelagert worden waren. Da bei der Aufbereitung von Biopsien intrazelluläre Proteasen freigesetzt werden können, wurden die Biopsien in der vorliegenden Arbeit trotz der Ergebnisse von Tujebajeva et al. in einer mit Protease-Inhibitor versetzten Lösung aufbereitet, um eine enzymatische Spaltung der Haupt-SeP-Fractionen zu kleineren Bruchstücken zu verhindern.

Wichtige Hinweise über den Ursprung der niedermolekularen Proteine gibt die massenspektrometrische Untersuchung der Isoformen des Ratten-SeP. Ma et al. (2002) [123] konnten im Rattenplasma vier SeP-Isoformen nachweisen, die durch die komplette

Translation mit einem UAA-Codon als Stopp-Codon sowie durch Trunkierung, d.h. vorzeitig abgebrochene SeP-Translation am 2., 3. und 7. UGA-Codon der mRNA, entstehen. Theoretisch können die kleineren Isoformen auch durch Proteolyse des kompletten SeP entstehen. Hierzu wäre aber eine spezielle, bisher nicht bekannte Protease zur Spaltung an Selenocysteinresten nötig. Daher erscheint der Translationsabbruch am doppeldeutigen UGA-Codon am wahrscheinlichsten [123,124,179].

In der vorliegenden Arbeit wurden Biopsien und nicht Plasma oder Serum untersucht, weshalb es sich möglicherweise bei diesen niedermolekularen Banden auch um intrazelluläre Anhäufungen von verschiedenen SeP-Vorstufen vor bestimmten Schrittmacherenzymen der SeP-Biosynthese handeln könnte. Da diese niedermolekularen Banden aber auch im Plasma zu finden sind, müsste noch geklärt werden, wann und über welche Signale die Zellen veranlasst werden, die Vorstufen zu sezernieren.

Da es bei Biopsien aufgrund geringer Unterschiede in der Tiefe der Gewebentnahme zu einer unterschiedlichen Gewichtung der einzelnen Schleimhautschichten (Mukosa und Submukosa) kommt, können geringe Unterschiede des Bandenmusters auch auf diesem Umstand beruhen. Bei einer ausreichend grossen Anzahl von Biopsien mittelt sich dieser Unterschied aber heraus und die Ergebnisse der Biopsien aus verschiedenen Geweben können Tendenzen im Bandenmuster aufzeigen.

Auch eine Kontamination mit Blutplasma, das einen deutlich höheren SeP-Gehalt hat als die Biopsien, läßt sich aufgrund der Durchblutung der Gewebe nicht verhindern. Eine vermehrte Durchblutung kann besonders bei adenomatös verändertem Gewebe zur Verfälschung der Ergebnisse führen. Der Vergleich der Biopsien aus Rektumadenomen mit denen aus Normalschleimhaut ergab jedoch einen deutlich geringeren SeP-Gehalt in den Adenombiopsien, gemessen an der Intensität der SeP-Banden bei 65 kD und 56 kD. Eine nennenswerte Verfälschung der Ergebnisse durch Blutplasma ist somit nicht gegeben, da ansonsten bei vermehrt durchbluteten Adenomen ein gegensätzliches Ergebnis zu erwarten gewesen wäre. Durch diese Überlegung ist auch eine Verfälschung der Ergebnisse der 65 kD-Bande durch Serumalbumin unwahrscheinlich. Weiterhin fiel auf, dass bei den Adenomen vermehrt zwei deutliche Banden bei 72 kD und 87 kD zu erkennen waren. Die Bande bei 87 kD könnte dem Protein Transferrin entsprechen. Eine Kreuzreaktion von Transferrin mit dem polyklonalen Antikörper gegen SeP ist

nicht bekannt, jedoch wurde eine Komigration des Transferrinsignals mit der 87 kD-Bande in Serum-Westernanalysen beobachtet. Ob die höhere Vaskularisation der Adenome mit einem erhöhten Gehalt an Plasmaproteinen wie Transferrin zusammenhängt und das relativ gehäufte Auftreten dieser Bande bei Adenomen erklärt, bleibt vorerst unklar. Eine genauere Charakterisierung der Proteine bei 72 kD und 87 kD steht noch aus.

Da nur sehr wenige Biopsien für die vergleichende Auswertung von normaler Rektumschleimhaut mit Adenomen vorlagen, müssen die erkennbaren Trends erst noch durch größer angelegte Studien bestätigt werden. Eine solche Untersuchung von Mörk et al. (2000) [133] an elf Patienten bestätigte die hier aufgezeigten Tendenzen. Dort wurde eine deutliche Abnahme der SeP-mRNA in kolorektalen Adenomen festgestellt, verbunden mit einer Abnahme der SeP-Signale in Western Blot Analysen im Vergleich zur normalen angrenzenden Schleimhaut. Das Bandenmuster im Western Blot entspricht in guter Übereinstimmung dem hier gefundenen. Auch dort wurde eine unbekannte und nur bei Adenomen auftretende Bande bei 81 kD beschrieben. Die Differenz in den Molekülmassenangaben ist wohl auf die Verwendung unterschiedlicher Markerproteine zur Massenbestimmung zurückzuführen. Mörk et al. konnten auch eine erhöhte GI-GPX-mRNA-Expression in kolorektalen Adenomen feststellen, was auf eine mögliche komplementäre Schutzfunktion von SeP und GI-GPX in der Adenom-Karzinom-Sequenz hinweist. Unveränderte mRNA-Expression von TRR und pGPX in den gleichen Proben lassen jedoch einen von der Selenversorgung unabhängigen Prozeß vermuten. Eine veränderte Selenoproteinzusammensetzung in kolorektalen Adenomen hat eventuell eine veränderte Funktion der trunktierten SeP-Formen zur Folge. Es bleibt aber weiterhin unklar, ob die Trunktion Folge oder Ursache von Adenomen ist.

Die kolorektale Karzinogenese ist ein mehrschrittiges Geschehen. Durch ROS werden DNA-Schäden, Mutationen, Onkogenaktivierung, Tumorsuppressorgen-Inaktivierung und somit Tumorinitiation und -progression verursacht. Bei einem vermuteten komplementären Zusammenwirken von SeP und GI-GPX in der oxidativen Verteidigung könnte die verminderte SeP Expression ein frühes Ereignis in der Adenom-Karzinom-Sequenz mit konsekutiv vermehrter Anfälligkeit für oxidative DNA-Schäden und Geninstabilität sein. Die GI-GPX-Expressionssteigerung könnte dann einen Ausgleichs-

mechanismus darstellen oder eine andere Zusammensetzung der zellulären Anteile der Biopsien normaler kolorektaler Schleimhaut versus Adenom widerspiegeln [133].

Potentielle Regulationsfaktoren der SeP-Synthese in adenomatös veränderter Schleimhaut stellen inflammatorische Zytokine wie Interferon- γ , IL-1 β , TNF- α und TGF- β dar [58,60,59]. Diese Zytokine bewirken in Kolonkarzinomzelllinien eine Herunterregulation der SeP-Promotoraktivität und der SeP-Expression. Über die Adenom-Karzinom-Sequenz kolorektaler Karzinome besteht somit ein möglicher Zusammenhang zwischen den auf Karzinomzelllinien regulatorisch wirksamen Zytokinen und der damit verbundenen SeP-Regulation und der Entstehung von Adenomen aus gesunder kolorektaler Schleimhaut. Bisher fehlt jedoch der Nachweis von lokaler Freisetzung dieser herunterregulierenden Zytokine in Adenomen.

Diesem Regulationsmechanismus auf Transkriptionsebene, der SeP als ein negativ-Akut-Phase-Protein darstellt, steht eine andere Überlegung entgegen. Die SeP-Heparin-affinität steigt mit sinkendem pH-Wert und ermöglicht dadurch eine bessere Bindung an Membranen in entzündeten Geweben [57,109]. Dadurch könnte SeP in entzündeten Geweben akkumulieren und durch seine antioxidativen Eigenschaften der Entzündung entgegengewirken. Außerdem könnte SeP als Selentransportprotein dort Selen für andere antiinflammatorische Reaktionen oder Proteine bereitstellen. Die exakte Regulation und Aufgabe von SeP in entzündetem Gewebe muss durch weitere Untersuchungen noch geklärt werden.

Wie in der Einleitung bereits ausgeführt, weisen zahlreiche Studien auf eine antikarzinogene Wirkung von Selen hin. Da hierbei höhere Plasmaselenspiegel gemessen wurden als für eine gesättigte Selenoprotein-Biosynthese notwendig wäre, ist es unwahrscheinlich, dass diese allein durch Selenoproteine zustandekommt [14]. Vielmehr muss ein multimodales Wirken von Selen in seinen verschiedenen Erscheinungsformen an wahrscheinlich auch sehr unterschiedlichen Prozessen in der frühen oder späten Karzinogenese angenommen werden. Niedermolekulare Selenformen, die nicht der Biosynthese von Selenoproteinen zugeführt werden, weisen ebenfalls antikarzinogene Eigenschaften auf. Insbesondere methylierte Selenformen scheinen eine protektive Wirkung zu besitzen [9,52,54]. Der genaue Mechanismus ist unklar. Da diese niedermolekularen Selenformen nur einen geringen Anteil am

gesamten Plasmaselenengehalt ausmachen, aber bereits in geringen Konzentrationen eine potente antikarzinogene Wirkung entfalten, muss auch die Definition der Bioverfügbarkeit für Selen diskutiert werden. Selen-Bioverfügbarkeit wird mit der Fähigkeit verbunden, Selenspeicher in Organen aufzufüllen, Markerenzymaktivitäten zu erhöhen (cGPX, pGPX) oder die Plasmakonzentration von Markerproteinen zu erhöhen (SeP). Es existieren somit Selenformen, wie Selen-Methylselenocystein, die in diesem Sinne eine sehr schlechte Bioverfügbarkeit aufweisen, jedoch durch ihre starke antikarzinogene Wirkung eine hohe biologische Wertigkeit besitzen [44]. Dies sollte man auch bei der Selensupplementierung selendefizienter Personen oder ganzer Regionen beachten und nicht nur eine Selenform anwenden, sondern neben einer Salzform auch selenangereicherte Nahrungsmittel einsetzen.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung des Western Blots für den semiquantitativen Nachweis von humanem SeP in Rektumbiopsien. Kernstück der Arbeit war die Anpassung der einzelnen Verfahrensschritte des Western Blots an die besonderen Gegebenheiten bei der Verarbeitung von Schleimhautbiopsien. Bei der Probenaufbereitung, Auftrennung und Detektion des SeP musste besonders der geringe SeP-Gehalt der Biopsien beachtet werden.

Bei Patienten mit Selen substitution waren zumeist schwächere Signale der SeP-Banden und der meisten anderen Banden im Vergleich zu Patienten ohne Selen substitution erkennbar. Die Selen substitution spiegelte sich also nicht im SeP-Gehalt der Biopsien wider. Beim Vergleich der Biopsien gesunder Rektumschleimhaut mit den dazugehörigen Adenombiopsien derselben Patienten ergab sich ein deutlich höherer SeP-Gehalt in den Biopsien der gesunden Rektumschleimhaut. Auch das Bandenmuster bei den Adenombiopsien zeigte Unterschiede zur normalen Rektumschleimhaut. So waren bei den Adenomen vermehrt größere Proteine, bei der normalen Rektumschleimhaut vermehrt kleinere Proteine als SeP detektierbar. Auffallend war eine 87 kD-Bande, die gehäuft bei Adenomen auftrat, deren Herkunft bisher nicht bekannt ist. Die niedermolekularen Banden könnten deglykosyliertes oder an einem der UGA-Codons trunkiertes SeP darstellen. Eine genaue Analyse und Identifizierung dieser Banden und ihre Bedeutung steht aber noch aus. In der Zusammenschau der aktuellen Studienlage scheint die Gewährleistung einer ausreichenden täglichen Selenzufuhr, gegebenenfalls auch durch orale Substitution als Nahrungsergänzung, im Hinblick auf die Prävention maligner Tumore sinnvoll und bei schwerkranken Personen prognoseverbessernd zu sein. Die genauen Ansatzpunkte der Selenwirkung sind aber nach wie vor noch nicht vollständig geklärt.

Literaturverzeichnis

- [1] Schwarz, K., Foltz, C.M.: Selenium is an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J. Am. Chem. Soc.* 1957; 79: 3292-3293.
- [2] Flohé, L., Günzler, W., Schock, H.H.: Glutathion peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* 1973; 32: 132-134.
- [3] Oster, O.: Zum Selenstatus in der Bundesrepublik Deutschland. Universitätsverlag, Jena, 1992.
- [4] Reilly, C.: Selenium in food and health. Blackie Academic and Professional, London, 1996.
- [5] Deutsche Gesellschaft für Ernährung: Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr 2000. www.dge.de.
- [6] Oster, O., Prellwitz, W.: The daily dietary selenium intake of West German Adults. *Biol. Trace Elem. Res.* 1989; 20: 1-14.
- [7] Köhrle, J., Dreher, I., Jakob, F.: Selenoproteins and antioxidative Defense systems. Manuscript Siebold Memorial International Medical Symposium, Nagasaki, Japan; 26.-29. September 1996.
- [8] Dickson, R.C., Tomlinson, R.H.: Selenium in blood and human tissues. *Clin. Chim. Acta* 1967; 16: 311-321.
- [9] Ganther, H.E.: Selenium metabolism and mechanisms of cancer prevention. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2001; 492: 119-130.
- [10] Uden, P.C., Bird, S.M., Kotrebai, M., Nolibos, P., Tyson, J.F., Block, E., Denoyer, E.: Analytical selenoaminoacid studies by chromatography with interfaced atomic mass spectrometry and atomic emission spectral detection. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1998; 362: 447-456.
- [11] Burk, R.F., Hill, K.E.: Regulation of selenoproteins. *Annu. Rev. Nutr.* 1993; 13: 65-81.
- [12] Burk, R.F., Hill, K.E., Motley, A.K.: Plasma selenium in specific and non-specific forms. *BioFactors* 2001; 14: 107-114.
- [13] Cai, X.J., Block, E., Uden, P.C., Zhang, X., Quimby, B.D., Sullivan, J.J.: Allium chemistry: identification of selenoamino acids in ordinary and selenium-enriched garlic, onion, and broccoli using gas chromatography with atomic emission detection. *J. Agric. Food Chem.* 1995; 43: 1754-1757.
- [14] Holben, D.H., Smith, A.M.: The diverse role of selenium within selenoproteins: A review. *J. Am. Diet. Assoc.* 1999; 99: 836-843.
- [15] Combs, G.F., Combs, S.B.: *The Role of Selenium in Nutrition.* Academic Press, New York, London, 1986: 532ff.
- [16] Bähr, K., Dreher, I., Köhrle, J.: Selenium supplementation by selenium yeast and sodium selenite: analysis of the selenium status as well as risk of deficiency and intoxication. *J. Lab. Med.* 1999; 23: 594-599.
- [17] Foster, L.H., Sumar, S.: Selenium in Health and Disease: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1997; 37: 211-228.
- [18] Kiremidjian-Schumacher, L., Stotzky, G.: Selenium and immune responses. A review. *Environ. Res.* 1987; 42: 277-302.
- [19] Schrauzer, G.N.: Anticarcinogenic effects of selenium. *Cell. Mol. Life Sci.* 2000; 57: 1864-1873.
- [20] Rayman, M.P.: The importance of selenium to human health. *Lancet* 2000; 356: 233-241.
- [21] Yang, G.Q, Xia, Y.M.: Studies on human dietary requirements and safe range of dietary intakes of selenium in China and their application in the prevention of relates endemic diseases. *Biomed. Environ. Sci.* 1995; 8: 187-201.

- [22] Beck, M.A., Shi, Q., Morris, V.C., Levander, O.A.: Rapid genomic evolution of a non-virulent Coxsackievirus B3 in selenium-deficient mice results in selection of identical virulent isolates. *Nat. Med.* 1995; 1: 433-436.
- [23] Yang, C., Niu, C., Bodo, M., Gabriel, E., Notbohm, H., Wolf, E., Muller, P.K.: 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.* 1993; 289: 829-835.
- [24] Moreno-Reyes, R., Suetens, C., Mathieu, F., Begaux, F., Zhu, D., Rivera, M.T., Boelart, M., Néve, J., Perlmutter, N., Vanderpas, J.: Kashin-Beck osteoarthropathy in rural Tibet in relation to selenium and iodine status. *New England J. Med.* 1998; 339: 1112-1120.
- [25] Dumont, J.E., Corvilain, B., Contempre, B.: The biochemistry of endemic cretinism: roles of iodine and selenium deficiency and goitrogens. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1994; 100: 163-166.
- [26] Contempre, B., Dumont, J.E., Denef, J.-F., Many, M.-C.: Effects of selenium deficiency on thyroid necrosis, fibrosis and proliferation: a possible role in myxoedematous cretinism. *Eur. J. Endocrinol.* 1995; 133: 99-109.
- [27] Behne, D., Weiler, H., Kyriakopoulos, A.: Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. *J. Reprod. Fertil.* 1996; 106: 291-297.
- [28] Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wising, J., Flohé, L.: Dual funktion of the selenoproteins PH-GPx during sperm maturation. *Science* 1999; 285: 1393-1396.
- [29] Néve, J.: Selenium as a risk factor for cardiovascular diseases. *J. Cardiovasc. Risk* 1996; 3: 42-47.
- [30] Hawker, F.H., Stewart, P.M., Snitch, P.J.: Effects of acute illness on selenium homeostasis. *Crit. Care Med.* 1990; 18: 442-446.
- [31] Gärtner, R., Angstwurm, M.W., Schottdorf, J.: Selenium administration in sepsis patients. *Med. Klin.* 1997; 92: 12-14.
- [32] Forceville, X., Vitoux, D., Gauzit, R., Combes, A., Lahilaire, P., Chappuis, P.: Selenium, systemic immune response syndrome, sepsis, and outcome in critically ill patients. *Crit. Care Med.* 1998; 26: 1536-1544.
- [33] Schweizer, U., Schomburg, L., Savaskan, N.E.: The Neurobiology of Selenium: Lessons from Transgenic Mice. *J. Nutr.* 2004; 134: 707-710.
- [34] Schomburg, L., Schweizer, U., Holtmann, B., Flohé, L., Sendtner, M., Köhrle, J.: Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem. J.* 2003; 370: 397-402.
- [35] Hill, K.E., Lyons, P.R., Burk, R.F.: Differential regulation of rat liver selenoprotein mRNAs in selenium deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 185: 260-263.
- [36] Yang, J.G., Hill, K.E., Burk, R.F.: Dietary selenium controls rat plasma selenoprotein P concentration. *J. Nutr.* 1989; 119: 1010-1012.
- [37] Behne, D., Hilmert, H., Scheid, S., Gessner, H., Elger, W.: Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1988; 966: 12-21.
- [38] Low, S.C., Grundner-Culemann, E., Harney, J.W., Berry, M.J.: SECIS-SBP2 interactions dictate selenocysteine incorporation efficiency and selenoprotein hierarchy. *EMBO J.* 2000; 19: 6882-6890.
- [39] Berry, M.J., Banu, L., Harney, J.W., Larsen, P.R.: Functional characterization of eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons. *EMBO J.* 1993; 12: 3315-3322.
- [40] Clark, L.C., Hixson, L.J., Combs, G.F.Jr., Reid, M.E., Turnbull, B.W., Sampliner, R.E.: Plasma selenium concentration predicts the prevalence of colorectal adenomatous polyps. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1993; 2: 41-46.

- [41] Russo, M.W., Murray, S.C., Wurzelmann, J.I., Woosley, J.T., Sandler, R.S.: Plasma selenium and the risk of colorectal adenomas. *Nutr. Cancer* 1997; 28: 125-129.
- [42] Feng, Y., Finley, J.W., Davis, C.D., Becker, W.K., Fretland, A.J., Hein, D.W.: Dietary selenium reduces the formation of aberrant crypts in rats administered 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1999; 157: 36-42.
- [43] Clark, L.C., Combs, G.F., Turnbull, B.W., et al.: Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. *JAMA* 1996; 276: 1957-1963.
- [44] Finley, J.W., Davis, C.D., Feng, Y.: Selenium from high selenium broccoli protects rats from colon cancer. *J. Nutr.* 2000; 130: 2384-2389.
- [45] Brandt, P.A. van den, Goldbohm, R.A., van't Veer, P., Bode, P., Dorant, E., Hermus, R.J.J., et al.: A prospective cohort study on toenail selenium levels and risk of gastrointestinal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993; 85: 224-229.
- [46] Birt, D.F., Pour, P.M., Pelling, J.C.: The influence of dietary selenium on colon, pancreas, and skin tumorigenesis. In: Wendel, A. (Hrsg.): *Selenium in Biology and Medicine*. Springer Verlag, Berlin, 1989: 297-304.
- [47] Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Willett, W.C.: The epidemiology of selenium and cancer. *Cancer Surveys* 1987; 6: 623-633.
- [48] McGarrity, T.J., Pfeiffer, L.P.: Selenium and difluoromethylornithine additively inhibit DMH-induced distal colon tumor formation in rats fed a fiber-free diet. *Carcinogenesis* 1993; 14: 2335-2340.
- [49] Mörk, H., Al-Taie, O., Dreher, I., Karvar, S., Scheurlen, M., Köhrle, J., Jakob, F.: Expression von Selenoproteinen im Gastrointestinaltrakt - Implikationen für die Karzinogenese. In: *Fo. Onkologie* 1999; 2, Suppl. 2: 12-20.
- [50] Jacobs, M.M.: Selenium inhibition of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 1983; 43: 1646-1649.
- [51] Ip, C., Lisk, D.J.: Efficacy of cancer prevention by high-selenium garlic is primarily dependent on the action of selenium. *Carcinogenesis* 1995; 16: 2649-2652.
- [52] Combs, G.F., Jr.: Considering the mechanisms of cancer prevention by selenium. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2001; 492: 107-117.
- [53] Poirier, K.A., Milner, J.A.: Factors influencing the antitumorigenic properties of selenium in mice. *J. Nutr.* 1983; 113: 2147-2154.
- [54] Ganther, H.E.: Selenium metabolism, selenoproteins, and mechanisms of cancer prevention: Complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1657-1666.
- [55] Nelson, K.K., Bacon, B., Christensen, M.J.: Selenite supplementation decreases the expression of MAZ in HT29 human colon adenocarcinoma cells. *Nutr. Cancer* 1996; 26: 73-81.
- [56] Hill, K.E., Dasouki, M., Phillips, J.A., Burk, R.F.: Human selenoprotein P gene maps to 5q31. *Genomics* 1996; 36: 550-551.
- [57] Chittum, H.S., Himeno, S., Hill, K.E., Burk, R.F.: Multiple forms of selenoprotein P in rat plasma. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996; 325: 124-128.
- [58] Dreher, I., Jacobs, T., Köhrle, J.: Cloning and characterization of the human selenoprotein P promoter. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 29364-29371.
- [59] Hesse-Bähr, K., Dreher, I., Köhrle, J.: The influence of the cytokines IL-1 β and INF γ on the expression of selenoproteins in the human hepatocarcinoma cell line HepG2. *BioFactors* 2000; 11: 83-85.

- [60] Mostert, V., Wolff, S., Dreher, I., Köhrle, J., Abel, J.: Identification of an element within the promoter of human selenoprotein P responsive to transforming growth factor- β . *Eur. J. Biochem.* 2001; 268: 6176-6181.
- [61] Mostert, V., Dreher, I., Köhrle, J., Abel, J.: Transforming growth factor- β_1 inhibits expression of selenoprotein P in cultered human liver cells. *FEBS Lett.* 1999; 460: 23-26.
- [62] Shull, M.M., Ormsby, I., Kier, A.B., Pawlowski, S., Diebold, R.J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., Annunziata, N., Doetschman, T.: Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992; 359: 693-699.
- [63] Assoian, R.K., Fleurdelys, B.E., Stevenson, H.C., Miller, P.J., Madtes, D.K., Raines, E.W., Ross, R., Sporn, M.B.: Expressiveness and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 6020-6024.
- [64] Heldin, C.H., Miyazono, K., ten Dijke, P.: TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus through Smad proteins. *Nature* 1997; 390: 465-471.
- [65] Denmler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S., Gauthier, J.M.: Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type I gene. *EMBO J.* 1998; 17: 3091-3100.
- [66] Jonk, L.J., Itoh, S., Heldin, C.H., ten Dijke, P., Kruijjer, W.: Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor-beta, activin, and bone morphogenetic protein-inducible enhancer. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 21145-21152.
- [67] Mostert, V., Dreher, I., Köhrle, J., Wolff, S., Abel, J.: Modulation of selenoprotein P expression by TGF- β_1 is mediated by smad proteins. *BioFactors* 2001; 14: 135-142.
- [68] Stadtman, T.C.: Selenocysteine. *Annu. Rev. Biochem.* 1996; 65: 83-100.
- [69] Köhrle, J., Brigelius-Flohé, R., Böck, A., Gärtner, R., Meyer, O., Flohé, L.: Selenium in biology: facts and medical perspectives. *Biol. Chem.* 2000; 381: 849-864.
- [70] Burk, R.F., Hill, K.E.: Selenoprotein P. A selenium-rich extracellular glycoprotein. *J. Nutr.* 1994; 124: 1891-1897.
- [71] Hill, K.E., Lloyd, R.S., Yang, J.G., Read, R., Burk, R.F.: The cDNA for rat selenoprotein P contains ten TGA codons in the open reading frame. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 10050-10053.
- [72] Kryukov, G.V., Gladyshev, V.N.: Selenium metabolism in zebrafish: multiplicity on selenoprotein genes and expression of a protein containing seventeen selenocysteine residues. *Genes Cells* 2000; 5: 1049-1060.
- [73] Hubert, N., Walczak, R., Sturchler, C., Myslinski, E., Schuster, C., Westhof, E., Carbon, P., Krol, A.: RNAs mediating cotranslational insertion of selenocysteine in eukaryotic selenoproteins. *Biochimie* 1996; 78: 590-596.
- [74] Copeland, P.R., Driscoll, D.M.: Purification, redox sensitivity and RNA binding properties of SECIS-binding protein 2, a protein involved in selenoprotein synthesis. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 25447-25454.
- [75] Copeland, P.R., Fletcher, J.E., Carlson, B.A., Hatfield, D.L., Driscoll, D.M.: A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. *EMBO J.* 2000; 19: 306-314.
- [76] Lescure, A., Allmang, C., Yamada, K., Carbon, P., Krol, A.: cDNA cloning, expression pattern and RNA binding analysis of human selenocysteine insertion sequence (SECIS) binding protein 2. *Gene* 2002; 291: 279-285.

- [77] Berry, M.J., Tujebajeva, R.M., Copeland, P.R., Xu, X.M., Carlson, B.A., Martin, G.W., Low, S.C., Mansell, J.B., Grundner-Culemann, E., Harney, J.W., Driscoll, D.M., Hatfield, D.L.: Selenocysteine incorporation directed from the 3'UTR: Characterization of eukaryotic EFsec and mechanistic implications. *BioFactors* 2001; 14: 17-24.
- [78] Tujebajeva, R.M., Copeland, P.R., Xu, X.M., Carlson, B.A., Harney, J.W., Driscoll, D.M., Hatfield, D.L., Berry, M.J.: Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion. *EMBO Rep.* 2000; 1: 158-163.
- [79] Sturchler, C., Westhof, E., Carbon, P., Krol, A.: Unique secondary and tertiary structural features of the eukaryotic selenocysteine tRNA^{Sec}. *Nucleic Acids Res.* 1993; 21: 1073-1079.
- [80] Low, S.C., Harney, J.W., Berry, M.J.: Cloning and functional characterization of human selenophosphate synthetase, an essential component of selenoprotein synthesis. *J. Bio. Chem.* 1995; 270: 21659-21664.
- [81] Mizutani, T., Kurata, H., Yamada, K., Totsuka, T.: Some properties of murine selenocysteine synthase. *Biochem. J.* 1992; 284: 827-834.
- [82] Hill, K.E., Lloyd, R.E., Burk, R.F.: Conserved nucleotide sequences in the open reading frame and 3' untranslated region of selenoprotein P mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 537-541.
- [83] Himeno, S., Chittum, H.S., Burk, R.F.: 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.* 1996; 271: 15769-15775.
- [84] Martin, G.W., Harney, J.W., Berry, M.J.: Selenocysteine incorporation in eukaryotes: insights into mechanism and efficiency from sequence, structure, and spacing proximity studies of the type 1 deiodinase SECIS element. *RNA* 1996; 2: 171-182.
- [85] Heider, J., Baron, C., Böck, A.: Coding from a distance: dissection of the mRNA determinants required for the incorporation of selenocysteine into protein. *EMBO J.* 1992; 11: 3759-3766.
- [86] Walczak, R., Westhof, E., Carbon, P., Krol, A.: A novel RNA structural motif in the selenocysteine insertion element of eukaryotic selenoprotein mRNAs. *RNA* 1996; 2: 367-379.
- [87] Martin, G.W., Harney, J.W., Berry, M.J.: Functionality of mutations at conserved nucleotides in eukaryotic SECIS elements is determined by the identity of a single non-conserved nucleotide. *RNA* 1998; 4: 65-73.
- [88] Grundner-Culemann, E., Martin, G.W., Harney, J.W., Berry, M.J.: Two distinct SECIS structures capable of directing selenocysteine incorporation in eukaryotes. *RNA* 1999; 5: 625-635.
- [89] Walczak, R., Carbon, P., Krol, A.: An essential non-Watson-Crick base pair motif in 3'UTR to mediate selenoprotein translation. *RNA* 1998; 4: 74-84.
- [90] Low, S.C., Berry, M.J.: Knowing when not to stop: Selenocysteine incorporation in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 1996; 21: 203-208.
- [91] Turner, D.H., Sugimoto, N.: RNA structure prediction. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 1988; 17: 167-192.
- [92] Kollmus, H., Flohé, L., McCarthy, J.E.G.: Analysis of eukaryotic mRNA structures directing cotranslational incorporation of selenocysteine. *Nucleic Acids Res.* 1996; 24: 1195-1201.
- [93] Kromayer, M., Wilting, R., Tormay, P., Böck, A.: Domain structure of the prokaryotic selenocysteine-specific elongation factor SelB. *J. Mol. Biol.* 1996; 262: 413-420.
- [94] Fletcher, J.E., Copeland, P.R., Driscoll, D.M., Krol, A.: The selenocysteine incorporation machinery: Interactions between the SECIS RNA and the SECIS-binding protein SBP2. *RNA* 2001; 7: 1442-1453.
- [95] Ito, K., Uno, M., Nakamura, Y.: A tripeptide 'anticodon' deciphers stop codons in messenger RNA. *Nature* 2000; 403: 680-684.

- [96] Baron, C., Westhof, E., Böck, A., Giegé, R.: Solution structure of selenocysteine tRNA^{Sec} from *E. coli*. Comparison with canonical tRNA^{Ser}. *J. Mol. Biol.* 1993; 231: 274-292.
- [97] Diamond, A.M. et al.: Dietary selenium affects methylation of the wobble nucleoside in the anticodon of selenocysteine tRNA. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 14215-14223.
- [98] Lee, B.J., Park, S.I., Park, J.M., Chittum, H.S., Hatfield, D.L.: *Molecular Biology of Selenium and Its Role in Human Health*. *Mol. Cells* 1996; 6: 509-520.
- [99] Tujebajeva, R.M., Harney, J.W., Berry, M.J.: Selenoprotein P Expression, Purification, and Immunochemical Characterization. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 6288-6294.
- [100] Nasim, M.T., Jaenecke, S., Belduz, A., Kollmus, H., Flohé, L., McCarthy, J.E.G.: Eukaryotic selenocysteine incorporation follows a nonprocessive mechanism that competes with translational termination. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 14846-14852.
- [101] Martin, G.W., Berry, M.J.: Selenocysteine codons decrease polysome association on endogenous selenoprotein mRNAs. *Genes Cells* 2001; 6: 121-129.
- [102] McCaughan, K.K., Brown, C.M., Dalphin, M.E., Berry, M.J., Tate, W.P.: Translation termination efficiency in mammals is influenced by the base following the stop codon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 5431-5435.
- [103] Grundner-Culemann, E., Martin, G.W. 3rd, Tujebajeva, R., Harney, J.W., Berry, M.J.: Interplay between termination and translation machinery in eukaryotic selenoprotein synthesis. *J. Mol. Biol.* 2001; 310: 699-707.
- [104] Read, R., Bellew, T., Yang, J.G., Hill, K.E., Palmer, I.S., Burk, R.F.: Selenium and amino acid composition of selenoprotein P, the major selenoprotein in rat serum. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 17899-17905.
- [105] Mostert, V.: Selenoprotein P: properties, functions, and regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000; 376: 433-438.
- [106] Hondal, R.J., Ma, S., Caprioli, R.M., Hill, K.E., Burk, R.F.: Heparin-binding histidine and lysine residues of rat selenoprotein P. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 15823-15831.
- [107] Burk, R.F., Hill, K.E., Boeglin, M.E., Ebner, F.F., Chittum, H.S.: Selenoprotein P associates with endothelial cells in rat tissues. *Histochem. Cell Biol.* 1997; 108: 11-15.
- [108] Åkesson, B., Bellew, T., Burk, R.F.: Purification of selenoprotein P from human plasma. *Biochim. Biophys. Acta* 1994; 1204: 243-249.
- [109] Arteel, G.E., Franken, S., Kappler, J., Sies, H.: Binding of selenoprotein P to heparin: characterization with surface plasmon resonance. *Biol. Chem.* 2000; 381: 265-268.
- [110] Yoneda, S., Suzuki, K.T.: Equimolar Hg-Se complex binds to selenoprotein P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 231: 7-11.
- [111] Sasakura, C., Suzuki, K.T.: Biological interaction between transition metals (Ag, Cd and Hg), selenide/sulfide and selenoprotein P. *J. Inorg. Biochem.* 1998; 71: 159-162.
- [112] Burk, R.F., Lawrence, R.A., Lane, J.M.: Liver necrosis and lipid peroxidation in the rat as the result of paraquat and diquat administration. *J. Clin. Invest.* 1980; 65: 1024-1031.
- [113] Burk, R.F., Hill, K.E., Awad, J.A., Morrow, J.D., Kato, T., Cockell, K.A., et al.: Pathogenesis of diquat-induced liver necrosis in selenium-deficient rats. Assessment of the roles of lipid peroxidation and selenoprotein P. *Hepatology* 1995; 21: 561-569.
- [114] Dreher, I., Schmutzler, C., Jakob, F., Köhrle, J.: Expression of selenoproteins in various rat and human tissues and cell lines. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 1997; 11: 83-91.
- [115] Mörk, H., Lex, B., Scheurlen, M., Dreher, I., Schütze, N., Köhrle, J., Jakob, F.: Expression pattern of gastrointestinal selenoproteins - targets for selenium supplementation. *Nutr. Cancer* 1998; 32: 64-70.

- [116] Persson-Moschos, M.: Selenoprotein P. *Cell Mol. Life Sci.* 2000; 57: 1836-1845.
- [117] Yang, J.G., Morrison-Plummer, J., Burk, R.F.: Purification and quantitation of a rat plasma selenoprotein distinct from glutathione peroxidase using monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 13372-13375.
- [118] Hill, K.E., Xia, Y., Åkesson, B., Boeglin, M.E., Burk, R.F.: Selenoprotein P concentration in plasma is an index of selenium status in selenium-deficient and selenium-supplemented chinese subjects. *J. Nutr.* 1996; 126: 138-145.
- [119] Persson-Moschos, M., Huang, W., Srikumar, T.S., Lindeberg, S., Åkesson, B.: Selenoprotein P in serum as a biochemical marker of selenium status. *Analyst* 1995; 120: 833-836.
- [120] Burk, R.F., Hill, K.E., Read, R., Bellew, T.: Response of rat selenoprotein P to selenium administration and fate of its selenium. *Am. J. Physiol.* 1991; 261: E26-E30.
- [121] Burk, R.F., Gregory, P.E.: Some characteristics of ⁷⁵Se-P, a selenoprotein found in rat liver and plasma, and comparison of it with selenogluthione peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1982; 213: 73-80.
- [122] Motchnik, P.A., Tappel, A.L.: Rat plasma selenoprotein P properties and purification. *Biochim. Biophys. Acta* 1989; 993: 27-35.
- [123] Ma, S., Hill, K.E., Caprioli, R.M., Burk, R.F.: Mass spectrometric characterization of full-length rat selenoprotein P and three isoforms shortened at the C terminus. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 12749-12754.
- [124] Mostert, V., Lombeck, I., Abel, J.: A novel method for the purification of selenoprotein P from human plasma. *Arch. Biochem. Biophys.* 1998; 357: 326-330.
- [125] Chu, F.F., Esworthy, R.S., Doroshov, J.H., Doran, K., Liu, X.F.: Expression of plasma glutathione peroxidase in human liver in addition to kidney, heart, lung, and breast in humans and rodents. *Blood* 1992; 79: 3233-3238.
- [126] Avissar, N., Ornt, D.B., Yagil, Y., Horowitz, S., Watkins, R.H., Kerl, E.A., Takahashi, K., Palmer, I.S., Cohen, H.J.: Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am. J. Physiol.* 1994; 266: C367-C375.
- [127] Takahashi, K., Avissar, N., Whitin, J., Cohen, H.: Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 1987; 256: 677-686.
- [128] Whanger, P.D., Beilstein, M.A., Thomson, C.D., Robinson, M.F., Howe, M.: Blood selenium and glutathione peroxidase activity of populations in New Zealand, Oregon, and South Dakota. *FASEB J.* 1988; 2: 2996-3002.
- [129] Saito, Y., Hayashi, T., Tanaka, A., Watanabe, Y., Suzuki, M., Saito, E., Takahashi, K.: Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 2866-2871.
- [130] Ursini, F., Maiorino, M., Gregolin, C.: The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1985; 839: 62-70.
- [131] Holovet, P., Collen, D.: Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis. *FASEB J.* 1994; 8: 1279-1284.
- [132] Weitzel, F., Ursini, F., Wendel, A.: Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in various mouse organs during selenium deficiency and repletion. *Biochim. Biophys. Acta* 1990; 1036: 88-94.
- [133] Mörk, H., Al-Taie, O.H., Bähr, K., Zierer, A., Beck, C., Scheurlen, M., Jakob, F., Köhrle, J.: Inverse mRNA expression of the selenocysteine-containing protein GI-GPx and SeP in colorectal adenomas compared with adjacent normal mucosa. *Nutr. Cancer* 2000; 37: 108-116.

- [134] Chu, F.F.; Doroshow, J.H.; Esworthy, R.S.: Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase. GSHPx-GI. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 2571-2576.
- [135] Guimaraes, M.J., Peterson, D., Vicari, A., Cocks, B.G., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Ferrick, D.A., Kastelein, R.A., Bazan, J.F., Zlotnik, A.: Identification of a novel seld homolog from eukaryotes, bacteria and archeae: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 15086-15091.
- [136] Arteel, G.E., Mostert, V., Oubrahim, H., Briviba, K., Abel, J., Sies, H.: Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration. *Biol. Chem.* 1998; 379: 1201-1205.
- [137] Hafeman, D.G., Hoekstra, W.G.: Lipid peroxidation in vivo during vitamin E and selenium deficiency in the rat as monitored by ethane evolution. *J. Nutr.* 1977; 107: 666-672.
- [138] Sies, H., Sharov, V.S., Klotz, L.O., Briviba, K.: Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 27812-27817.
- [139] Arteel, G.E., Briviba, K., Sies, H.: Function of thioredoxin reductase as a peroxynitrite reductase using selenocysteine or ebselen. *Chem. Res. Toxicol.* 1999; 12: 264-269.
- [140] Gomez, B.Jr., Tappel, A.L.: Selenoprotein P receptor from rat. *Biochim. Biophys. Acta* 1989; 979: 20-26.
- [141] Wilson, D.S., Tappel, A.L.: Binding of plasma selenoprotein P to cell membranes. *J. Inorg. Biochem.* 1993; 51: 707-714.
- [142] Cuajungco, M.P., Lees, G.J.: Zinc metabolism in the brain: relevance to human neurodegenerative disorders. *Neurobiol. Dis.* 1997; 4: 137-169.
- [143] Yan, J., Barrett, J.N.: Purification from bovine serum of a survival-promoting factor for cultured central neurons and its identification as selenoprotein-P. *J. Neurosci.* 1998; 18: 8682-8691.
- [144] Marchaluk, E., Persson-Moschos, M., Thorling, E.B., Åkesson, B.: Variation in selenoprotein P concentration in serum from different European regions. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1995; 49: 42-48.
- [145] Persson-Moschos, M., Alftan, G., Åkesson, B.: Plasma selenoprotein P levels of healthy males in different selenium status after oral supplementation with different forms of selenium. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1998; 52: 363-367.
- [146] Hill, K.E., Boeglin, M.E., Chittum, H.S., Burk, R.F.: Immunohistochemical localization of selenoprotein P. *FASEB J.* 1996; 10: A558.
- [147] Motsenbocker, M.A., Tappel, A.L.: A selenocysteine-containing selenium-transport protein in rat plasma. *Biochim. Biophys. Acta* 1982; 719: 147-153.
- [148] Suzuki, K.T., Ishiwata, K., Ogra, Y.: Incorporation of selenium into selenoprotein P and extracellular glutathione peroxidase: HPLC-ICPMS data with enriched selenite. *Analyst* 1999; 124: 1749-1754.
- [149] Wilson, D.S., Tappel, A.L.: Subcellular fate of selenium from ⁷⁵Se-labeled plasma selenoprotein P in selenium-deficient rats. *J. Nutr. Biochem.* 1993; 4: 208-211.
- [150] Saito, Y., Takahashi, K.: Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein. *Eur. J. Biochem.* 2002; 269: 5746-5751.
- [151] Hill, K.E., Zhou, J., McMahan, W.J., Motley, A.K., Atkins, J.F., Gesteland, R., Burk, R.F.: Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 13640-13646.
- [152] Persson-Moschos, M.E., Stavenow, L., Åkesson, B., Lindgarde, F.: Selenoprotein P in plasma in relation to cancer morbidity in middle-aged Swedish men. *Nutr. Cancer* 2000; 36: 19-26.

- [153] Early, D.S., Hill, K., Burk, R., Palmer, I.: Selenoprotein levels in patients with colorectal adenomas and cancer. *Am. J. Gastroenterol.* 2002; 97: 745-748.
- [154] Al-Taie, O.H., Seufert, J., Karvar, S., Adolph, C., Mörk, H., Scheurlen, M., Köhrle, J., Jakob, F.: Selenium Supplementation Enhances Low Selenium Levels and Stimulates Glutathione Peroxidase Activity in Peripheral Blood and Distal Colon Mucosa in Past and Present Carriers of Colon Adenomas. *Nutr. Cancer* 2003; 46: 125-130.
- [155] Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- [156] Bähr, K., Schmutzler, C., Schütze, N., Köhrle, J.: Praktikumsanleitung Molekular- und Zellbiologische Methoden. Selenoprotein P im Western Blot. 1998.
- [157] Cooper, T.G.: Biochemische Arbeitsmethoden. Walter de Gruyter, Berlin, 1980.
- [158] Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254.
- [159] Bio-Rad Protein Assay, Produktinformation. Bio-Rad, München.
- [160] Rodbard, D., Chrambach, A.: Unified Theory for Gel Electrophoresis and Gel Filtration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1970; 65: 970-977.
- [161] Schägger, H., von Jagow, G.: Blue Native Electrophoresis for Isolation of Membrane Protein Complexes in Enzymatically Active Form. *Anal. Biochem.* 1991; 199: 223-231.
- [162] Schägger, H., Cramer, W.A., von Jagow, G.: Analysis of Molecular and Oligomeric States of Protein Complexes by Blue Native Electrophoresis and Isolation of Membrane Protein Complexes by Two-Dimensional Native Electrophoresis. *Anal. Biochem.* 1994; 217: 220-230.
- [163] Tsiotis, G., Nitschke, W., Haase, W., Michel, H.: Purification and Crystallisation of Photosystem I Complex from a Phycobilisome-less Mutant of the Cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7002. *Photosynth. Res.* 1993; 35: 285-297.
- [164] Stryer, L.: Biochemie. Spectrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996.
- [165] Kellner, R., Lottspeich, F., Meyer, H.E.: Microcharacterization of proteins. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1994.
- [166] Köhrle, J., Rasmussen, U.B., Ekenbarger, D.M., Alex, S., Rokos, H., Hesch, R.D., Leonard, J.L.: Affinity Labeling of Rat Liver and Kidney Type I 5'-Deiodinase. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 6155-6163.
- [167] Kowit, J.D., Maloney, J.: Protein cleavage by boiling in sodium dodecyl sulfate prior to electrophoresis. *Anal. Biochem.* 1982; 123: 86-93.
- [168] Rittenhouse, J., Marcus, F.: Peptide mapping by polyacrylamide gel electrophoresis after cleavage at aspartyl-prolyl peptide bonds in sodium dodecyl sulfate-containing buffers. *Anal. Biochem.* 1984; 138: 442-448.
- [169] Cannon-Carlson, S., Tang, J.: Modification of the Laemmli sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis procedure to eliminate artifacts on reducing and nonreducing gels. *Anal. Biochem.* 1997; 246: 146-148.
- [170] Renart, J., Reiser, J., Stark, G.R.: Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979; 76: 3116-3120.
- [171] Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979; 76: 4350-4356.

- [172] Bittner, M., Kupferer, P., Morris, C.F.: Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzoyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. *Anal. Biochem.* 1980; 102:459-471.
- [173] Kyhse-Andersen, J.J.: Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Biochem. Biophys. Methods* 1984; 10: 203-209.
- [174] Collawn, J.F., Paterson, Y.: Preparation of antipeptide antibodies. *Current Protocols in Molecular Biology* 1989; Supplement 6: 11.14.1-4.
- [175] Chou, P.Y., Fasman, G.D.: Conformational parameters for amino acids in helical, β -sheet, and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry* 1974; 13: 211-222.
- [176] Chou, P.Y., Fasman, G.D.: Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 1974; 13: 222-245.
- [177] Hopp, T.P., Woods, K.R.: A computer program for predicting protein antigenic determinants. *Mol. Immunol.* 1983; 20: 483-489.
- [178] Hopp, T.P., Woods, K.R.: Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981; 78: 3824-3828.
- [179] Hesse, K., Dreher, I., Schmutzler, C., Meißner-Weigl, J., Köhrle, J.: Properties of selenoprotein P in the human hepatocarcinoma cell line HepG2. *J. Trace Elements Med. Biol.* 1998; 12: 126.
- [180] Hesse, K., Dreher, I., Baur, A., Lex, B., Schmutzler, C., Schütze, N., Mörk, H., Jakob, F., Köhrle, J.: Expression von Selenoproteinen in eukaryontischen Zellen. In: Meissner, D. (Hrsg.): Spurenelemente. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1999: 46-48.
- [181] Kekwick, R.A.: Observations at electrophoretic moving boundary with Lamm's skale method. *Trans. Faraday Soc.* 1940; 36: 47-52.
- [182] ECL Produktanleitung, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg.
- [183] Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2nd Edition, 1989: 18.38.
- [184] Albrecht, H.O.: Über die Chemilumineszenz des Aminophthalsäurehydrazids. *Z. Phys. Chem.* 1928; 136: 321.
- [185] Whitehead, T.P., Kricka, L.J., Carter, T.J.N., Thorpe, G.H.G.: Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin. Chem.* 1979; 25: 1531-1546.
- [186] Motsenbocker, M.A.: Sensitivity limitations encountered in enhanced horseradish peroxidase catalysed chemiluminescence. *J. Biolum. Chemilum.* 1988; 2: 9-16.

Danksagung

Mein erster Dank gilt meinen Eltern. Sie begleiten mich auf meinem Weg und stehen mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Sie haben in mir das Interesse an der Natur und den Naturwissenschaften geweckt und gefördert und mir das Medizinstudium ermöglicht. Ihrer Unterstützung verdanke ich das Erlernen eines mich ausfüllenden, verantwortungsvollen Berufs. Der familiäre Rückhalt war und ist dabei ein unschätzbares Gut.

Weiter möchte ich Herrn Professor Dr. rer. nat. J. Köhrle für die Bereitstellung dieses Promotionsthemas und die Möglichkeit zum wissenschaftlichen Arbeiten danken. Seine konstruktiven Anmerkungen und Verbesserungsvorschläge während der Entstehung dieser Dissertation waren ein wichtiger Beitrag zum Erfolg.

Der gesamten Klinischen Forschergruppe/Abteilung für Molekulare Innere Medizin mit all ihren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern gebührt ebenso mein Dank für die zahlreichen praktischen Tipps und Tricks im Laboralltag. Besonders hervorheben möchte ich hierbei Frau Dr. rer. nat. Kirsten Bähr, die mich in hervorragender Weise betreute und maßgeblichen Anteil am Gelingen meines „Unternehmens Promotion“ hatte.

An dieser Stelle möchte ich auch meiner Freundin Sonja für ihr Verständnis und ihre Unterstützung bei der Entstehung dieser Dissertation danken.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Christoph Braig
Geboren am: 30.04.1975 in Regensburg
Familienstand: ledig, 1 Kind
Eltern: Dr. Christa und Dr. Werner Braig

Ausbildung:

81-85 Grundschule Großberg
85-94 Gymnasium Neutraubling
 Abschluss: Abitur
7/94-9/95 Zivildienst, Krankenhaus Barmherzige Brüder Regensburg
11/95-10/02 Studium der Humanmedizin an der
 Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
9/97 Abschluss: Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
8/98 Abschluss: 1. Staatsexamen
9/01 Abschluss: 2. Staatsexamen
10/01-2/02 1. PJ-Tertial an der Chirurgischen Klinik des Klinikums Coburg
2/02-6/02 2. PJ-Tertial an der Medizinischen Klinik des Klinikums Coburg
6/02-9/02 3. PJ-Tertial an der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg
10/02 Abschluss: 3. Staatsexamen
1/03-6/04 AiP in der Medizinischen Klinik II am Klinikum Fürth
seit 7/04 Assistenzarzt zur Weiterbildung
 in der Medizinischen Klinik II am Klinikum Fürth

Nürnberg im November 2004

