

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg
Kommissarische Leiterin des Lehrstuhls für Toxikologie:
Professor Dr. Helga Stopper**



**Beeinflussung des oxidativen Stress-Status in einem Rattenmodell:
Effekt von Selenmangel auf Niere und Leber**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Nanett Christin Cirkel

aus Nürnberg

Würzburg, März 2017

Referentin: Prof. Dr. Helga Stopper
Korreferent: Prof. Dr. Jens Broscheit
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juni 2018

Die Promovendin ist Zahnärztin

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und oxidativer Stress	1
1.2	DNA Schäden	2
1.3	Lipidperoxidation	3
1.4	Vitamin E	3
1.5	Selen	5
1.6	Glutathionperoxidase (GPx)	5
1.7	Die Selenverteilung im Körper	6
1.8	Hitzeschockproteine (HSP)	7
1.8.1	Hitzeschockprotein HSP 70	7
1.8.2	Hämoxygenase (HO)	8
1.9	Zielsetzung der Doktorarbeit	10
1.9.1	Auswirkungen von Selenmangel auf oxidativen Stress in Niere und Leber eines Rattenmodells	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Material	11
2.1.1	Western Blot	11
2.1.2	Dihydroethidium (DHE) – Färbung	16
2.2	Methoden	18
2.2.1	Herkunft der untersuchten Organe	18
2.2.2	Western Blot	19
2.2.3	Dihydroethidium (DHE) – Färbung	22
2.3	Statistische Auswertung der Ergebnisse	24
3	Ergebnisse	25

3.1	Auswirkungen von Selenmangel auf oxidativen Stress in Niere und Leber eines Rattenmodells	25
3.1.1	Nachweis des oxidativen Stress in der Leber über DHE-Färbung	25
3.1.2	Western Blot Analyse der Leber	26
3.1.3	Bestimmung der Fluoreszenzintensität der DHE-Färbung in der Niere	39
3.1.4	Western Blot Analyse der Niere	40
4	Diskussion	47
4.1	Auswirkungen des Selenmangels auf Leber und Niere	47
4.1.1	Einflüsse von Selenmangel auf die Leber	47
4.1.2	Vermehrt intrazelluläre ROS in der Niere bei Selen-Mangel	48
4.1.3	Mögliche weitere Einflüsse von Selenmangel auf den Organismus	49
4.1.4	HSP70 Konzentration bei älteren Ratten	51
4.1.5	Die HO-1 Konzentration bei älteren Ratten	52
4.1.6	Forschungsergebnisse Selenmangel bei Hühnern in der Leber	53
4.1.7	Forschungsergebnisse Selenmangel bei Hühnern in der Niere	54
4.1.8	Mögliche fortführende Arbeiten	55
	Literaturverzeichnis	56
	Anhang	63
	Danksagung	71

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2a Beispiel eines Western Blots mit Detektion von HSP 70 (Bande bei 70 kDa) und β -Actin (Bande bei 40 kDa)	22
Abbildung 2b Beispiel eines Western Blots mit Detektion von HO-1 (Bande bei 30 kDa).....	22
Abbildung 3 Darstellung der Färbung von Lebergewebe mit dem Farbstoff DHE	23
Abbildung 4 Analyse der DHE-Fluoreszenzintensität zur Bestimmung des oxidativen Stress in der Leber.....	25
Abbildung 5 Nachweis der Hämoxigenase - 1 Konzentration am 07.01.15	27
Abbildung 6 Nachweis der Hämoxigenase - 1 Konzentration am 14.01.15	28
Abbildung 7 Nachweis der Hämoxigenase - 1 Konzentration am 19.01.15	29
Abbildung 8 Analyse der HO-1 Konzentration in der Leber	30
Abbildung 9 Analyse der HSP 70 Konzentration in der Leber am 11.12.14	32
Abbildung 10 Analyse der HSP 70 Konzentration in der Leber am 11.12.14	33
Abbildung 11 Analyse der HSP 70 Konzentration in der Leber am 15.12.14	34
Abbildung 12 Analyse der HSP 70 Konzentration in der Leber am 15.12.14	35
Abbildung 13 Analyse der HSP 70 Konzentration in der Leber am 06.01.15	36
Abbildung 14 Analyse der HSP 70 Konzentration in der Leber am 20.01.15	37
Abbildung 15 Analyse der HSP 70 Konzentration in der Leber	38
Abbildung 16 Analyse der oxidativen Schäden in der Niere mittels DHE-Färbung.....	39
Abbildung 17 Analyse der der HO-1 Konzentration in der Niere am 07.01.15.....	40

Abbildung 18 Analyse der der HO-1 Konzentration in der Niere am 7.1.15 (6 Monate) und 20.01.15 (12 Monate).....	41
Abbildung 19 Analyse der HO-1 Konzentration in der Niere.....	42
Abbildung 20 Bestimmung der HSP 70 Konzentration in der Niere am 2.12.14 (6 Monate) und 6.01.15 (12 Monate).....	43
Abbildung 21 Analyse der HSP 70 Konzentration in der Niere am 06.1.15.....	44
Abbildung 22 Analyse der HSP 70 Konzentration in der Niere am 02.12.14.....	45
Abbildung 23 Analyse der HSP 70 Konzentration in der Niere	46

Abkürzungsverzeichnis

8-OHdG	8-Hydroxydesoxyguanosin
ATP:	Adenosintriphosphat
Cys:	Cystein
DHE:	Dihydroethidium
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
Fe:	Eisen
GPx:	Glutathionperoxidase
HO:	Hämoxygenase
HSP:	Hitzeschockprotein
IL:	Interleukin
kDa:	kiloDalton
KHK:	Koronare Herzkrankheit
MCP-1:	Monocyte Chemoattractant Protein-1
NaCl:	Natriumchlorid
NADPH:	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
PAI-1:	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PBS:	phosphatgepufferte Salzlösung
pH:	potentia hydrogenii (Maßeinheit für die Konzentration von Wasserstoffionen)
PIP:	lipid peroxidation inhibiting protein
PVDF:	Polyvinylidenfluorid
RNA:	Ribonukleinsäure
ROS:	reaktive Sauerstoffspezies
rpm:	revolutions per minute
SDS:	Sodiumdodecylsulfat
Se.-Def.:	Selen-defiziente Nahrung
Se:	Selen
Sec:	Selenocystein

TBS:	Tris-buffered saline
TEMED:	N, N, N', N' - Tetramethylethyldiamin
TNF α :	Tumornekrosefaktor α
Tris:	2-Amino-2-hydro-methyl- propan-1,3-diol
TRITC:	Tetramethylrhodamine
Tween 20	Polyoxyethylenesorbitan monolaurate
UCP1:	uncoupling protein 1
UV:	Ultraviolette Strahlung

1 Einleitung

1.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und oxidativer Stress

Der Begriff „oxidativer Stress“ bezeichnet ein gestörtes Gleichgewicht zwischen dem pro-oxidativen und anti-oxidativen zellulären System zu Gunsten des pro-oxidativen Teils (Siems WG, Sommerburg O, Mayer H, Grune T 1998). Dieses Gleichgewicht können die sehr reaktionsfreudigen Radikale stören. Sie besitzen ein ungepaartes Elektron in einem Orbital und können entweder ein Elektron abgeben oder aufnehmen. Daher wirken sie oxidierend oder reduzierend (Lobo et al. 2010).

Ein Organismus erzeugt Radikale vor allem in den Mitochondrien. Bei der Energiegewinnung in der Atmungskette wird Sauerstoff zu Wasser reduziert. Die Elektronentransportkette, die aus vier aufeinanderfolgenden Enzymkomplexen besteht, transferiert Elektronen von einem höheren Energieniveau auf ein niedrigeres Energieniveau. In den Enzymkomplexen finden Redoxreaktionen statt; die frei werdende Energie pumpt Protonen in den Intermembranraum. Allerdings ist es auch möglich, dass sich Elektronen dieser Kette entziehen, O_2 reduzieren und sich das Superoxid Anion ($O_2^{\cdot-}$) bildet. Dies geschieht vorwiegend am Enzymkomplex I (NADH Dehydrogenase) und Enzymkomplex III (Ubisemiquinon) der Elektronentransportkette. 1-3% des Sauerstoffs werden nicht zu Wasser reduziert, sondern es entstehen Superoxid-Anionen und daraus wiederum H_2O_2 und Hydroxyl-Radikale, also reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Adam-Vizi 2005). ROS werden in Radikale, sowie nicht-Radikale unterteilt. Zu den radikalischen ROS zählen: Superoxid ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxyl-Radikale ($HO\cdot$), Hydroperoxyl-Radikale ($HO_2\cdot$), Alkoxy-Radikale ($RO\cdot$) und Peroxyl-Radikale ($RO_2\cdot$). Zu den nicht-radikalischen ROS gehören: Wasserstoffperoxid (H_2O_2), hypochlorige Säure (HClO), Ozon (O_3), Singulett Sauerstoff und Peroxinitrit ($ONOO^-$). ROS können noch in weiteren zellulären Enzymsystemen entstehen, wie etwa NADPH Oxidase und Cyclooxygenase (Siems WG, Sommerburg O, Mayer H, Grune T 1998). Das Superoxid-Anion wird über die Superoxid-Dismutase entgiftet. Bei der Reduktion entsteht auch H_2O_2 , das durch die Glutathion-Peroxidase zu Wasser und Sauerstoff reduziert wird. Für eine hinreichende Aktivität der Glutathion-Peroxidase ist eine ausreichende Aufnahme von Selen notwendig. Aus H_2O_2 kann in Anwesenheit von

reduzierten Übergangsmetallen das sehr reaktive OH^\cdot gebildet werden (Kirkinezos und Moraes 2001) (Davies 1995).

ROS übernehmen wesentliche physiologische Funktionen als Second Messenger u.a. für das Zellwachstum und die Differenzierung (Sauer et al. 2001). Allerdings können die ROS auch zelluläre Makromoleküle wie die DNA oxidativ schädigen. Es kann in der DNA zu Punktmutationen, Fehlpaarungen der Basen mit Einzel- oder Doppelstrangbrüchen kommen. Diese Schäden erkennt und repariert entweder das zelleigene Reparatursystem oder bei irreparablen Schäden wird der programmierte Zelltod (Apoptose) eingeleitet (McDonald et al. 1993). Biologische Membranen und subzelluläre Organellen reagieren wegen ihrer mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit Oxidantien. Es wird das Peroxy-Radikal gebildet, das Biomembranen und Lipoproteine angreift. Hierbei entsteht eine Lipidperoxidation. Die Barrierefunktion der Zelle wird zerstört und die Zelle bzw. die Zellorganellen werden beeinträchtigt (Kühn und Borchert 2002). Darüber hinaus entstehen bei der Lipidperoxidation Aldehyde, die ebenfalls über reaktive Eigenschaften verfügen. Sie können die Molekülstruktur von Proteinen, Enzymen, RNA und DNA schädigen (Kohen und Nyska 2002).

Oxidativer Stress entsteht, wenn die ROS-Generierung die anti-oxidative Kapazität vorübergehend übersteigt (Davies 1995).

1.2 DNA Schäden

DNA Schäden können exogene und endogene Ursachen haben. Ultraviolette und ionisierende Strahlung sowie etliche genotoxische Chemikalien können als exogene Einwirkungen die DNA-Struktur verändern und schädigen. Endogen physiologisch bedingte Schädigungen werden durch den Zellmetabolismus verursacht, hierzu zählt die Aktivität von ROS (Hoeijmakers, Jan H. J. 2001).

DNA-Schäden entstehen durch die Modifikation von Basen, Einzel- und Doppelstrangbrüchen, Verlust von Purinen (apurinic sites), Schäden an der Desoxyribose, sowie durch DNA/DNA- oder DNA-Protein-Vernetzung. Unter den ROS verursachen die Hydroxyl-Radikale die meisten Schäden. OH^\cdot kann die Base Guanin an der C-8 Position angreifen und es entsteht das Oxidationsprodukt 8-Hydroxydeoxyguanosin (8-OHdG). Guanin besitzt das niedrigste Oxidationspotenzial aller DNA Basen und dessen Oxidation kommt somit am häufigsten vor. Aber auch

Adenin reagiert mit OH^\cdot – jedoch nicht so häufig – zu 8- oder 4-, 5-Hydroxyadenin. Pyrimidinbasen können mit dem Hydroxyl-Radikal reagieren, woraus weitere Produkte entstehen (Kohen und Nyska 2002). Andere ROS wie O_2^- und H_2O_2 führen nicht zu einer direkten Schädigung der DNA, sondern bilden andere reaktive Zwischenprodukte. Die Haber-Weiss-Reaktion überführt H_2O_2 und das Superoxid-Ion zu OH^\cdot . NO und O_2^- reagieren zu ONOO^- , welches wie Hydroxyl-Radikale die DNA leicht schädigen kann (Kohen und Nyska 2002).

1.3 Lipidperoxidation

Da alle zellulären Membranen eine hohe Konzentration an ungesättigten Fettsäuren aufweisen, können sie besonders leicht oxidiert werden. Derartige Schäden werden als Lipidperoxidation bezeichnet. Sie läuft in 3 Stadien ab (Kohen und Nyska 2002).

Im ersten Stadium – die Initiation – attackiert ein reaktives Sauerstoff-Metabolit die Methylengruppe des Lipids und spaltet ein Hydrogen – Atom ab. Die Fettsäure behält ein Elektron und wandelt sich zum konjugiertem Dien. Das Fettsäureradikal reagiert mit vorhandenem Sauerstoff ROO^\cdot . Dieses Radikal kann von der benachbarten Fettsäure ein H-Atom abspalten und diese kann sich wiederum mit einem Sauerstoff verbinden. Eine Kettenreaktion mit Sauerstoff entsteht. ROO^\cdot wird zum Lipid-Hydroperoxid, das zerfällt in ein Aldehyd oder in Form eines cyclischen Endoperoxid, Isoprostan und Hydrocarbon. Diesen Vorgang kann nur ein kettenbrechendes Antioxidans stoppen (Kohen und Nyska 2002).

1.4 Vitamin E

Vitamin E ist seit 1922 bekannt als ein essentieller Nahrungsbestandteil zum Beispiel in pflanzlichen Ölen, Nüssen und Samen. Zahlreiche Gruppen haben seitdem Vitamin E untersucht und seine Bedeutung als Antioxidans erkannt. Vitamin E ist beteiligt an der Verhinderung der Lipidoxidation und anderen durch Radikale verursachte Oxidationen (Brigelius-Flohe und Traber 1999). Die antioxidative Wirkung von Vitamin E wurde in Zusammenhang gebracht mit der Verminderung des Risikos an KHK zu erkranken (Rimm et al. 1993).

Vitamin E besteht aus einer Gruppe von acht pflanzlichen, fettlöslichen Tocopherol- und Tocotrienol Derivaten. Das chemisch und biologisch aktivste Derivat ist das α -Tocopherol mit der höchsten antioxidativen Wirkung. Die antioxidative Wirkung beruht auf der Hydroxy-Gruppe am C6 des Chromanol-Ring. Durch Abgabe eines H-Atoms stoppt sie die Kettenreaktion einer Autooxidation (Schneider 2005). Das Peroxyl-Radikal nimmt sehr schnell ein H-Atom des Vitamin E auf, bevor das Radikal mit einem anderen Stoff reagieren kann. Die oxidierte Fettsäure verliert dadurch ihren Radikal-Charakter und die Kettenreaktion wird unterbrochen. α -Tocopherol wandelt sich in ein stabiles Radikal. Das unpaare Elektron des Sauerstoffatoms liegt jetzt außerhalb des Chromanol Rings und ist damit reaktionsträge. Es kann nicht mehr ein H-Atom aus einer ungesättigten Fettsäure abspalten (Bramley et al. 2000). Zwei Tocopheroyl -Radikale können zu einem stabilen Dimer reagieren. Das Wachstum von Radikalketten und die Lipidperoxidation werden somit unterbunden (Schneider 2005). Die anderen Formen des Vitamin E (β -, γ -, δ - Tocopherol und Tocotrienol) können im menschlichen Organismus nicht in α -Tocopherol umgewandelt werden (Schneider 2005).

1.5 Selen

Selen ist ein essentielles Spurenelement (Rayman 2000) und wird über die Nahrung vom Körper aufgenommen. Pflanzen entziehen dem Boden Selen und führen dieses Spurenelement in die Nahrungskette ein. Die Konzentration in den Nahrungsmitteln – wie tierischen Produkten, Pilzen, Getreide, Nüssen, Gemüse und anderen pflanzlichen Lebensmitteln - hängt weitgehend vom Standort ab, da die Selen-Konzentration im Boden regional sehr stark schwankt (Levander 1987) (Fisinin et al. 2009). Allerdings hängt die Aufnahmefähigkeit der Pflanzen auch von der Bodenbeschaffenheit ab. Bei sauren Böden entsteht eine Komplexbindung von Selen an Eisenhydroxide und Tonminerale; dieses Selenit können Pflanzen nicht resorbieren (Gissel-Nielsen 1971; Johnsson 1991). In alkalischen Böden bilden sich keine Komplexe, die selenige Säure bleibt frei. Die Pflanze nimmt lösliches Selenat über ihre Wurzeln auf (Barceloux 1999). Der Mensch kann im Dünndarm, sowohl das organisch an Aminosäuren gebundene Selen (Selenit), als auch das ungebundene, anorganische Selenat absorbieren (van Dael et al. 2002). Die Selenaufnahme beträgt in Deutschland zwischen 38-48µg/Tag. Bei nur 10µg/Tag tritt eine Mangelerscheinung auf (Barceloux 1999).

Vor allem Lipidhydroperoxide sind verantwortlich für den Zelltod, den Selenmangel verursacht (Saito et al. 2003). Ein Mangel an Selen kann zu folgenden Erkrankungen führen: Krebs, KHK und Lebernekrosen. Auch wurden Funktionsstörungen im Immunsystem beschrieben (Rayman 2000).

Proteine, die ein oder mehrere Selen Atome pro Protein Molekül enthalten, werden als Selenoproteine bezeichnet. Das aktive Zentrum dieser Enzyme enthält Selenocystein. An der Aminosäure Cystein wird anstelle des Schwefels Selen kovalent gebunden. In dieser Struktur steigert sich die Enzymaktivität um den Faktor 100-1000. Mehr als 25 Selenoproteine sind bekannt. In der Literatur werden unter anderem beschrieben: Glutathion-Peroxidase, Thioredoxin-Reduktase, Iodothyronin-Deiodinase, Selenoprotein P, Selenoprotein W (Burk 2002).

1.6 Glutathionperoxidase (GPx)

Selenoenzyme vermitteln die anti-oxidative Wirkung von Selen. Die Glutathionperoxidase zählt zu den wichtigsten. Acht Isoformen der GPx wurden

isoliert: die GPx1 im Cytosol, die GPx2 im intestinalem Epithel, GPx3 im Plasma. Die GPx4 hat 3 verschiedene Isoformen; die cytosolische, die mitochondriale und in Spermien vorkommende GPx. Die GPx5 wird von der Epididymis sezerniert, die GPx 6 kommt nur beim Menschen vor, die GPx7 in den Epithelzellen des Ösophagus (Peng et al. 2014) und die GPx 8 im endoplasmatischen Retikulum (Ramming et al. 2014).

Die GPx 4 schützt Membranen vor oxidativem Stress. Diese wird als Lipid-Peroxidation-Inhibitions Protein (PIP) bezeichnet, das neben H_2O_2 auch Hydroperoxide und komplexe Hydroperoxide, wie Phospholipide, Cholesterol und Cholesterolester Hydroperoxide reduziert. Die GPx5 enthält im aktiven Zentrum ein Cystein anstelle eines Selenocysteins. GPx7 und GPx8 sind CysGPx (Cystein) mit einer niedrigen GPx Aktivität (Brigelius-Flohé und Maiorino 2013).

Bei der essentiellen Energiegewinnung in den Mitochondrien entstehen permanent radikale Sauerstoffspezies, die eine Bedrohung für die Zelle darstellen (Sies 1997). Die zink- und kupferabhängige Superoxid-Dismutase baut die O-Radikale zu H_2O_2 und O_2 ab. Die GPx reduziert H_2O_2 zu Wasser und Lipid und Cholesterol-Hydroperoxide zu den entsprechenden Alkoholen (Michiels et al. 1994; Brigelius-Flohé und Maiorino 2013). Die GPx erhält das Gleichgewicht aufrecht zwischen Bildung und Neutralisierung der Sauerstoffradikale. Verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung einer Radikalbildung, entsteht der sogenannte oxidative Stress (Sies 1997).

Das Aktivitätsmaximum erreicht die GPx bei einer täglichen Selenaufnahme von 60-80 μg (Thomson et al. 1993). Selenmangel vermindert die Aktivität der Glutathionperoxidase. Die Konzentration an Hydroperoxiden aus Phospholipiden und Lipoproteinen steigt (Arthur 2001).

1.7 Die Selenverteilung im Körper

Über die Injektion von radioaktivem ^{75}Se wurde im Körper von Ratten die Selenverteilung bestimmt. Selen reichert sich zunächst an in den Hoden und im Gehirn, anschließend in der Milz und den Nieren (Davies 1995).

Bei adäquater Se-Verteilung weisen Niere, Leber und Hoden die höchsten Konzentrationen auf, Muskeln und Gehirn die niedrigsten. Bezogen auf die gesamte Körpermasse ist 70% des Selens in Muskulatur und Leber konzentriert. Blut, Niere und Skelett enthalten 24%, beim Menschen 50% in Muskulatur vom Gesamtkörperselen.

Bei adäquater Selenversorgung bindet den Hauptteil des Selens die Leber im Enzym Glutathionperoxidase (cGPx) (Rhee 1999).

1.8 Hitzeschockproteine (HSP)

1962 entdeckte Ritossa, dass sich bei Temperaturerhöhung sogenannte „Puffs“ an den Riesenchromosomen in den Speicheldrüsen der *Drosophila busckii* bilden (Ritossa 1962). Diese Puffs - induziert durch Temperaturerhöhung - stehen im Zusammenhang mit einer steigenden mRNA - und Protein - Synthese. Da man zunächst davon ausging, dass nur Hitze die Bildung dieser Proteine auslöst, werden sie als Hitzeschockproteine bezeichnet (Tissières et al. 1974).

Entsprechend ihrem Molekulargewicht in - kDa - werden Hitzeschockproteine in unterschiedliche Klassen eingeteilt (z.B. HSP 70) (Georgopoulos und Welch 1993).

Inzwischen ist neben Hitze eine größere Anzahl weiterer Stressoren bekannt. Die Synthese von Hitzeschockproteinen steigern unter anderem: umweltbedingte (UV-Licht, Schwermetalle, Alkohole, Aminosäuren), pathologische (virale-, bakterielle oder parasitäre Infektionen, Fieber) oder physiologische (Wachstumsfaktoren, Zelldifferenzierung, hormonelle Stimulation oder Gewebeentwicklung) Faktoren (Hightower 1991; Lindquist und Craig 1988; Asea et al. 2000).

1.8.1 Hitzeschockprotein HSP 70

HSP 70 bewirkt als Chaperon die korrekte Faltung der Tertiärstruktur und stabilisiert partiell denaturierte Proteine und naszierende Polypeptidketten, die bei der Translation in den Ribosomen gebildet werden. HSP70 transportiert Proteine durch die Membran und baut Proteinstrukturen zusammen. Molekulare Chaperone interagieren zwischen partiell denaturierten Proteinen, wirken exponierten hydrophoben Bereichen entgegen, verhindern die Aggregatbildung von Proteinen und damit deren Inaktivierung (Craig und Gross 1991). Daher erfolgt die Synthese der HSP 70 nicht nur unter oxidativem Stress, sondern auch unter physiologischen Bedingungen sind geringe Konzentrationen an HSP 70 vorhanden. Bei Selenmangel in der Nahrung steigt in den Hoden von Mäusen die Synthese von HSP70 an (Kaushal und Bansal 2009).

1.8.2 Hämoxxygenase (HO)

Hämoxxygenase wird als Schlüsselenzym – bei oxidativem Stress – in Zellen hochreguliert und katalysiert den Abbau von hoch reaktionsfreudigen, freien Blutbestandteilen (Jais et al. 2014). Drei verschiedene Isoformen der Hämoxxygenase (HO) beschreibt die Literatur: die induzierbare HO-1, die konstitutive HO-2 und die wenig erforschte HO-3 (Maines 1997; Trakshel et al. 1986).

Die vorliegende Arbeit untersucht die selenmangel-abhängige Induktion der Expression von HO-1. Die Konzentration von HO-1 zeigt sich besonders empfindlich bei Alterungsprozessen und physiologischem Stress. Zum anderen wirkt HO-1 protektiv im zellulären Gleichgewicht (Gong et al. 2004). HO-1 reguliert die Konzentration von intrazellulärem freiem Häm und schützt damit die Zelle vor freiem Häm (Prooxidant) über den Abbau zu Eisen, Biliverdin und Kohlenstoffmonoxid. Bilirubin – Abbauprodukt von Biliverdin – und Kohlenstoffmonoxid wirken in geringen Konzentrationen anti-oxidativ und anti-inflammatorisch. Die CO Freisetzung fördert die Durchblutung und die Synthese des Eisenbindungs-Protein Ferritin (Bauer und Bauer 2002).

Eine Reihe von oxidativen Stressoren (UVA Strahlung, Schwermetalle, Wasserstoffperoxid, Natriumarsenit oder Endotoxine) induzieren die erhöhte Expression der Hämoxxygenase. HO-1 wird als Stressprotein eingestuft und als Hitzeschockprotein 32 kDa bezeichnet, das bei oxidativem Stress vermehrt produziert wird (Keyse und Tyrrell 1989). HO-1 ist ubiquitär in Geweben. Es wirkt unter anderem bei Niereninsuffizienz als zytoprotektives Enzym und wird auch in dieser Situation vermehrt gebildet (Sikorski et al. 2004). Im Alter arbeiten Reparaturmechanismen weniger zuverlässig und haben eine reduzierte Reparaturkapazität zur Folge. Die Fähigkeit, auf oxidativen Stress zu reagieren oder sich von einer Verletzung zu erholen, vermindert sich (Schmitt und Cantley 2008). Der Alterungsprozess verändert die Expression von Genen – zuständig für den Stoffwechsel, zelluläre Signaltransduktion und die Stressabwehr in verschiedenen Organen (Lee 1999). Mit höherem Alter verschiebt sich das zelluläre Redoxgleichgewicht zu einem mehr pro-oxidativen Zustand und damit höherer HO-1 Konzentration (Vile et al. 1994; Shibahara et al. 1987; Lavrovsky et al. 2000). In der Leber von jungen Ratten (6 Monate alt) war eine HO-1 Expression kaum zu beobachten. Bei älteren Tieren (24 Monate alt) war die

Konzentration an HO-1 doppelt so hoch. Unter Stressbedingungen erhöhte sich bei diesen Tieren die HO-1 Konzentration in der Leber aber nicht weiter (Bloomer et al. 2009).

1.9 Zielsetzung der Doktorarbeit

1.9.1 Auswirkungen von Selenmangel auf oxidativen Stress in Niere und Leber eines Rattenmodells

- Wie wirkt sich der durch Selen- und Vitamin E Mangel in der Nahrung verursachte oxidative Stress auf Körpergewebe wie Leber und Niere aus? HSP 70 und dessen Expression in Abhängigkeit von der Selen und Vitamin E Aufnahme soll als Marker für oxidativen Stress untersucht werden. Der Nachweis von HO-1 dient auch als Anzeichen für vermehrten oxidativen Stress. Bei diesem Marker muss das Alter der Tiere berücksichtigt werden.
- Verstärkt sich der oxidative Stress bei Ratten, die über 6 bzw. 12 Monate eine Ernährung mit Mangel an Selen und Vitamin E erhielten gegenüber der Kontrollgruppe, der während ihrer Lebensdauer die übliche Selen und Vitamin E haltige Nahrung angeboten wurde? Bei vermehrtem oxidativen Stress erhöht sich die Konzentration von ROS. Zu diesen zählt das Superoxidanionen-Radikal, das durch die DHE-Färbung in den Geweben nachgewiesen und gemessen wird. Die Erhöhung der Fluoreszenzintensität gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe soll als Nachweis von erhöhtem oxidativen Stress dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Western Blot

Chemikalien:

Produkt	Hersteller	Ort
Tris	Roth	Karlsruhe
HCl	Merck	Darmstadt
SDS Pallets	Roth	Karlsruhe
NaCl	Roth	Karlsruhe
Tween 20	Roth	Karlsruhe
Glycin	Sigma-Aldrich	Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich	Steinheim
Methanol	Roth	Karlsruhe
Mannitol	Sigma-Aldrich	Steinheim
Saccharose	Roth	Karlsruhe
Essigsäure	Roth	Karlsruhe
Milchpulver	Roth	Karlsruhe
SDS	Roth	Karlsruhe
NF Acrylamid/Bis-Lösung 40%	Roth	Karlsruhe
2-Propanol	Roth	Karlsruhe
TEMED	Roth	Karlsruhe
Ammonium persulfat (APS)	Sigma	Steinheim
Ponceau S	Roth	Karlsruhe
Methanol	Roth	Karlsruhe
Essigsäure	Roth	Karlsruhe
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Nonidet® P-40 Substitute	Fulka	Buchs, Switzerland
Natriumorthovanadat	Sigma	Taufkirchen

Natriumfluorid	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O	Merck	Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat KH ₂ PO ₄	Merck	Darmstadt
Protein Assay	Bio-Rad	München
Enzym Protease Phosphatase Inhibitor	Thermo-Scientific	
Mannitol	Sigma-Aldrich	Steinheim
Saccharose	Roth	Karlsruhe
Hepes	Sigma-Aldrich	Steinheim
Entwickler GBX	Kodak	Belgien
Fixierer	Kodak	Belgien

Verbrauchsmaterialien:

Produkt	Hersteller	Ort
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific	
Hyperfilm TM ECL High performance chemiluminescence film	GE Healthcare	München, Germany
Polystyrene Küvetten (10x4x45mm)	Sarstedt	Nümbrecht, Germany
Verpackungsfolie Sargold®Pro	Hartenstein	Würzburg, Germany
Immun-Blot PVDF Membrane for Protein Blotting 0,2µm	Bio-Rad	USA
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad	USA
Blottingpaper (550g/m ²)	Hartenstein	Würzburg, Germany

Pipettenspitzen	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Rührspatel	Hartenstein	Würzburg, Deutschland
Pipette	Eppendorf	
Dispenser Tips 5 ml	Hartenstein	Würzburg, Deutschland

Geräte:

Produkt	Hersteller	Ort
Mini Protean Tetra System	Bio-Rad	München
Hypercassette™	Amersham Biosciences	Buckinghamshire, England UK
Vortex VF2	Janke &Kunkel	
Zentrifugen		
Powersupply 200/2.0	Bio-Rad	München
Powersupply 1000/500	Bio-Rad	München
Kombischüttler	Edmund Bühler	Hechingen
Magnetrührer	Janke&Kunkel	
Gel Doc 2000 Documetation System	Bio-Rad Laboratories	München
pH Meter	Schott	Mainz
Glass Plates Mini Protean 3 System	Bio-Rad	China
Glass Plates short Plates	Bio-Rad	USA
Dri-Block Heater DB2A	Techne	Burlington, USA
Mikrofuge DW 41	Roth	Korea
Photometer Evolution 160 UV-VIS	Thermo Scientific	

Lösungen:

Lösungen	Ansätze
10x TBS	12,1 gr Tris 87,7 gr NaCl

	1l VE-Wasser auffüllen und auf pH 7,5 mit HCl einstellen
TBS-Tween 20 (0,05%)	1l 1x TBS 0,5 ml Tween 20
Milchpulver	10 gr Milchpulver 200 ml TBS-T
Trenngel-Puffer	Tris 1 M (36,33g/300ml VE-Wasser) pH 8,8 mit HCl
Sammelgel-Puffer	Tris 1 M 12,11g/100 ml VE-Wasser) pH 6,8 mit HCl
SDS 10%	5g/50 ml in VE-Wasser
Trenngel 12,5%	MQ-Wasser 2,95 ml Trenngelpuffer 3,75 ml 40% Polyacrylamid 3,15 ml 10% SDS 100 µl 10% APS 50µl TEMED 5µl
Sammelgel 5%	MQ- Wasser 3,8 ml Sammelgel-Puffer 0,63 ml 40% Polyacrylamid 0,5 ml 10% SDS 50µl 10% APS 25µl TEMED 10µl
APS 10%	1gr/10 ml in VE-Wasser aliquotieren und bei -20°C einfrieren
10x Laufpuffer	SDS 10g/l TRIS 250 mM 30,3 g/l Glycin 144,2 g/l
10x Transfer-Puffer	Tris 30 g/l Glycin 144 g/l
Ponceau	5mg Ponceau 90 ml H ₂ O

	<p>80 ml Methanol 30 ml Essigsäure</p>
Ponceau S Entfärber	<p>380 ml H₂O 34,5 ml Methanol 46 ml Essigsäure</p>
RIPA (radio immune – precipitation assay) lysis buffer	<p>50 mM Tris-HCL 150 mM NaCl 1mM EDTA 0,25% sodium desoxycholate 1% Nonidet P-40 in VE-Wasser pH 7,4 mit HCl einstellen immer frisch herstellen: 5 µg/ml PIC 200mM NaF 200mM Na₃VO₄</p>
10x PBS	<p>80g NaCl 2g KCl 5,75g Na₂HPO₂*2H₂O (Dinatriumhydrogenphosphat) 2g KH₂PO₄ (Kaliumhydrogenphosphat) Auf pH 7,4 einstellen und mit auf 1 L VE-Wasser auffüllen und autoklavieren</p>
Homogenizationspuffer für Niere Se	<p>0,2 M Mannitol 50 mM Saccharose 10mM Hepes Auf pH 7,5 einstellen 100µl Enzym Protease Phosphatase Inhibitor</p>
Entwickler	1:5 mit VE-Wasser verdünnt
Fixierer	1:5 mit VE-Wasser verdünnt

Antikörper:

	Art	Hersteller	Ort
Erstantikörper	HSP70/HSC70 mouse monoclonal IgG2a	Santa Cruz Biotechnologie	Heidelberg, Deutschland
	Beta Actin Mouse mAb	Cell Signaling Technologie	
	Rb mAb Hemeoxygenase 1	abcam	
Zweitantikörper	goat Anti mouse IgG –HRP	Santa Cruz Biotechnologie	Heidelberg, Deutschland
	Antirabbit IgG; HRP linked Antibody	Cell Signaling Technologie	

Software

Multi Analyst Version 1.0	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Visionpro.Ink Thermo Electron UV-Visible Spectroscopy Version 4.10	Thermo Scientific	München

2.1.2 Dihydroethidium (DHE) – Färbung

Chemikalien:

Produkt	Hersteller	Ort
DHE	Merck	Darmstadt
DMSO	Roth	Karlsruhe
DABCO	Sigma-Aldrich	
Glycerol	Roth	Karlsruhe
Tissue-Tek	Sakura	Alphen aan den Rijn, Niederlande

Verbrauchsmaterialien:

Produkt	Hersteller	Ort
Deckgläser 24x50 mm	Hartenstein	Würzburg, Deutschland
Reaktionsgefäße, Lichtschutz aus PF 1,5 ml	Hartenstein	Würzburg, Deutschland
Menzel Gläser Superfrost Plus	Thermo Scientific	Braunschweig, Deutschland
Messer fürs Kryostat		
ImmEdge Pen	Vector Laboratories	Burlingame, USA
BD Falcon™ Cell Strainer 100µm Nylon	BD Falcon	

Geräte:

Produkt	Hersteller	Ort
Kryostat CM 3050S	Leica	Wetzlar, Deutschland
Fluoro Pro MP5000	Intas Science Imaging Instruments GmbH	Göttingen, Deutschland
Mikroskop Nikon Eclipse 55i	Nikon GmbH	Düsseldorf, Deutschland

Lösungen:

Lösungen	Ansätze
DHE	Stock 50 mM, Endkonzentration 10µM 1. Verdünnung mit DMSO 2. Verdünnung mit VE-Wasser
DABCO (1,4 Diazabicyclo (2,2,2)octan)	10 ml PBS 250 mg DABCO 90 ml Glycerol pH auf 8,6 einstellen 500µl Aliquots bei - 20°C einfrieren

Software

Image J		
Q Capture Pro, Version 5.01.26	Q Imaging	

2.2 Methoden

2.2.1 Herkunft der untersuchten Organe

Als Versuchstiere wurden weibliche Ratten des Stamms Fischer 344 eingesetzt. Dieser Stamm zeichnet sich dadurch aus, dass die Tiere im Alter nicht so anfällig für pathologische Erkrankungen (wie z.B. Arteriosklerose und Bluthochdruck) sind (Kregel et al. 1995). Dadurch wird die Annahme unterstützt, dass die gefundenen Ergebnisse hinsichtlich einer Erhöhung des oxidativen Stresses durch einen Mangel an Selen und Vitamin E hervorgerufen werden. Die untersuchten Organe wurden in den Jahren 2006 und 2007 den Tieren entnommen und bis zur Durchführung der vorliegenden Arbeit bei -80°C gelagert. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eder (Lehrstuhl für Toxikologie) hatte die Tiere für ein Projekt um die Erforschung von Colitis genutzt; in der vorliegenden Untersuchung werden jedoch nur Organe von Tieren der Kontrollgruppen (normale Ernährung und Selen und Vitamin E defiziente Ernährung) ohne Induktion der Colitis herangezogen. Die Tiere der Kontrollgruppe mit normaler Ernährung (6 und 12 Monate alt) stammten aus dem Jahr 2006; die Tiere mit Selen- und Vitamin E defizienter Nahrung (6 und 12 Monate alt) aus dem Jahr 2007.

Zu Versuchsbeginn waren die Ratten 8 Wochen alt. In Gruppen von 5 Tieren erfolgte eine Ernährung mit ssniff EF R/M für die Kontrollgruppe. Die Gruppe mit Selen und Vitamin E defizienter Nahrung erhielt ssniff S7577-E012 über die Dauer von 6 bzw. 12 Monaten.

Die Experimente von Prof. Eder wurden am 06.09.2005 unter Aktenzeichen 54-2531.01-42/05 von der Regierung von Unterfranken genehmigt.

2.2.2 Western Blot

2.2.2.1 Protein-Isolierung aus Gewebe

2.2.2.2 Niere

Zur Proteingewinnung wurde mit dem Skalpell ein Stück Nierengewebe (ca.50µg) entnommen. Mit einem Mörser wurde es in einem Glaskolben zerkleinert unter Zugabe von 200µl Homogenisationspuffer mit Protease und Phosphatase –

Inhibitor (9,9 ml Homogenisationspuffer; 100µl Protease und Phosphatase Inhibitor). Der Glaskolben war auf Eis gelagert und dadurch temperiert.

Anschließend wurde das zerkleinerte Gewebe in ein Reaktionsgefäß gefüllt und in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge 30 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und bei – 20°C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde fotometrisch nach der Bradford-Methode bestimmt.

2.2.2.3 Leber

Etwa 50µg Lebergewebe wurde mit dem Skalpell entnommen. Jede Probe wurde mit 500µl Ripapuffer in ein Reaktionsgefäß abgefüllt und auf Eis mit einem Dispergierer (Ultra Turrax T8) homogenisiert.

Die Leberproben wurden ebenfalls in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge für 30 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen, in ein neues Reaktionsgefäß abgefüllt und bei -20°C gelagert.

Die Proteinkonzentration wurde fotometrisch nach der Bradford-Methode bestimmt.

2.2.2.4 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford bindet sich Coomassie Brilliant Blue - ein saurer Farbstoff im Bradford Reagenz - an die basischen Aminosäuren-Seitenketten der Proteine (Kruger 1994).

Die Proteinkonzentration der Proben wurde an einer Eichgeraden abgelesen, die im Bereich 0 -20 µg/ml über BSA-Standardproteine kalibriert wurde. Die Proben wurden zuvor mit Roth-Wasser verdünnt, so dass die Konzentrationen in dem Bereich der Eichgeraden fielen. Hierzu wurden 800µl der Probe zu 200 µl BioRad Reagenz in Küvetten zugemischt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595nm gemessen.

2.2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli trennt in einem elektrischen Feld die denaturierten Proteingemische nach ihrer Molekülmasse auf (Laemmli 1970).

Im ersten Schritt wurde das Trenngel hergestellt (12,5% Polyacrylamidkonzentration). Für eine glatte Oberfläche wurde es sofort mit 50% Isopropanol übergossen. Nach 30 Minuten wurde das Isopropanol vollständig entfernt und das Trenngel mit 5% Sammelgel aufgefüllt. Noch im flüssigen Zustand wurde ein Kamm eingebracht und dadurch Probenaschen generiert. Darauf härtete die Anordnung 30 Minuten aus. Die fertiggestellten Gele wurden in feuchten Papiertüchern und dann in Frischhaltefolien gewickelt und bis zum nächsten Tag bei 4°C gelagert. Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingebracht, die mit Laufpuffer (10xLaufpuffer 200ml; 1800ml VE-Wasser) befüllt war. Die Proteinprobe wurde mit Ripa-Puffer und mit 50µl Laemmli-Puffer verdünnt und 5 Minuten bei 93°C gekocht. Danach wurden die Proben in 25µl Portionen aliquotiert und bis zum Versuchsbeginn bei – 20°C aufbewahrt.

Das Gel besteht aus 10 Taschen und wurde bei 4°C beladen. Die erste Tasche enthielt den Molekulargewichts-Standard. Die letzte Tasche wurde mit dem Proteingemisch befüllt, das sich aus allen verwendeten Proben zusammensetzt. In die inneren 8 Taschen wurde je 50µg Protein eingebracht, das aus den unterschiedlichen Tieren gewonnen wurde. Mit einer Spannung von 100 Volt wurden für 30 Minuten die Proteine unterschiedlicher Größe in der Grenzschicht zwischen Sammelgel und Trenngel möglichst homogen konzentriert. Bei einer Spannung von 180 Volt über 60 Minuten wurden im nächsten Schritt die Proteine nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Die gesamte Gelelektrophorese fand bei 4°C statt.

2.2.2.6 Western Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran transferiert und wurden im nachfolgenden Verfahren mit spezifischen Antikörpern detektiert.

Für den Transfer wurde ein Transferpuffer angesetzt, die PVDF-Membran auf die Größe 6 x 8,5 cm² und das Blotting-Papier auf 8 x 10 cm² zurechtgeschnitten. Die PVDF-Membran wurde 5 Minuten in Methanol eingebracht. Blotting-Matte und Blotting-Papier, PVDF Membran und Gel wurden 15 Minuten in dem Transferpuffer

gerüttelt. Der Blot wurde in die Kassette in der Reihenfolge Kathode/Blotting-Matte/Blotting-Papier/Gel/PVDF-Membran/Blotting-Papier/Blotting-Matte/Anode angeordnet. Die aufgebaute Kassette, ein Rührfisch und ein Kühlaggregat wurden in die vertikale Elektrophoresekammer eingebracht und bis zur vorgegebenen Markierung mit Transferpuffer befüllt. Der Protein-Transfer von dem Gel auf die PVDF-Membran erfolgte unter ständigem Rühren bei 4°C für 60 Minuten bei 100V.

Um den erfolgreichen Transfer zu kontrollieren, wurde die PVDF-Membran unter Rütteln 10 Minuten mit Ponceau S- Färbelösung angefärbt. Nach kurzem Spülen der Membran mit TBS-T wurden die Banden sichtbar und dokumentiert. Danach wurde die PVDF-Membran 5 Minuten mit der Entfärbelösung behandelt. Das Blocken erfolgte 2 Stunden auf einem Rüttler bei Raumtemperatur mit 5% Milchpulver gelöst in TBS-T. Es folgte die erste Antikörperbehandlung. Unter rüttelnden Bewegungen inkubierte die Membran über Nacht in entsprechender Verdünnung (HSP 70 1:1000; β -Actin 1:5000; Hämoxygenase 1:5000) der 1. Antikörper mit 5% Milchpulver gelöst in TBS-T. Nach Bindung des Erstantikörpers wurde die Membran 3 mal 10 Minuten mit 10 ml 5% Milchpulver in TBS-T gewaschen. Die Zweitantikörperbehandlung erfolgte als nächstes. Für HSP 70 und β -Actin wurde der Zweitantikörper (Anti-Maus aus Ziege) in der Verdünnung 1:5000 und für Hämoxygenase der Zweitantikörper (Anti-Kaninchen aus Esel) ebenfalls 1:5000 in 5% Milchpulver TBS-T verdünnt und bei Raumtemperatur für 60 Minuten unter schüttelnden Bewegungen bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreimal für 10 Minuten mit 5% Milchpulver in TBS-T gewaschen. Für die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe wurde die Membran mit 5 ml Luminol für 5 Minuten inkubiert. Die Membran wurde in eine Folie eingepackt und in einer Autoradiographiekassette ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Expositionszeit variierte zwischen 5 Sekunden und 2 Stunden. Der Röntgenfilm wurde manuell entwickelt. Die Ergebnisse der Proteinproben des Western Blots wurden zuerst mit Hilfe der Vermessung der β -Actin Banden normiert. β -Actin ist ein Haushaltsgen und wird daher in jeder Zelle gleich stark exprimiert. Daher können die Proben auf das β -Actin normiert und so kleine Fehler bzw. Ungenauigkeiten bei dem Probenauftrag ausgeglichen werden. Beispiele für Western-Blots sind in Abbildungen 2a und 2b zu

sehen.

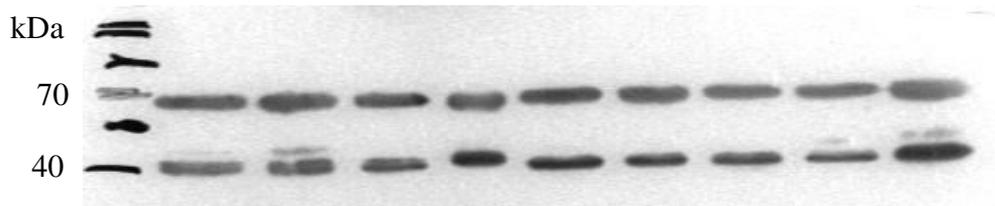


Abbildung 2: Beispiel eines Western Blots mit Detektion von HSP 70 (Bande bei 70 kDa) und β -Actin (Bande bei 40 kDa)

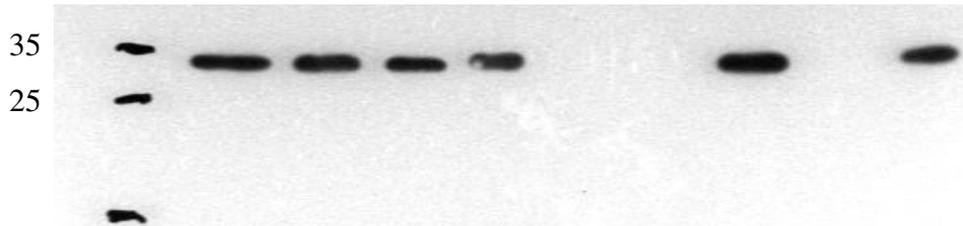


Abbildung 2b Beispiel eines Western Blots mit Detektion von HO-1 (Bande bei 30 kDa)

2.2.3 Dihydroethidium (DHE) – Färbung

Über das Anfärben von Geweben mit Dihydroethidium lässt sich die Superoxidanionradikal-Anreicherung in einem Gewebe untersuchen. DHE ist hydrophob und kann daher die Membran durchdringen. Superoxidanionenradikale oxidieren DHE zu Ethidium, das sich wegen seiner positiven Ladung an die DNA binden kann. Die angefärbten Nuklei fluoreszieren dann rot (Laurindo et al. 2008).

Das Leber - und Nierengewebe wurde mit TissueTek fixiert, in einem Kryostat wurden bei -28°C $5\mu\text{m}$ dicke Schnitte hergestellt und auf einem Superfrostobjektträger aufgezogen. DHE wurde in zwei Verdünnungsschritten hergestellt: $10\mu\text{l}$ der 50mM Stocklösung wurden mit $990\mu\text{l}$ DMSO verdünnt und als zweites Verdünnungsmedium wurde VE-Wasser verwendet ($20\mu\text{l}$ des DHE-DMSO Gemisches mit $980\mu\text{l}$ VE-Wasser). Diese DHE-Lösung wurde in lichtgeschützte Eppendorf Gefäße gefüllt und auf Eis gelagert.

Die Objektträger wurden mit einem Fettstift umrandet und $200\mu\text{l}$ DHE-Lösung auf die Proben appliziert. Nach Aufbringen eines Deckgläschens wurden die Objektträger 30 Minuten in einer lichtgeschützten, mit feuchten Tüchern ausgekleideten Box inkubiert. Danach wurden die Objektträger mit $1\times$ PBS dreimal gewaschen und mit drei Tropfen DABCO und einem Deckglas bedeckt. Die Zellkerne wurden in einem abgedunkelten

Raum mit einem Fluoreszenzmikroskop unter dem TRITC Filter bei 40-facher Vergrößerung über die Software Q Capture Pro dargestellt. Bei frischer DHE Lösung wurde die Belichtungszeit angepasst. Die Belichtungszeit für das Foto wurde so eingestellt, dass die Helligkeit des Bildes dem optischen Eindruck bei direkter Betrachtung durch das Mikroskop entspricht. Die Bilder der Kamera wurden im Computer digitalisiert und im .tiff Format abgespeichert. Die Messung der Fluoreszenzdichte der Kerne erfolgte mit Hilfe des Programms Image J. Es wurden von einer Probe von mehreren Fotos zusammen bis zu 200 Kerne ausgewertet. Die Fotos wurden innerhalb von 5 Minuten aufgenommen. Eine Aufnahme von Lebergewebe nach Färbung mit DHE ist beispielhaft in Abb. 3 gezeigt.

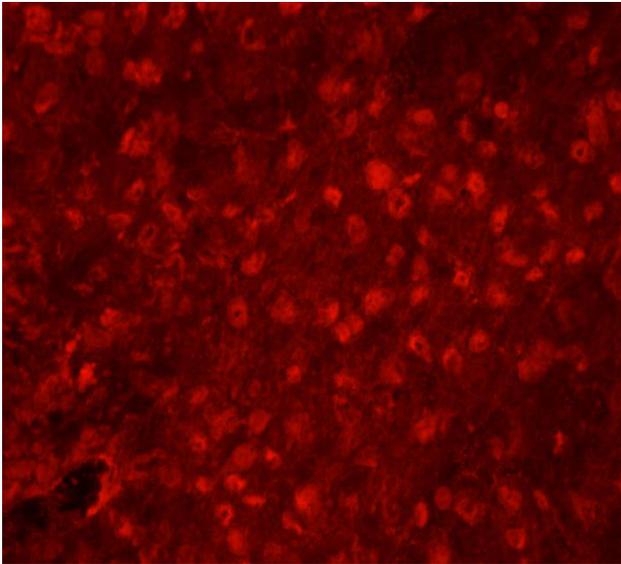


Abbildung 3 Darstellung der Färbung von Lebergewebe mit dem Farbstoff DHE

Während Messungen an der Leber fiel die Spektrallampe aus und musste erneuert werden. Mit der alten und mit der neuen Lampe wurden jeweils Fluoreszenzintensitäten gemessen an Tiergruppen, die sowohl normale Nahrung als auch Selenmangelnahrung erhielten. Um den Einfluss der unterschiedlichen Lampen zu berücksichtigen, wurden Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten gebildet. Aus den Messungen von der alten und neuen Lampe wurden jeweils zwei Mittelwerte gewonnen. In der einen Gruppe der Mittelwerte, die von der Messung einer Lampe herrührten, waren sowohl alte als auch junge Tiere. In dem zweiten Mittelwert waren Tieren, die Selenmangelnahrung erhielten. Auf diesen Mittelwert wurden die Ergebnisse der einzelnen Tierproben entsprechend normiert. Mit diesem Ansatz wurde versucht die unterschiedlichen

Eigenschaften der Lampen herauszurechnen. Dadurch sollte ermöglicht werden die 6 Monate alten Tiere mit den 12 Monate alten Tieren zu vergleichen.

2.3 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse und die Grafikerstellung wurde mit dem Programm SPSS Statistics für Windows Version 23 (IBM Corp) durchgeführt.

Der Test der Hypothesen erfolgte über den ein- und zweiseitigen Mann-Whitney Rangsummen Test und wurde graphisch über einen Boxplot dargestellt. Bei einer geringen Anzahl von Tieren ist eine statistische Aussage zur Signifikanz mathematisch nicht unproblematisch. Die Daten wurden über den Median-Wert ausgewertet, da die Ergebnisse unsymmetrisch verteilt sind.

3 Ergebnisse

3.1 Auswirkungen von Selenmangel auf oxidativen Stress in Niere und Leber eines Rattenmodells

3.1.1 Nachweis des oxidativen Stress in der Leber über DHE-Färbung

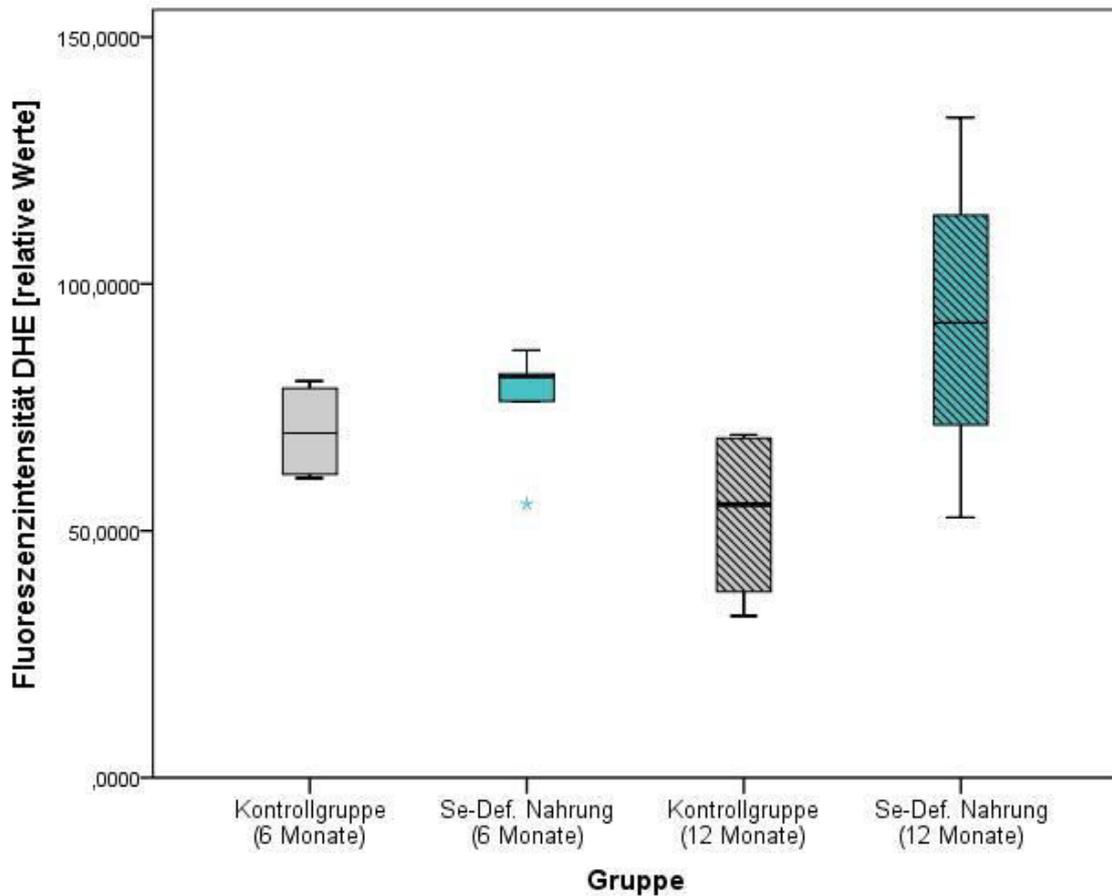


Abbildung 4 Analyse der DHE-Fluoreszenzintensität zur Bestimmung des oxidativen Stress in der Leber

Die Werte wurden gegenüber der Kontrollgruppe (6 Monate) auf den Mittelwert (nicht Median) normiert

Die Kontrollgruppe (6,12 Monate alt) erhielt normale Nahrung

Die Se-Def.-Gruppe (6,12 Monate alt) erhielt Selen- und Vitamin E - Mangelnahrung

Kontrollgruppe (6 Monate) n= 4 Se.-Def (6 Monate) n=5

Kontrollgruppe (12 Monate) n=4 Se-Def. (12 Monate) n=4

Mann-Whitney-Test

Kontrollgruppe (6 Monate) vgl. Kontrollgruppe (12 Monate) p = 1

Kontrollgruppe (6 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (6 Monate) p = 0,111

Kontrollgruppe (12 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (12 Monate) p = 0,114

Se-Def. Nahrung (6 Monate) vgl Se-Def. Nahrung (12 Monate) p = 0,286

Untersuchungen wurden an 6 Monate und 12 Monate alten Ratten durchgeführt. Beiden Rattenpopulationen wurden mit normalem Futter (Kontrollgruppe) und Selen und Vitamin E Mangelnahrung gefüttert. Bei den jungen Tieren fällt ins Auge, dass die intrazelluläre ROS-Konzentration bei Selenmangel leicht ansteigt. Bei den älteren Tieren fällt der Anstieg ausgeprägter aus. Die Ergebnisse bei den älteren Tieren weisen eine große Streuung auf. Der beobachtete Anstieg ist allerdings statistisch nicht signifikant.

3.1.2 Western Blot Analyse der Leber

Die Komplexität und Umfang der Versuchsabläufe machte es erforderlich, die Versuche an mehreren Tagen mit größerem zeitlichem Abstand durchzuführen. Bei der Auswertung zeigt sich, dass die Bandenintensität Tag-zu-Tag Schwankungen aufwies. Die gemischten-Protein-Proben (eine Proteinmischung aus allen Proben), welche in jedem Gel als Kontrolle vorhanden waren, führten zu unterschiedlichen Werten in der Bandenintensität. Daher werden Proteinproben hier zunächst nur innerhalb eines Gels verglichen oder von Gelen, bei denen das Gemisch aus allen Proben weniger als 20% in der Intensität differierte. Abschließend wird jeweils eine Darstellung aller Daten zu einem Protein und Organ gezeigt, für die die Einzelgel-Ergebnisse auf diese interne Gemisch-Protein-Probe, die auf jedes Gel in gleicher Menge aus tiefgefrorenem Vorrat aufgetragen war, normiert wurden. Die Versuche wurden mit allen Proben zweimal wiederholt. Die Bande mit der Gemisch Probe ließ sich jedoch nicht immer darstellen. Proben, die dieser Gemisch Probe zugeordnet sind, wurden daher nicht berücksichtigt. Das erklärt die unterschiedliche Anzahl n. Welche Probe wegen der fehlenden Gemisch Protein Probe in dieser Zusammenfassung nicht berücksichtigt wurde, ist undefiniert. In den Einzeldarstellungen wurden diese Proben jedoch ausgewertet.

3.1.2.1 Nachweis der Hämoxygenase – 1 Konzentration in der Leber

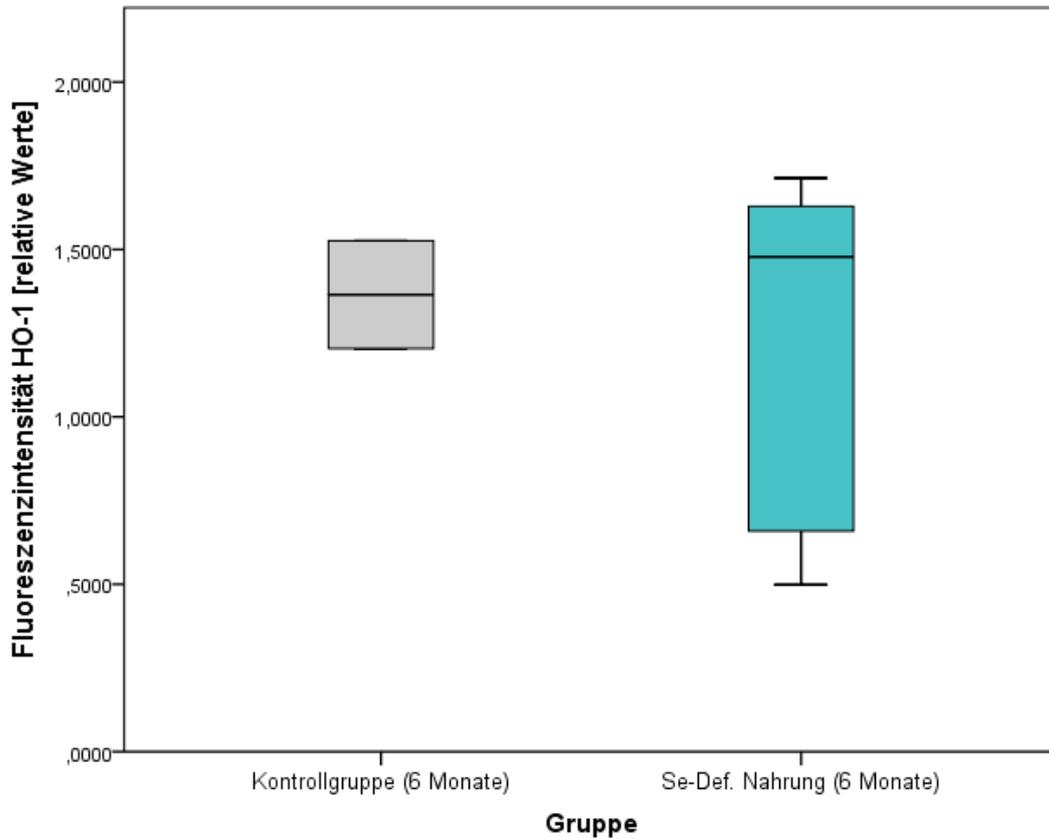


Abbildung 5 Nachweis der Hämoxygenase - 1 Konzentration am 07.01.15

Die Kontrollgruppe (6 Monate alt) erhielt normale Nahrung

Die Se-Def.-Gruppe (6 Monate alt) erhielt Selen- und Vitamin E - Mangelnahrung

Kontrollgruppe (6 Monate): n=2

Se-Def. Nahrung (6 Monate): n=5

Mann-Whitney-Test

Kontrollgruppe (6 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (6 Monate) p = 1,00

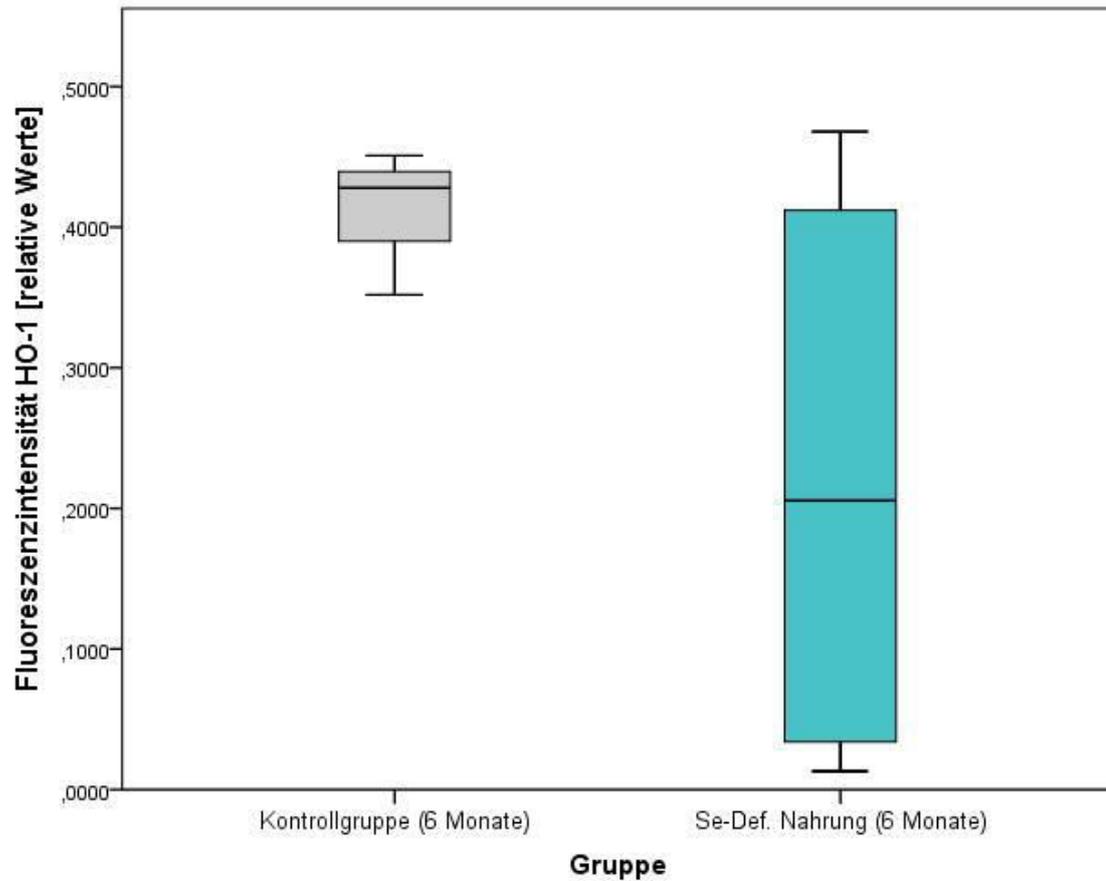


Abbildung 6 Nachweis der Hämoxygenase - 1 Konzentration am 14.01.15

Die Kontrollgruppe (6 Monate alt) erhielt normale Nahrung

Die Se-Def.-Gruppe (6 Monate alt) erhielt Selen- und Vitamin E – Mangelernährung

Kontrollgruppe (6Monate): n=3

Se-Def. Nahrung (6Monate): n=4

Mann-Whitney-Test

Kontrollgruppe (6 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (6 Monate) $p = 0,629$

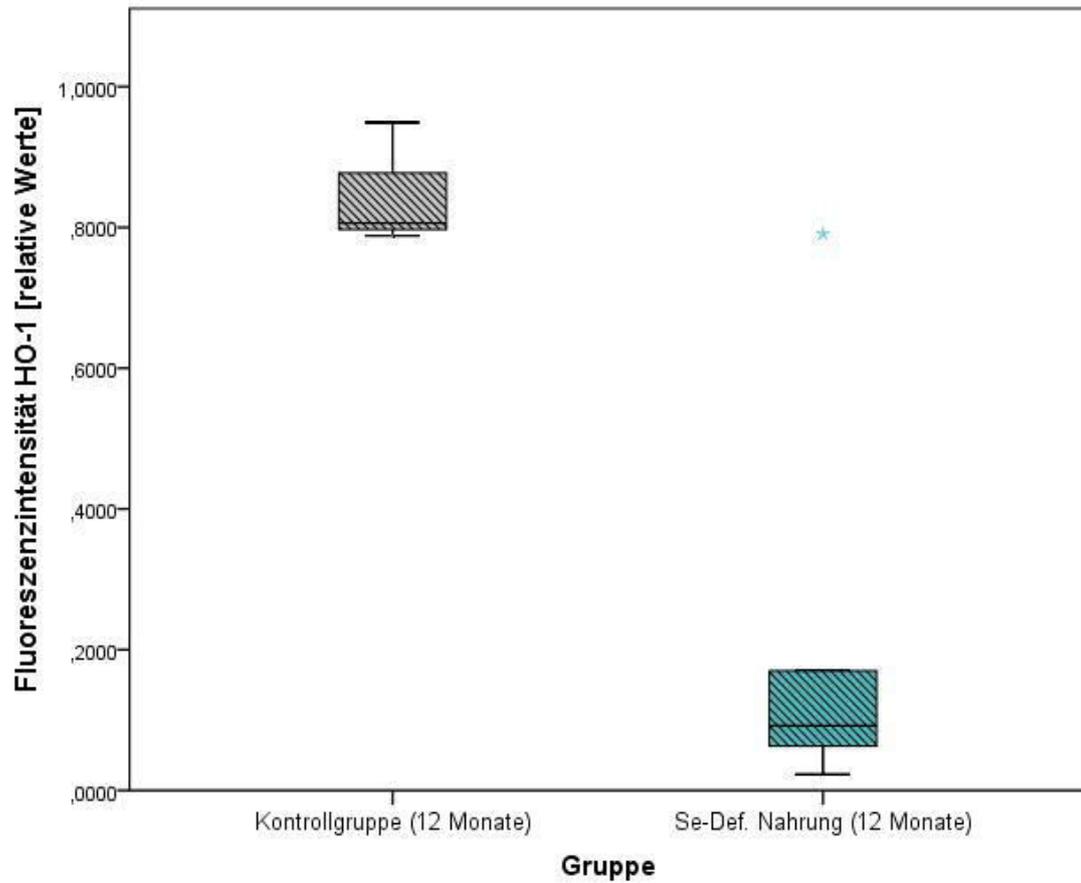


Abbildung 7 Nachweis der Hämoxygenase - 1 Konzentration am 19.01.15

Die Kontrollgruppe (12 Monate alt) erhielt normale Nahrung

Die Se-Def.-Gruppe (12 Monate alt) erhielt Selen- und Vitamin E - Mangelernährung

Kontrollgruppe (12 Monate): n=3

Se-Def. Nahrung (12 Monate): n=5

Mann-Whitney-Test

Kontrollgruppe (12 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (12 Monate) p = 0,071

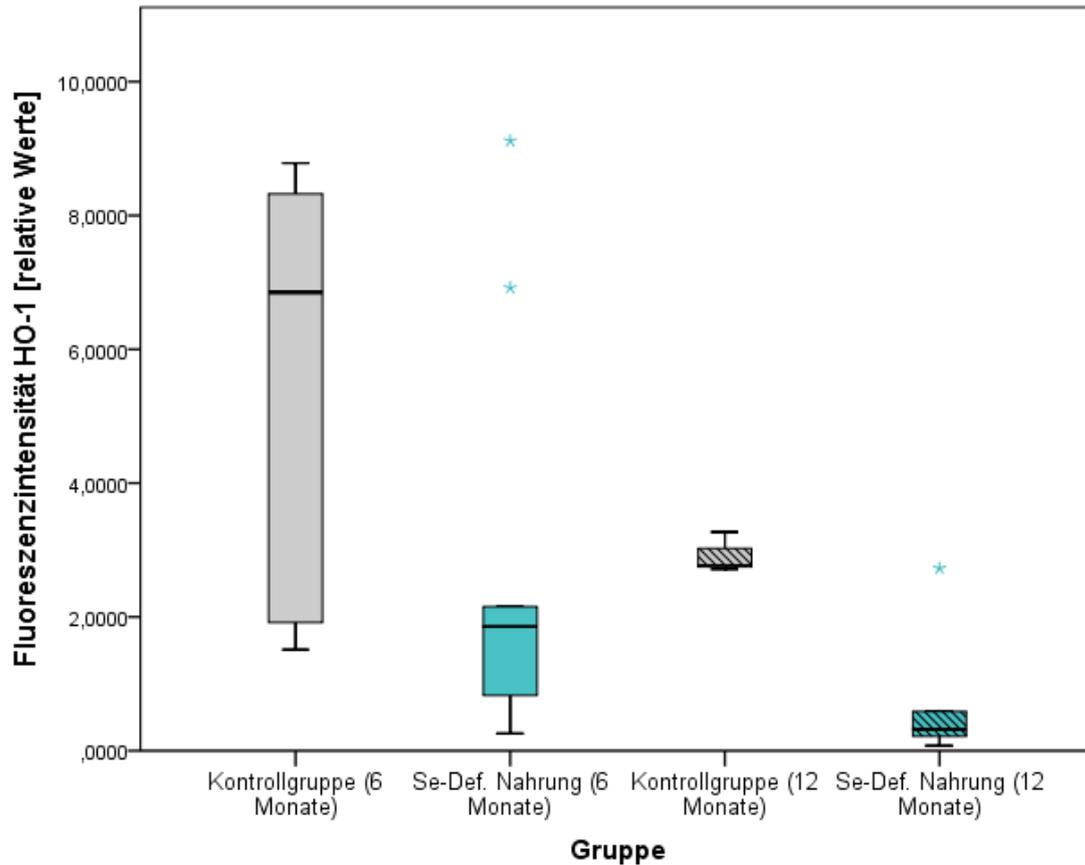


Abbildung 8 Analyse der HO-1 Konzentration in der Leber

Die Werte wurden gegenüber der Protein-Gemisch-Probe normiert

Die Kontrollgruppe (6,12 Monate alt) erhielt normale Nahrung

Die Se-Def.-Gruppe (6,12 Monate alt) erhielt Selen- und Vitamin E - Mangelernährung

Kontrollgruppe (6 Monate) n= 5

Se.-Def (6 Monate) n= 9

Kontrollgruppe (12 Monate) n=3

Se-Def. (12 Monate) n=6

Mann-Whitney-Test

Kontrollgruppe (6 Monate) vgl. Kontrollgruppe (12 Monate) p =0,786

Kontrollgruppe (6 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (6 Monate) p = 0,240

Kontrollgruppe (12 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (12 Monate) p = 0,071

Se-Def. Nahrung (6 Monate) vgl Se-Def. Nahrung (12 Monate) p=0,083

In der Kontrollgruppe – normale Nahrung mit ausreichendem Selen – wird die Bandenintensität als Maß für die HO-1 Konzentration bestimmt in Abhängigkeit vom Lebensalter der Ratten. Es zeigt sich, dass die Menge an HO-1 in etwa konstant bleibt bzw. abnehmende Tendenz aufweist. Die Ergebnisse charakterisiert eine sehr große Schwankungsbreite. Bei den Tieren, deren Nahrung einen Selen-Mangel aufwies, fällt ein deutlicher Trend auf. Mit höherem Lebensalter nimmt die Fluoreszenzintensität, d.h.

die HO-1 Konzentration ab. Besonders deutlich zeigt sich dies in der Versuchsreihe vom 19.1.2015. Abbildung 7 fasst alle Proben und Versuchsreihen zusammen. In dieser Darstellung sind alle Werte der Proben auf die der gemischten Probe normiert. Ein signifikanter Abfall der Fluoreszenzintensität der HO-1 der Tiere, der Kontrollgruppe (12 Monate alt) gegenüber den Tieren, die Selen und Vitamin E -Mangel Nahrung (12 Monate alt) erhielten wurde festgestellt.

3.1.2.2 Western Blot Analyse der HSP 70 Konzentration in der Leber

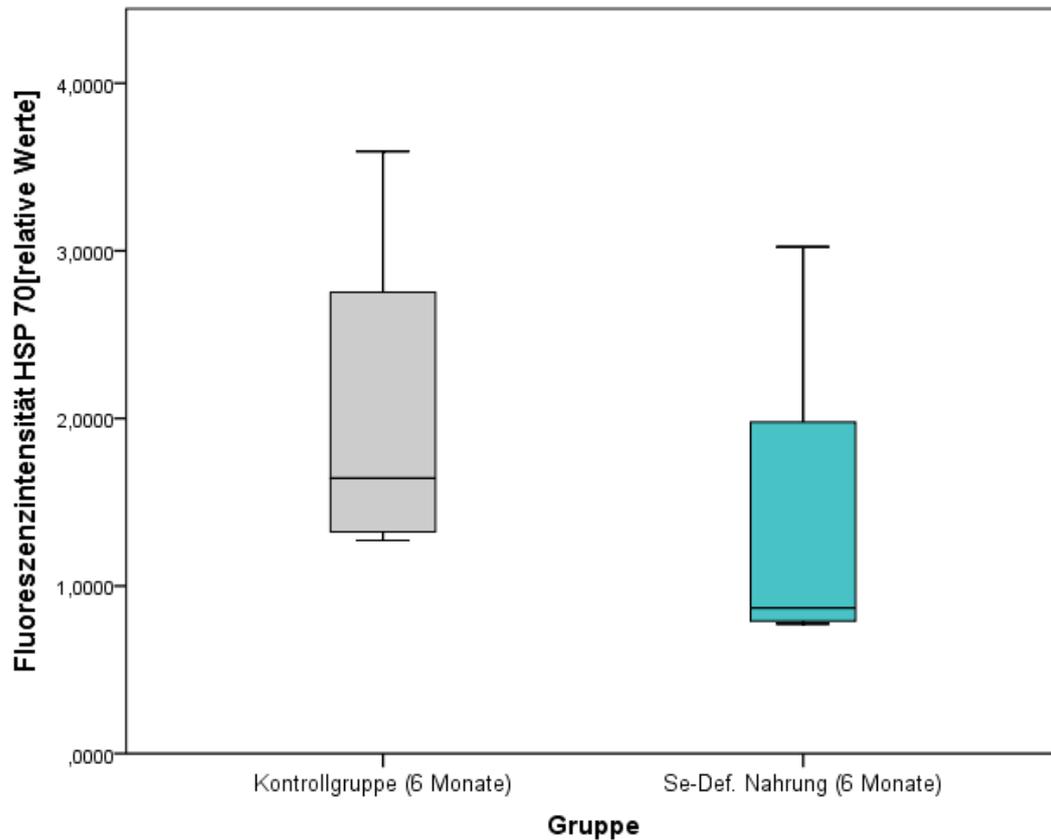


Abbildung 9 Analyse der HSP 70 Konzentration in der Leber am 11.12.14

Die Kontrollgruppe (6 Monate alt) erhielt normale Nahrung

Die Se-Def.-Gruppe (6 Monate alt) erhielt Selen- und Vitamin E – Mangelnahrung

Kontrollgruppe n=4

Se-Def. Nahrung n=4

Mann-Whitney-Test

Kontrollgruppe (6 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (6 Monate) p =0,200

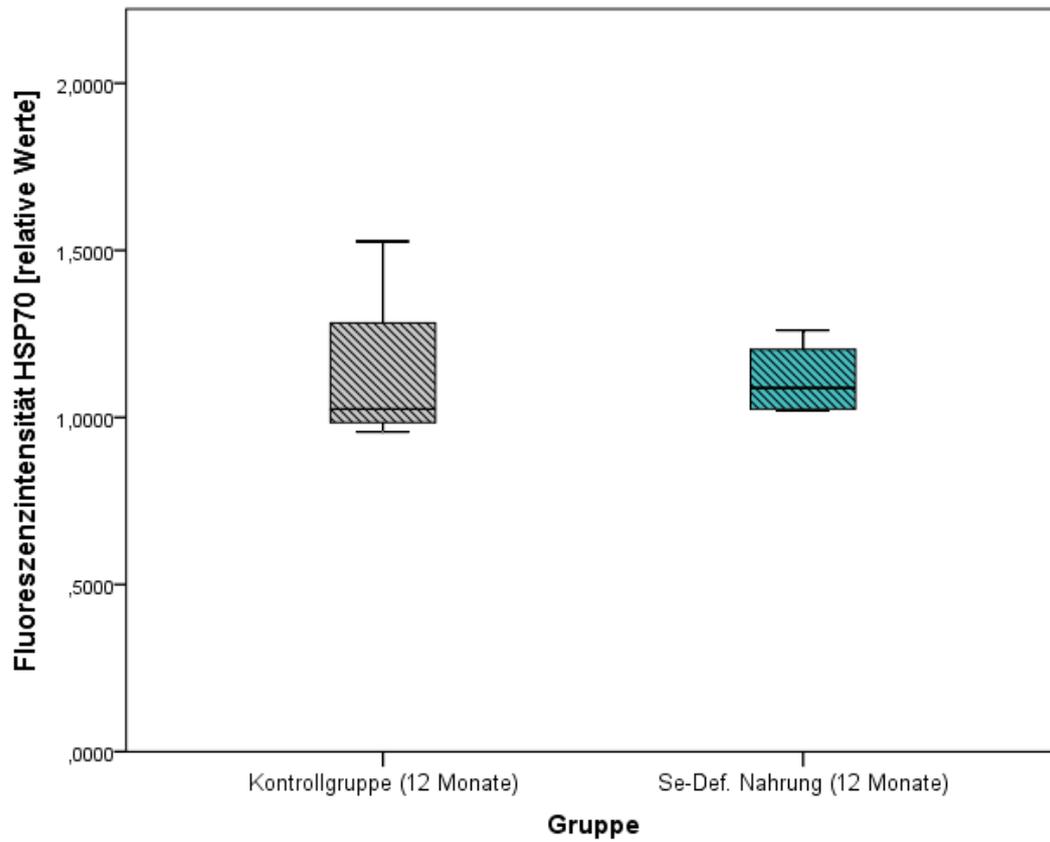


Abbildung 10 Analyse der HSP 70 Konzentration in der Leber am 11.12.14

Die Kontrollgruppe (12 Monate alt) erhielt normale Nahrung

Die Se-Def.-Gruppe (12 Monate alt) erhielt Selen- und Vitamin E - Mangelernährung

Kontrollgruppe n=4

Se-Def. Nahrung n=4

Mann-Whitney-Test

Kontrollgruppe (12 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (12 Monate) $p = 0,686$

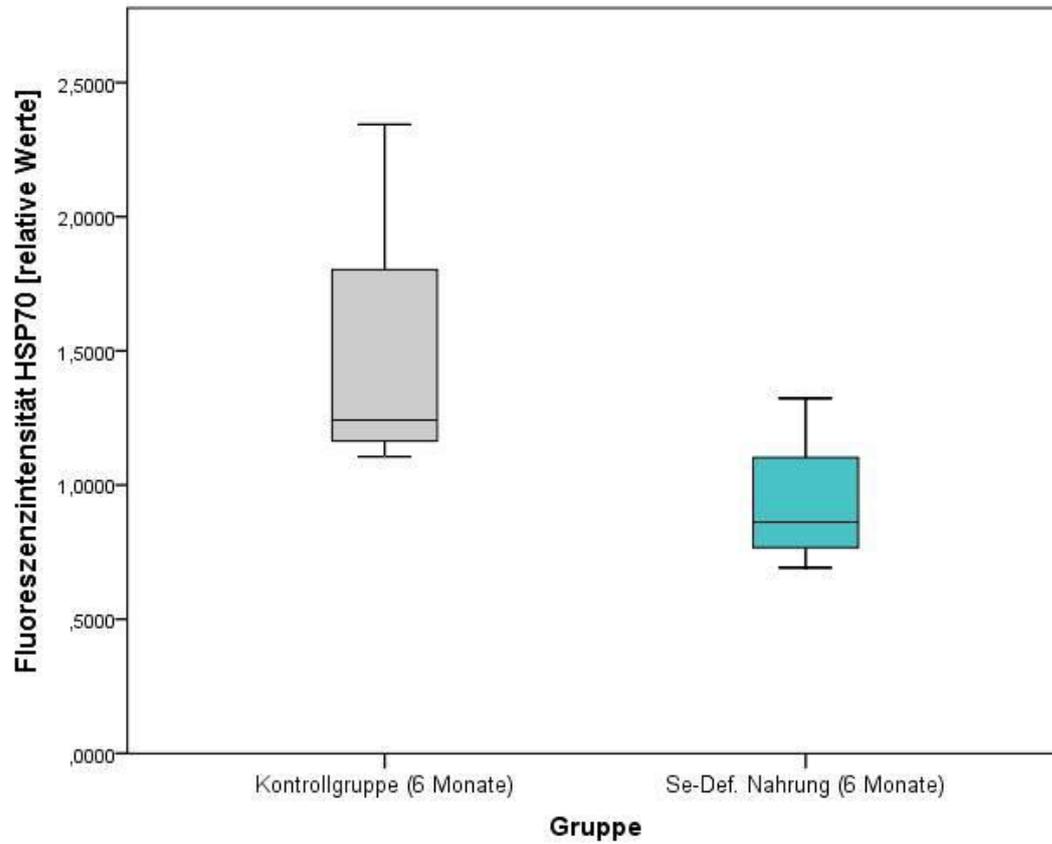


Abbildung 11 Analyse der HSP 70 Konzentration in der Leber am 15.12.14

Die Kontrollgruppe (6 Monate alt) erhielt normale Nahrung

Die Se-Def.-Gruppe (6 Monate alt) erhielt Selen- und Vitamin E – Mangelnahrung

Kontrollgruppe (6 Monate) n=4

Se-Def. (6 Monate) n=4

Mann-Whitney-Test

Kontrollgruppe (6 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (6 Monate) p =0,200

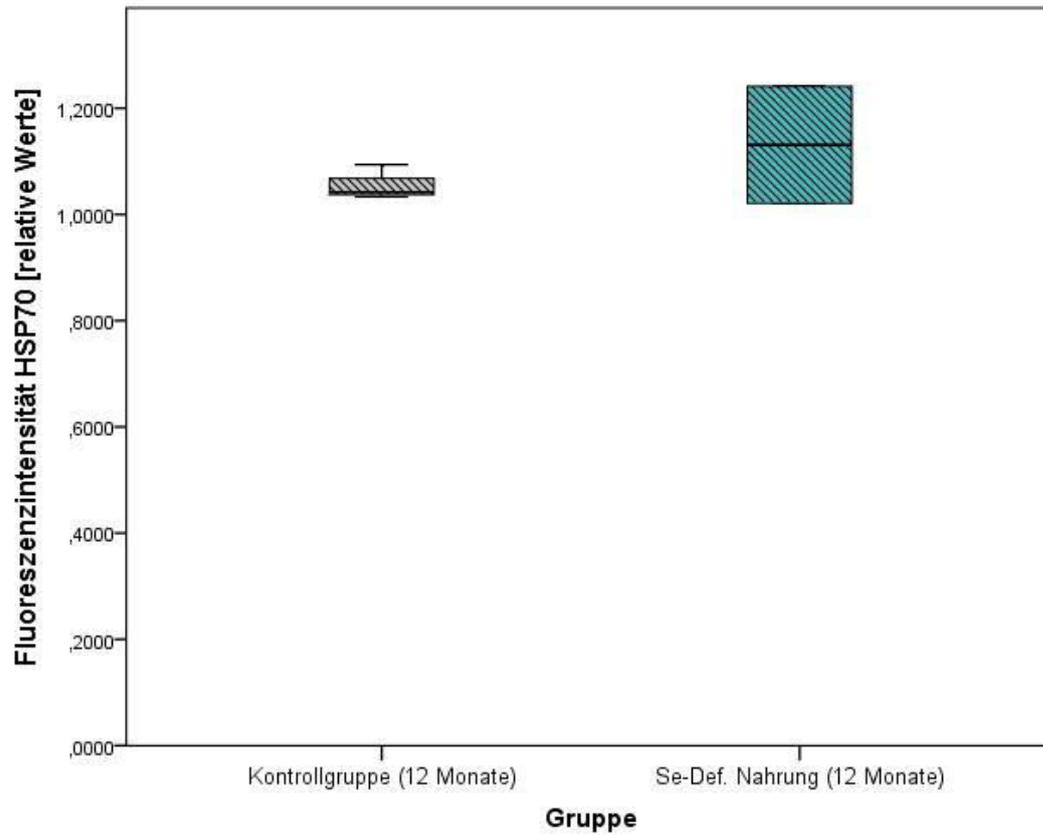


Abbildung 12 Analyse der HSP 70 Konzentration in der Leber am 15.12.14

Die Kontrollgruppe (12 Monate alt) erhielt normale Nahrung

Die Se-Def.-Gruppe (12 Monate alt) erhielt Selen- und Vitamin E – Mangelnahrung

Kontrollgruppe (12 Monate) n=3

Se-Def. (12 Monate) n= 2

Mann-Whitney-Test

Kontrollgruppe (12 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (12 Monate) p = 1,000

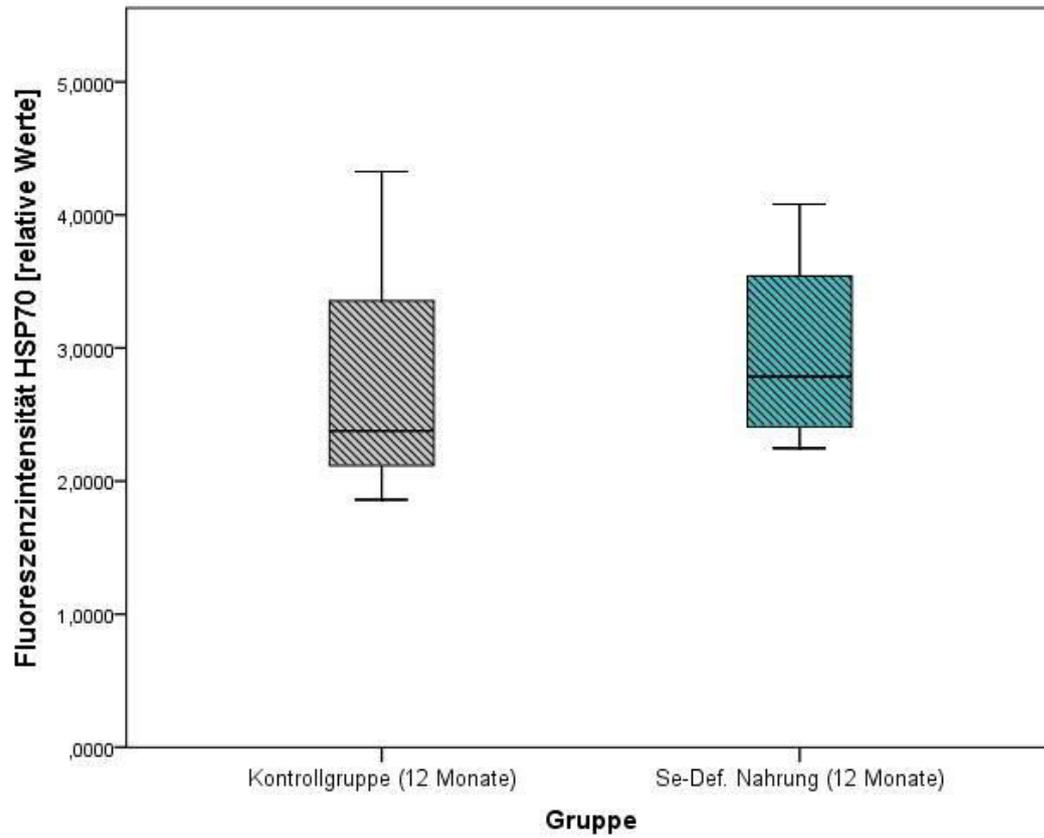


Abbildung 13 Analyse der HSP 70 Konzentration in der Leber am 06.01.15

Die Kontrollgruppe (12 Monate alt) erhielt normale Nahrung

Die Se-Def.-Gruppe (12 Monate alt) erhielt Selen- und Vitamin E – Mangelnahrung

Kontrollgruppe (12 Monate) n=4

Se-Def. (12 Monate) n= 4

Mann-Whitney-Test

Kontrollgruppe (12 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (12 Monate) p =0 ,686

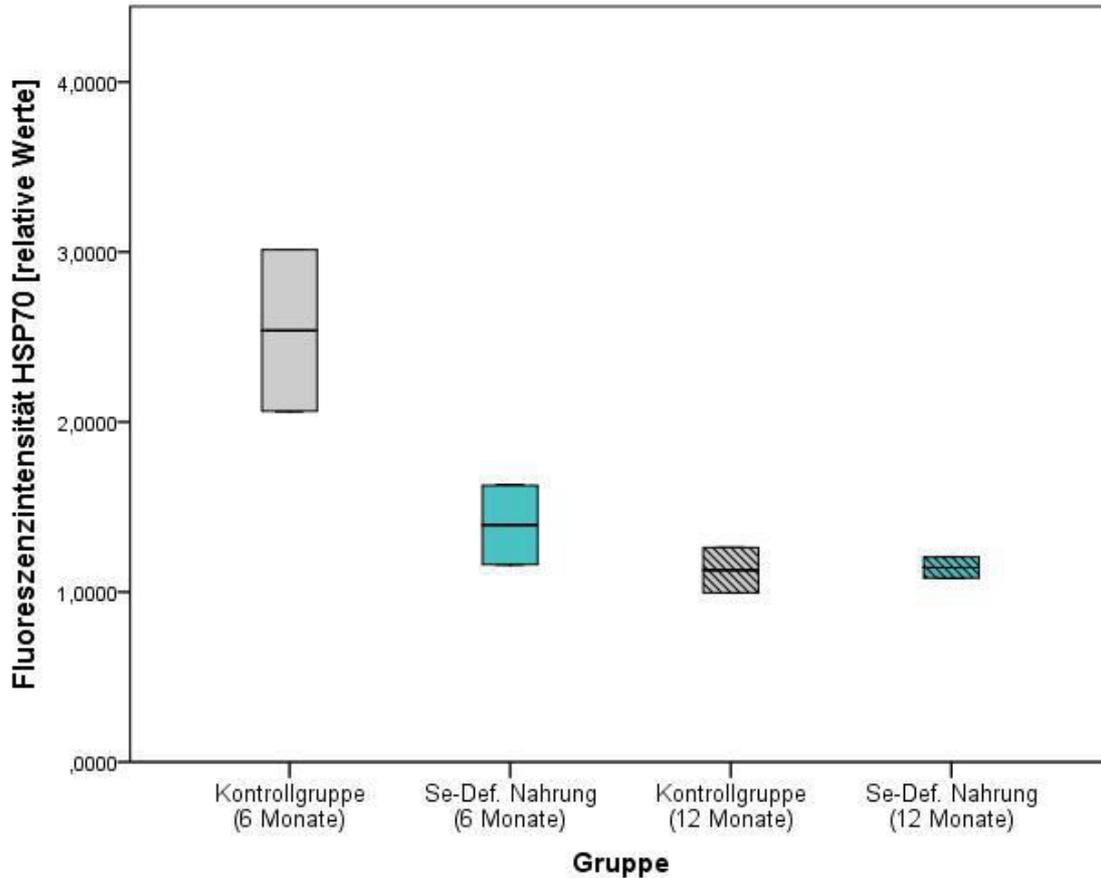


Abbildung 14 Analyse der HSP 70 Konzentration in der Leber am 20.01.15

Die Kontrollgruppe (6,12 Monate alt) erhielt normale Nahrung

Die Se-Def.-Gruppe (6,12 Monate alt) erhielt Selen- und Vitamin E - Mangelernährung

Kontrollgruppe (6 Monate) n= 2 Se.-Def (6 Monate) n=2

Kontrollgruppe (12 Monate) n=2 Se-Def. (12 Monate) n=2

Mann-Whitney-Test

Kontrollgruppe (6 Monate) vgl. Kontrollgruppe (12 Monate) p =0 ,333

Kontrollgruppe (6 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (6 Monate) p = 0,333

Kontrollgruppe (12 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (12 Monate) p = 1,000

Se-Def. Nahrung (6 Monate) vgl Se-Def. Nahrung (12 Monate) p = 1,000

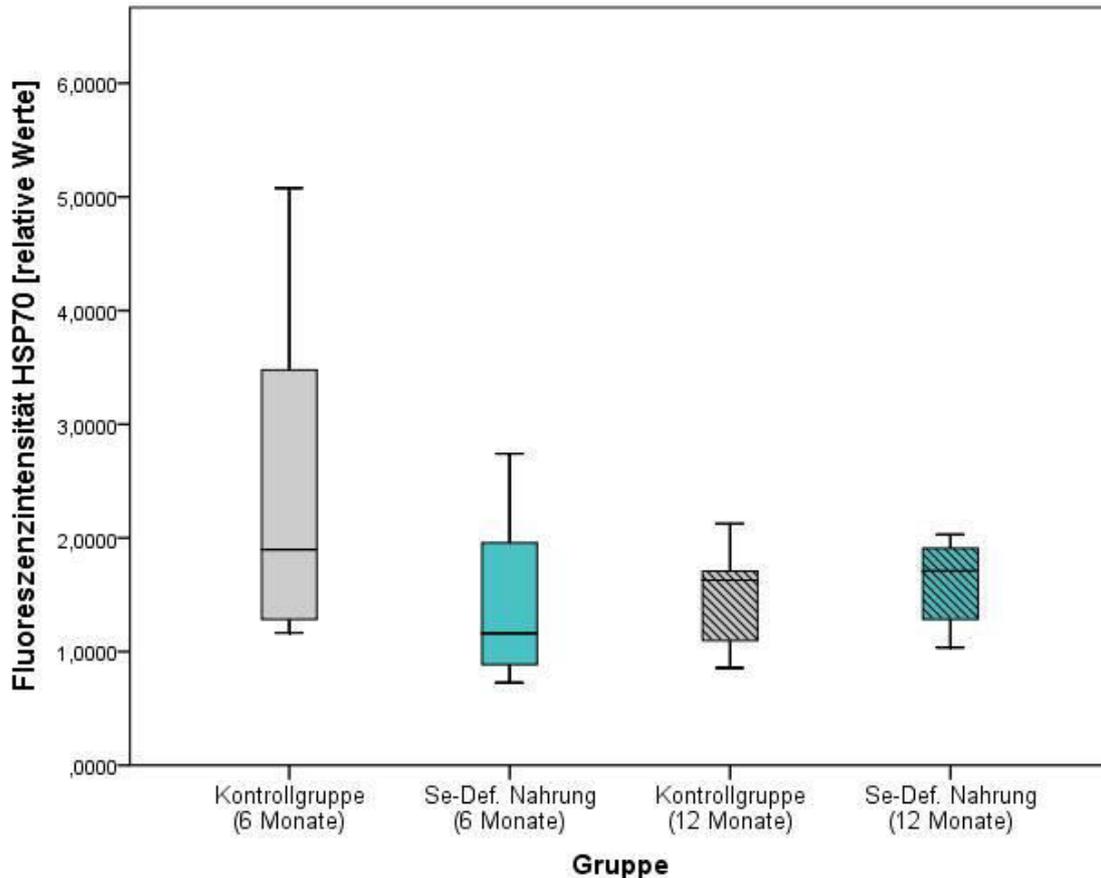


Abbildung 15 Analyse der HSP 70 Konzentration in der Leber

Die Werte wurden gegenüber der Protein-Gemisch-Probe normiert

Die Kontrollgruppe (6,12 Monate alt) erhielt normale Nahrung

Die Se-Def.-Gruppe (6,12 Monate alt) erhielt Selen- und Vitamin E - Mangelernährung

Kontrollgruppe (6 Monate) n= 6

Se.-Def (6 Monate) n= 6

Kontrollgruppe (12 Monate) n= 9

Se-Def. (12 Monate) n= 8

Mann-Whitney-Test

Kontrollgruppe (6 Monate) vgl. Kontrollgruppe (12 Monate) p =0,328

Kontrollgruppe (6 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (6 Monate) p = 0,240

Kontrollgruppe (12 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (12 Monate) p = 0,815

Se-Def. Nahrung (6 Monate) vgl Se-Def. Nahrung (12 Monate) p=0,491

Die Fluoreszenzintensität stellt ein Maß für die HSP 70 Konzentrationen dar. Bei den jungen Tieren (6 Monate alt), die eine Selen und Vitamin E Mangelernährung erhielten, ist ein Trend zu beobachten, dass die Fluoreszenzintensität gegenüber der Kontrollgruppe abnahm.

Bei den 12 Monate alten Tieren, denen eine Selen und Vitamin E Mangelernährung verabreicht wurde, zeigte die Tendenz, dass der Median der Fluoreszenzintensität leicht zunahm und damit die HSP 70 Konzentration leicht zunahm.

3.1.3 Bestimmung der Fluoreszenzintensität der DHE-Färbung in der Niere

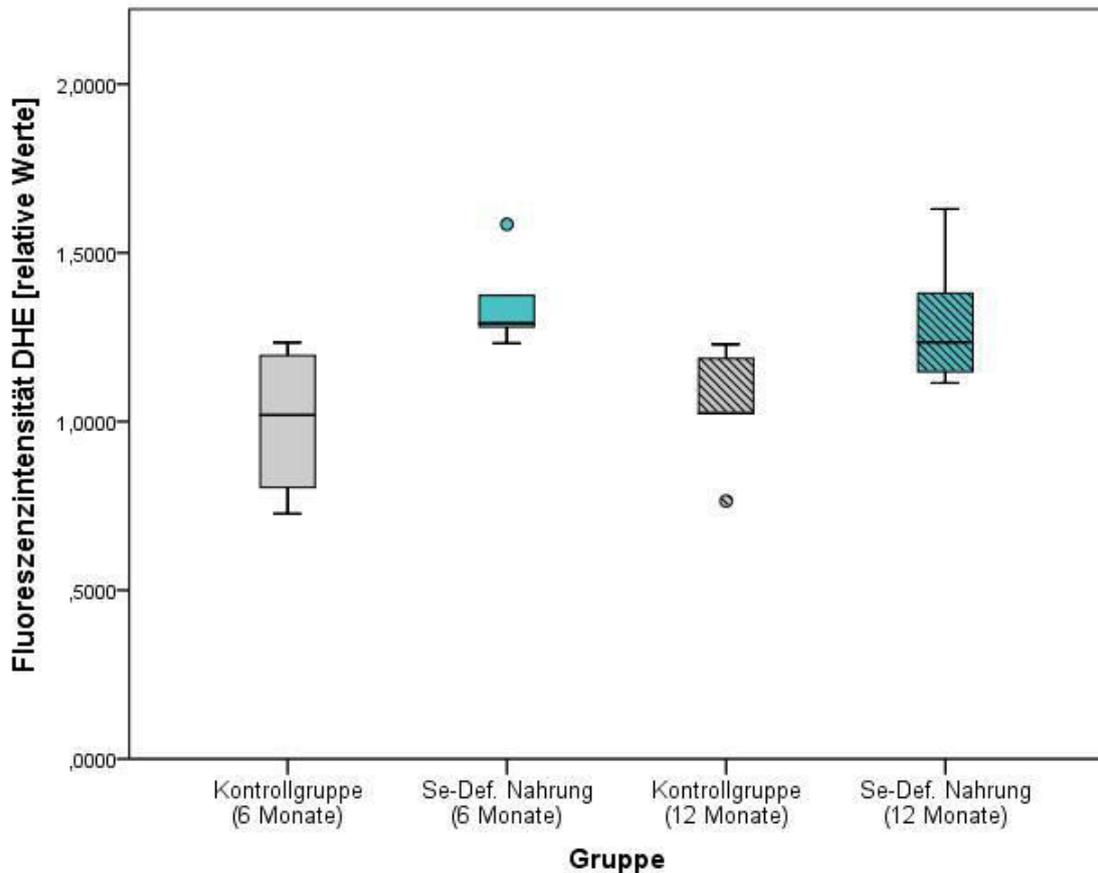


Abbildung 16 Analyse der oxidativen Schäden in der Niere mittels DHE-Färbung

Die Werte wurden gegenüber der Kontrollgruppe (6 Monate) normiert

Die Kontrollgruppe (6,12 Monate alt) erhielt normale Nahrung

Die Se-Def.-Gruppe (6,12 Monate alt) erhielt Selen- und Vitamin E - Mangelernährung

Kontrollgruppe (6 Monate) n= 4

Se.-Def (6 Monate) n=5

Kontrollgruppe (12 Monate) n=5

Se-Def. (12 Monate) n=5

Mann-Whitney-Test

Kontrollgruppe (6 Monate) vgl. Kontrollgruppe (12 Monate) p =0,905

Kontrollgruppe (6 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (6 Monate) p = 0,032

Kontrollgruppe (12 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (12 Monate) p = 0,095

Se-Def. Nahrung (6 Monate) vgl Se-Def. Nahrung (12 Monate) p=0,690

Die DHE Fluoreszenz ist ein Maß für das Vorhandensein intrazellulärer ROS. Die Ratten, denen über 6 Monate eine Selen und Vitamin E Mangel-Nahrung verabreicht wurde, zeigten gegenüber den Ratten, an die übliche selenhaltige Nahrung verfüttert wurde, eine erhöhte intrazelluläre ROS mit einer Signifikanz (Mann – Whitney – U – Test) von p=0,032.

3.1.4 Western Blot Analyse der Niere

3.1.4.1 Nachweis der Hämoxigenase – 1 Konzentration in der Niere

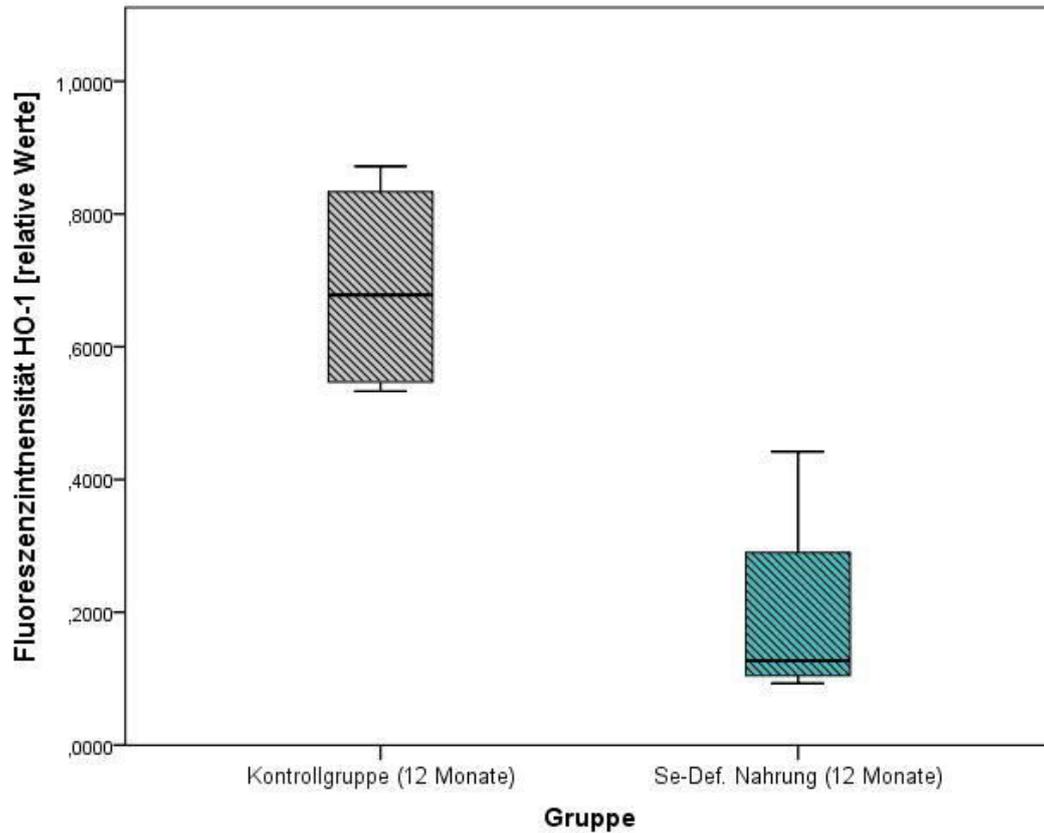


Abbildung 17 Analyse der der HO-1 Konzentration in der Niere am 07.01.15

Die Kontrollgruppe (12 Monate alt) erhielt normale Nahrung

Die Se-Def.-Gruppe (12 Monate alt) erhielt Selen- und Vitamin E – Mangelernährung

Kontrollgruppe (12 Monate) n=4

Se-Def. (12 Monate) n= 4

Mann-Whitney-Test

Kontrollgruppe (12 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (12 Monate) p = ,029

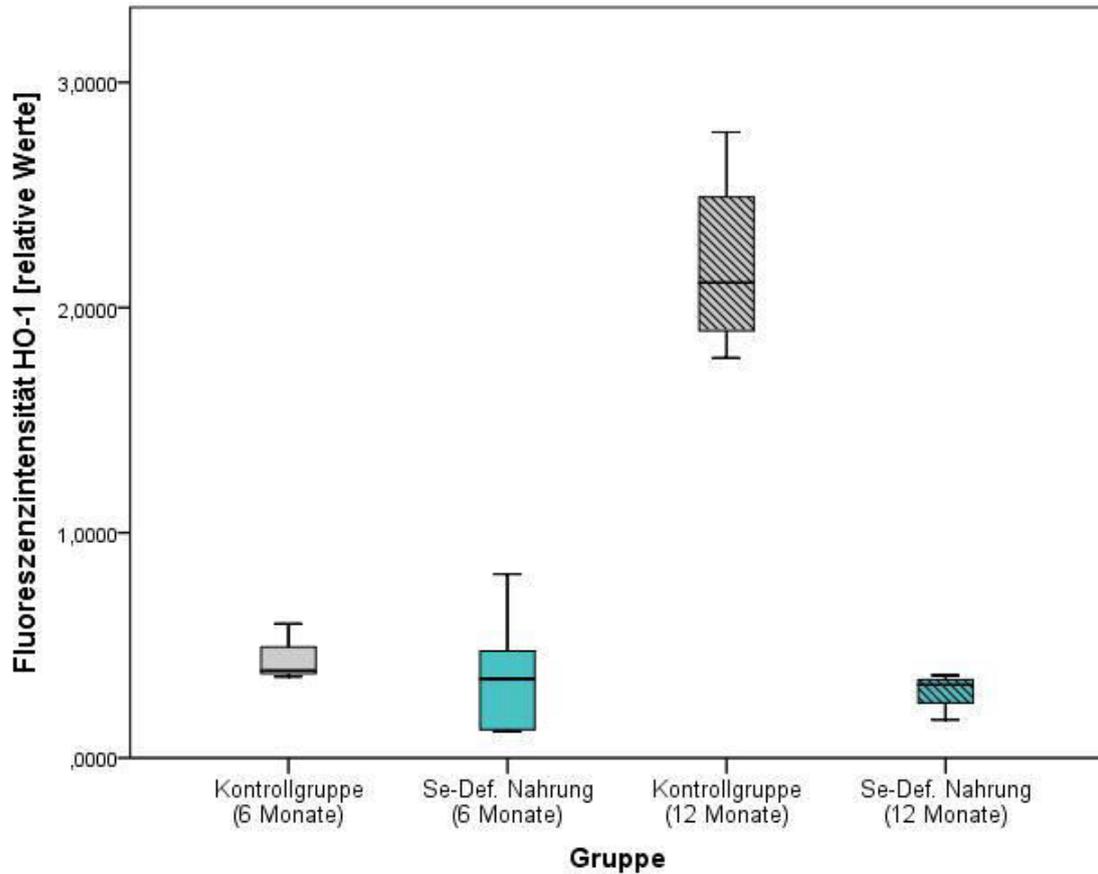


Abbildung 18 Analyse der der HO-1 Konzentration in der Niere am 7.1.15 (6 Monate) und 20.01.15 (12 Monate)

Die Kontrollgruppe (6,12 Monate alt) erhielt normale Nahrung

Die Se-Def.-Gruppe (6,12 Monate alt) erhielt Selen- und Vitamin E - Mangelernährung

Kontrollgruppe (6 Monate) n= 3 Se.-Def (6 Monate) n=5

Kontrollgruppe (12 Monate) n=4 Se-Def. (12 Monate) n=4

Mann-Whitney-Test

Kontrollgruppe (6 Monate) vgl. Kontrollgruppe (12 Monate) p = ,057

Kontrollgruppe (6 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (6 Monate) p = ,571

Kontrollgruppe (12 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (12 Monate) p = ,029

Se-Def. Nahrung (6 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (12 Monate) p = ,905

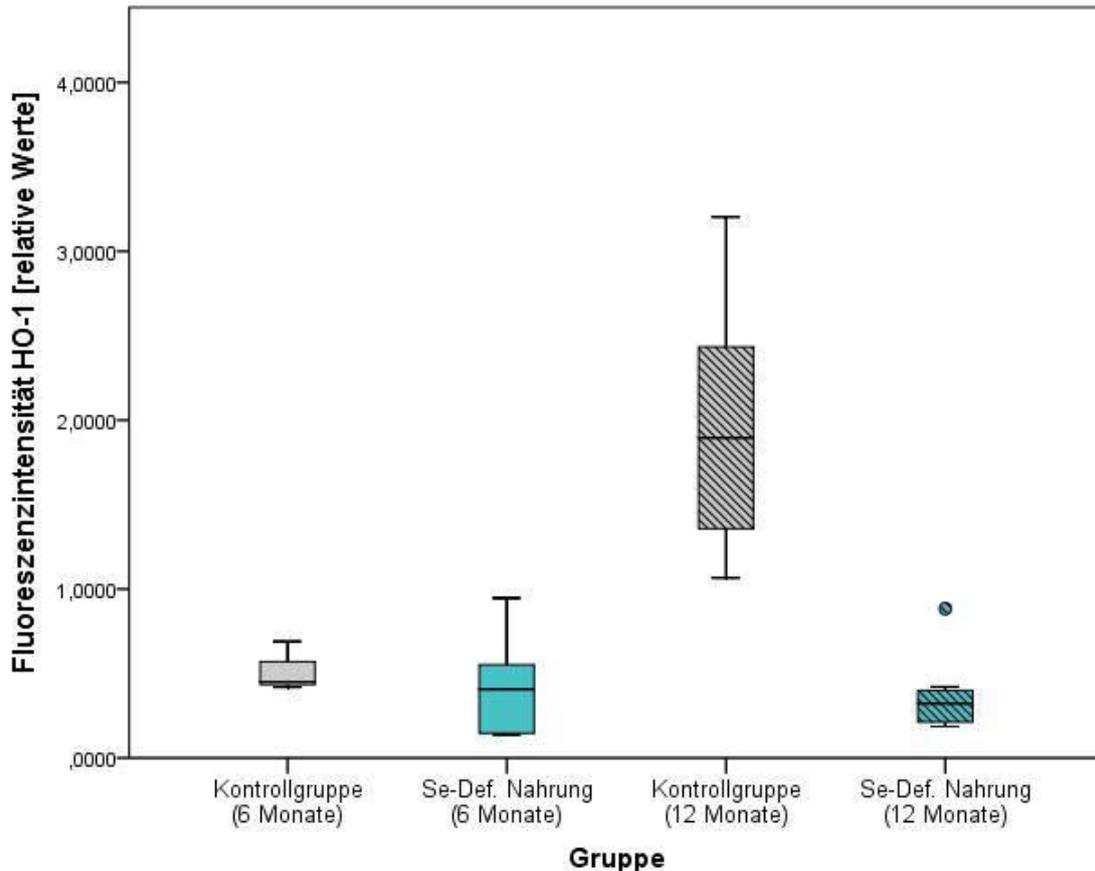


Abbildung 19 Analyse der HO-1 Konzentration in der Niere

Die Werte wurden gegenüber der Protein-Gemisch-Probe normiert
Die Kontrollgruppe (6,12 Monate alt) erhielt normale Nahrung
Die Se-Def.-Gruppe (6,12 Monate alt) erhielt Selen- und Vitamin E - Mangelernährung

Kontrollgruppe (6 Monate) n=3 Se.-Def (6 Monate) n=5
Kontrollgruppe (12 Monate) n=8 Se-Def. (12 Monate) n=8

Mann-Whitney-Test

Kontrollgruppe (6 Monate) vgl. Kontrollgruppe (12 Monate) p =0,012
Kontrollgruppe (6 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (6 Monate) p = 0,571
Kontrollgruppe (12 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (12 Monate) p = 0,000
Se-Def. Nahrung (6 Monate) vgl Se-Def. Nahrung (12 Monate) p=0,943

Die Abbildung 19 zeigt, dass in der Kontrollgruppe (6 Monate und 12 Monate), bei den älteren Tieren gegenüber den jüngeren Tieren die HO-1-Konzentration signifikant anstieg (p=0,012). Bei den älteren Tieren (12 Monate), die eine Selen-Mangelernährung erhielten, wird ein signifikanter Abfall (p= 0,000) gegenüber der Kontrollgruppe (12 Monate) in der HO-1- Konzentration gemessen.

In der Kontrollgruppe (6 Monate und 12 Monate) stiegen die Mediane der Fluoreszenzintensität der HO-1 stark an (Abbildung 18). Die älteren Tiere (12 Monate)

mit einer Selen und Vitamin E Mangelernährung wiesen einen starken Abfall in der Fluoreszenzintensität der HO-1 gegenüber der Kontrollgruppe (12 Monate) auf (Abbildung 17 und Abbildung 18). Die Mediane der Fluoreszenzintensität der 12 Monate alten Tieren mit Selen und Vitamin E Mangelernährung verringerte sich geringfügig gegenüber den 6 Monate alten Tieren mit Selen und Vitamin E Mangelernährung Abbildung 18 .

3.1.4.2 Western Blot Analyse der HSP 70 Konzentration in der Niere

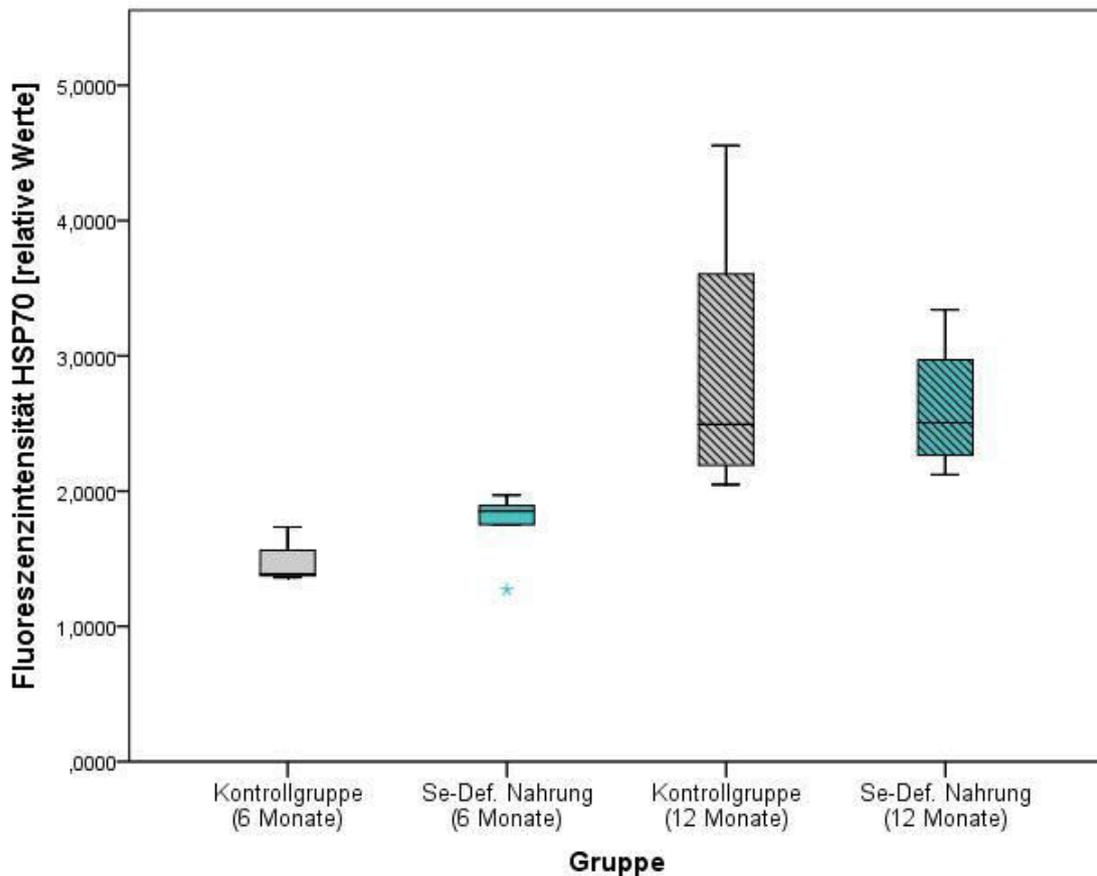


Abbildung 20 Bestimmung der HSP 70 Konzentration in der Niere am 2.12.14 (6 Monate) und 6.01.15 (12 Monate)

Die Kontrollgruppe (6,12 Monate alt) erhielt normale Nahrung

Die Se-Def.-Gruppe (6,12 Monate alt) erhielt Selen- und Vitamin E - Mangelernährung

Kontrollgruppe (6 Monate) n= 3 Se.-Def (6 Monate) n=5

Kontrollgruppe (12 Monate) n=4 Se-Def. (12 Monate) n=4

Mann-Whitney-Test

Kontrollgruppe (6 Monate) vgl. Kontrollgruppe (12 Monate) p = 0,057

Kontrollgruppe (6 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (6 Monate) p = 0,250

Kontrollgruppe (12 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (12 Monate) p =1,000

Se-Def. Nahrung (6 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (12 Monate) p = 0,016

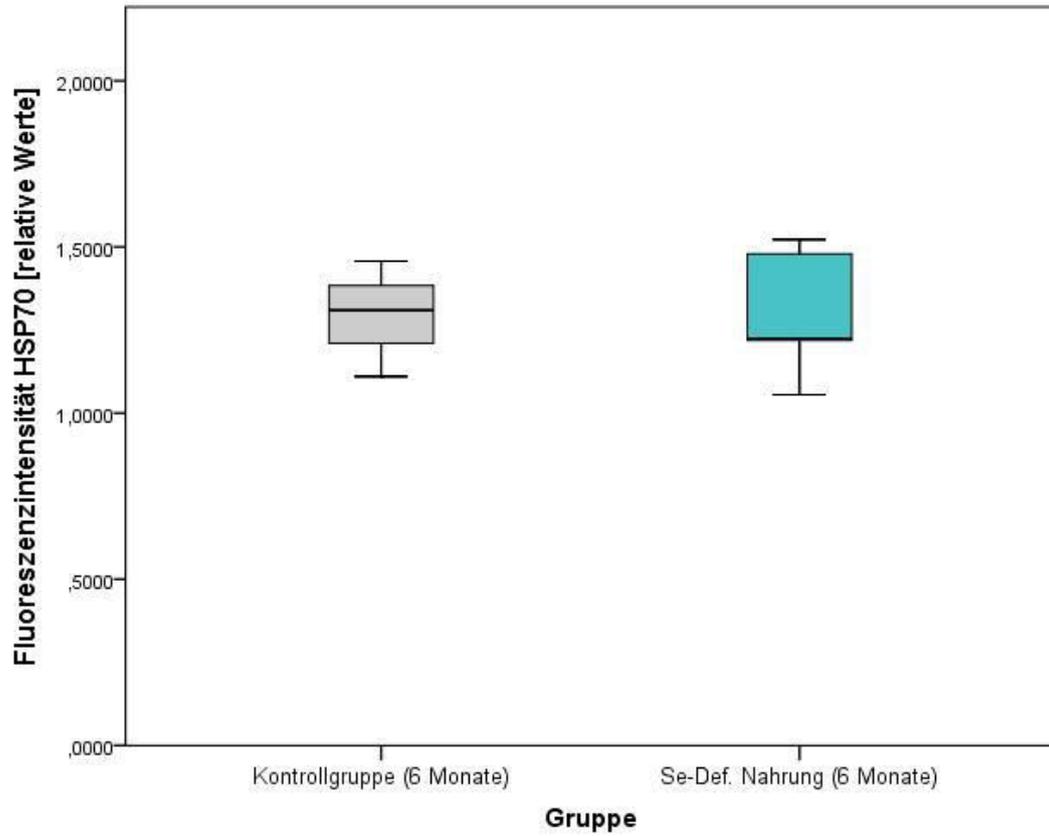


Abbildung 21 Analyse der HSP 70 Konzentration in der Niere am 06.1.15

Die Kontrollgruppe (6 Monate alt) erhielt normale Nahrung

Die Se-Def.-Gruppe (6 Monate alt) erhielt Selen- und Vitamin E – Mangelernährung

Kontrollgruppe (6 Monate) n=3

Se-Def. (6 Monate) n= 5

Mann-Whitney-Test

Kontrollgruppe (6 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (6 Monate) p = 1,000

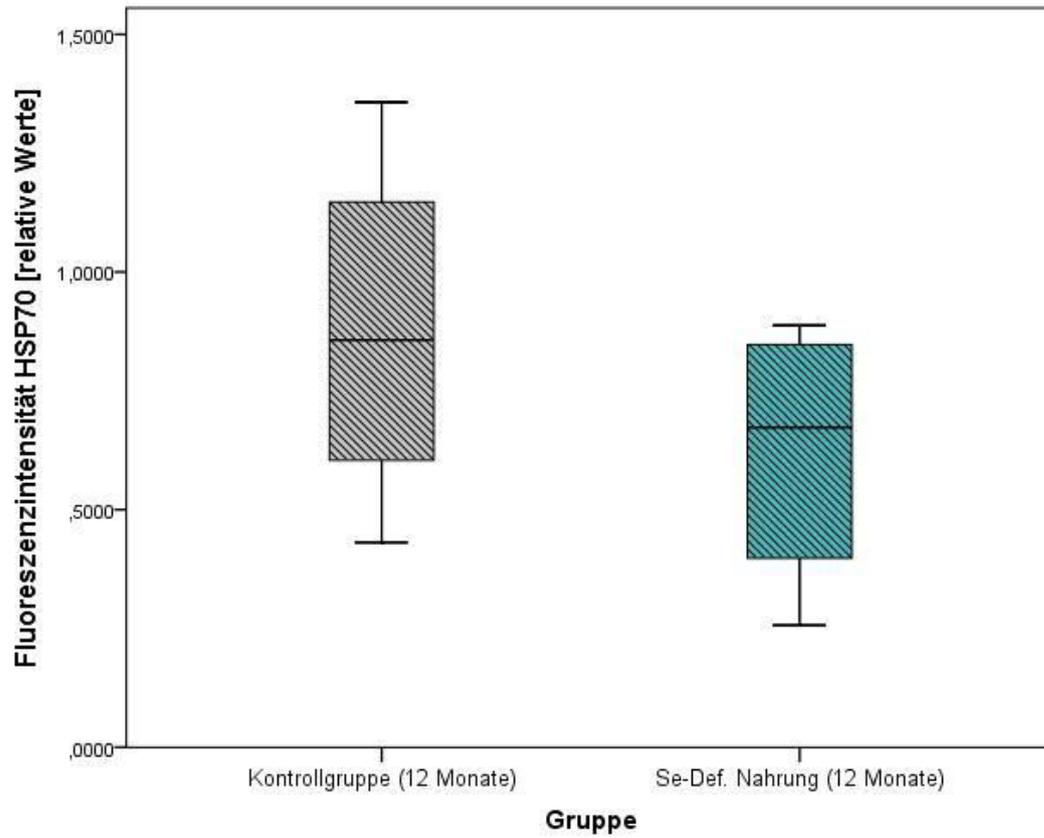


Abbildung 22 Analyse der HSP 70 Konzentration in der Niere am 02.12.14

Die Kontrollgruppe (12 Monate alt) erhielt normale Nahrung

Die Se-Def.-Gruppe (12 Monate alt) erhielt Selen- und Vitamin E – Mangelernährung

Kontrollgruppe (12 Monate) n=4

Se-Def. (12 Monate) n= 4

Mann-Whitney-Test

Kontrollgruppe (12 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (12 Monate) p = 0,486

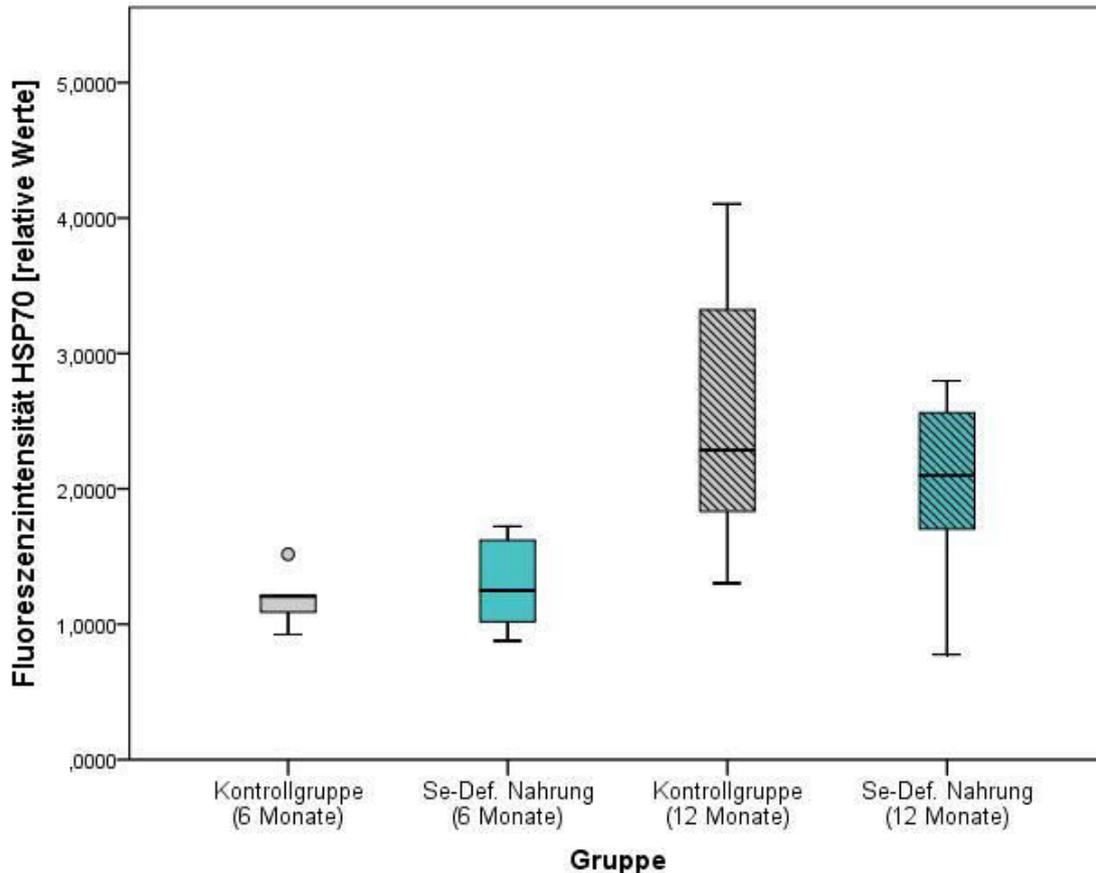


Abbildung 23 Analyse der HSP 70 Konzentration in der Niere

Die Werte wurden gegenüber der Protein-Gemisch-Probe normiert

Die Kontrollgruppe (6,12 Monate alt) erhielt normale Nahrung

Die Se-Def.-Gruppe (6,12 Monate alt) erhielt Selen- und Vitamin E - Mangelernährung

Kontrollgruppe (6 Monate) n= 6

Se.-Def (6 Monate) n=10

Kontrollgruppe (12 Monate) n=8

Se-Def. (12 Monate) n=8

Mann-Whitney-Test

Kontrollgruppe (6 Monate) vgl. Kontrollgruppe (12 Monate) p =0,001

Kontrollgruppe (6 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (6 Monate) p = 0,428

Kontrollgruppe (12 Monate) vgl. Se-Def. Nahrung (12 Monate) p = 0,442

Se-Def. Nahrung (6 Monate) vgl Se-Def. Nahrung (12 Monate) p=0,012

In der Kontrollgruppe stieg die Fluoreszenzintensität von HSP 70 bei den älteren Tieren (12 Monate) gegenüber den jüngeren Tieren (6 Monate) erheblich an (siehe Abbildung 17). Mit dem Alter erhöhte sich der oxidative Stress.

Allerdings verändert sich die HSP70 Konzentration zwischen den älteren Tieren der Kontrollgruppe und der Gruppe Selen und Vitamin E Mangelernährung nicht.

4 Diskussion

4.1 Auswirkungen des Selenmangels auf Leber und Niere

Mangelernährung oder fehlerhafte Ernährung können oxidativen Stress begünstigen oder zu einem gestörten Gleichgewicht zwischen pro-oxidativen und anti-oxidativen Faktoren führen, die eine DNA-Schädigung zur Folge haben. Ein großes Augenmerk muss auf Spurenelemente gelegt werden, die jedoch in größeren Mengen Vergiftungserscheinungen hervorrufen können (Vinceti et al. 2001). Zu diesen Spurenelementen gehört Selen.

Selen ist ein Antioxidans, das oxidativen Stress in den Zellen reduziert. Die Hauptfunktion von Selen ist, oxidativen Stress über eine Erhöhung der Aktivität des Enzyms Glutathionperoxidase zu vermindern, wodurch das anti-oxidative und pro-oxidative Gleichgewicht gehalten wird. Von besonderer Bedeutung ist die Selenaufnahme und Verteilung im Körper. Die Synthese verschiedener Selenoproteine (z.B.: Typ 1 5` Deiodinase) und der Plasma GPx erfolgt hauptsächlich in der Niere (Iglesias et al. 2013). Die höchste Selen-Konzentration ist in Niere und Leber nachgewiesen worden (Thuluvath und Triger 1992), die auch die maßgeblichen Organe für den Selenhaushalt im Körper sind.

Auswirkungen von Selenmangel in der Ernährung sollten daher in diesen beiden Organen besonders gut nachweisbar sein.

4.1.1 Einflüsse von Selenmangel auf die Leber

Die Leber erfüllt eine zentrale Rolle im Stoffwechsel. Um ihre vielfältigen Aufgaben wahrnehmen zu können, ist sie sehr gut durchblutet. Blutproteine wie auch Peroxidasen beeinträchtigen die DHE-Oxidation, da sie wie O_2^- mit DHE reagieren. Daher sollte das zu untersuchende Gewebe möglichst geringe Blutrückstände aufweisen (Enrique Cadenas and Lester Packer 2008). Um diese mögliche Fehlerquelle auszuschließen, wäre bei der Leber für zukünftige Untersuchungen eine Organperfusion mit PBS anzuraten. Bei den Versuchen wiesen ein Teil der Gewebeschnitte recht erhebliche Blutrückstände auf. Für die Auswertung wurden daher bevorzugt Schnitte mit geringen Blutrückständen ausgewählt.

Es konnten mit Hilfe der DHE-Färbung wichtige Trends bezüglich des Ausmaßes des oxidativen Stress ausgemacht werden. Bei Selen-Mangel in der Nahrung zeigten die älteren Tieren (12 Monate) im Vergleich zu den jüngeren Tieren (6 Monate) einen Anstieg der intrazellulären ROS. Dieser Trend bestätigt die Hypothese, dass Selenmangel und höheres Alter einhergehen mit einem vermehrten oxidativen Stress im Organ. Dies bestätigt auch die These, dass mit höherem Alter und Selenmangel ROS zunehmen.

Für den Nachweis des Stressprotein HSP70 in der Leber ließ sich kein eindeutiger Trend ermitteln, da die Standardabweichungen vergleichsweise hoch waren.

Für das Stressprotein Hämoxigenase 1 (HO-1) zeigte sich der Trend, dass es unter Selenmangel und bei höherem Lebensalter weniger stark exprimiert wird. Dies kann auf eine Fehlfunktion oder Supprimierung in der HO-1 Expression hindeuten. Als Ursache kann diskutiert werden, dass die Alterung und die verminderte Selen-Aufnahme zu vermehrtem oxidativen Stress führen, der aber in den vorliegenden Tiergruppen nicht durch eine erhöhte Expression von HO-1 ausgeglichen werden konnte. Die genaue Aufklärung bedarf noch weitergehender Forschung.

4.1.2 Vermehrt intrazelluläre ROS in der Niere bei Selen-Mangel

Die Selenoproteine (z.B.:Typ 1 5` Deiodinase D1) und die Plasma Gluthation Peroxidase) werden in der Niere synthetisiert, um das Gleichgewicht zwischen anti-oxidativen und pro-oxidativen Faktoren in der Zelle aufrechtzuerhalten (Iglesias et al. 2013).

Die erhöhte Produktion vom Stressprotein HSP 70 bei jüngeren Tieren (6 Monate) gegenüber den älteren Tieren (12 Monate) ist bei den Versuchen als Trend zu verzeichnen. Dieser Trend tritt allerdings nicht auf gegenüber der Kontrollgruppe und der in Selen und Vitamin E defizienten Gruppe. Literaturergebnisse werden bestätigt, die einen Anstieg von oxidativem Stress im Alter beschreiben (Finkel und Holbrook 2000). Die intrazellulären ROS erhöhten sich bei den 6-Monate alten Tieren, mit Selen-Mangelnahrung gegenüber der Kontrollgruppe. Ein Selenmangel führt daher zu vermehrtem oxidativen Stress, der die DNA der Tiere schädigt. Der in der Literatur beobachtete Anstieg in den Konzentrationen der HO-1 bei älteren Tieren kann

nachgewiesen werden, ebenfalls der Abfall dieser Konzentration, wenn die Tiere vermehrten oxidativen Stress ausgesetzt waren.

Die Konzentration des Stressproteins HO-1 fiel bei älteren Tieren (12 Monate) gegenüber jüngeren Tieren (6 Monate) mit einer Selen-Mangelernährung ab. Die Ursache für den Konzentrationsabfall könnte ein DNA-Schaden oder Fehlfunktionen in der HO-1 Synthese sein. Die genaue Ursache für die verminderte Produktion dieses Stressproteins ist nicht bekannt und bedarf weiterer Forschung.

4.1.3 Mögliche weitere Einflüsse von Selenmangel auf den Organismus

Selenmangel in der Ernährung kann zu einer Erkrankung - der Keshan-Krankheit - führen, die zum ersten Mal in China beschrieben wurde. Die betroffenen Regionen charakterisiert eine sehr niedrige Selenkonzentration im Boden. Auch in Deutschland ist Selen im Boden regional unterschiedlich verteilt. Die Konzentration liegt in den südlichen Landesteilen niedriger als in den nördlichen (Piechotowski et al. 2002). Interessant wäre es zu wissen, ob sich dieses Nord-Süd-Gefälle auch in der Häufigkeit von typischen Erkrankungen widerspiegelt, die in Verbindung mit Selenmangel auftreten können.

Ein ergiebiges Selenangebot weisen alle tierischen Produkte auf. Gemüse und Früchte dagegen enthalten weniger Selen. Zusätzlich beeinflusst die Zubereitung wesentlich den Gehalt von Selen im Gemüse; Kochen reduziert den Selengehalt erheblich. Die Paranuss zeichnet einen hohen Selengehalt aus; jedoch enthält sie auch viel toxisches Barium. Drei Paranüsse (Gewicht 13,2g) liefern 290 µg Selen, allerdings auch 26mg Barium. Die Empfehlung der Obergrenze für Barium liegt bei 0,2 mg/kg/d (bei 75kg also 15 mg/d) (Rayman 2008). Eine vegane Ernährung kann daher zu Selenmangelerscheinungen führen. Daher ist es wichtig, auf eine ausgewogene Ernährung zu achten. Neben Veganern können auch folgende Personengruppen von einem Selenmangel betroffen sein: Alkoholiker, Menschen, die parenteral ernährt werden, Individuen die bestimmte Diäten einhalten und Patienten, die eine gastrointestinale Malabsorption (z.B. Morbus Crohn) aufweisen (Selen in der Umweltmedizin 2006).

Auffällig ist die höchst unterschiedliche Konzentration von Selen in den einzelnen Organen des Körpers. Selen reichert sich zunächst im Gehirn und in den Hoden an

(Davies 1995). Blut und Gehirn weisen - bei ausgewogener Ernährung - einen niedrigen Selengehalt auf. Fraglich ist, welche Mechanismen im Gehirn existieren, um die Selenaufnahme zu kontrollieren und zu beschränken. Auch wäre es interessant zu untersuchen, welche Bedeutung Selen für die Entwicklung des Gehirns einnimmt und welche Funktionen es im Gehirn unterstützt.

Die hohe Konzentration von Selen im Hoden von Ratten springt ins Auge (Flohé 2007). Moderater Selenmangel vermindert die Beweglichkeit der Spermien und führt häufig auch zu morphologischen Veränderungen der Spermien, bei denen Kopf vom Schwanz getrennt sind. Starker Selenmangel kann die Spermatogenese völlig unterbrechen (Roman et al. 2014). Männliche Ratten, die unter Selenmangel leiden, sind unfruchtbar (Behne et al. 1982).

Dieser Effekt wird dem GPx4 zugeschrieben. GPx4 gehört zu der Familie der Gluthathion-Peroxidasen der Selenoenzymen, die überall exprimiert wird, aber vor allem in den männlichen Geschlechtszellen. Es gibt drei Isoformen der GPx4, die zytosolische, die mitochondriale und die nukleare. Bei einer Störung aller drei Isoformen stirbt der Embryo sehr früh ab. Der Ausfall der nuklearen GPx4 beeinträchtigt nicht die embryonale Entwicklung und die Fruchtbarkeit. Bei fehlender mitochondrialen GPx4 verläuft die embryonale und postnatale Entwicklung normal, jedoch verursacht sie männliche Unfruchtbarkeit (Schneider et al. 2009). Offensichtlich nimmt Selen eine entscheidende Rolle bei der Fertilität ein (Behne et al. 1982). Der Testis wird vorrangig bei Mangel an Selen mit Selen versorgt (Fordyce 2013).

Die Spermatogenese erzeugt in den männlichen Keimzellen oxidativen Stress. Es gibt immer mehr Hinweise, dass eine Verschiebung des Redox-Gleichgewichts zu einem mehr oxidativen Status wichtig ist für die finale Reifung der Spermien und für die Akrosomreaktion (Maiorino und Ursini 2002).

Es ist ungeklärt, welche sehr wichtige Funktion Selen auch bei der Befruchtung der Eizelle zukommt. Während der Schwangerschaft beeinflusst Selen positiv Wachstum und Entwicklung des Fötus, allerdings speichert der Fötus Selen erst im letzten Trimenon (Cem Ekmekcioglu, Wolfgang Marktl 2006), sodass vorher eine Versorgung über die Ernährung der Mutter sichergestellt sein muss.

Während der Stillzeit nimmt die Selen-Konzentration im mütterlichen Organismus ab. Nach ca. 50 Tagen fällt die Selenkonzentration in der Muttermilch auf die Hälfte ab

(Selen in der Umweltmedizin 2006). Interessant wäre es zu wissen, welche Ursachen der steile Abfall in der Selenkonzentration hat. Womöglich lässt sich daraus schließen, dass das Neugeborene einen erhöhten Bedarf an Selen hat und wenn, für welche physiologischen Entwicklungsprozesse der Organismus des Neugeborenen Selen benötigt.

4.1.4 HSP70 Konzentration bei älteren Ratten

Die Hitzeschock-Proteine (HSP) gehören zu der Familie der Chaperone. Diese schützen die Zelle vor chemischen und physischen Gefahren. Sie können ausgehen von Temperaturerhöhung (Hitzeschock), Sauerstoffmangel, Hypoxie, metabolischen Stress, Zytokinen, Stickoxiden, Ethanol, Schwermetallen, Apoptose induzierenden Stoffen, anderen denaturierenden Stoffen und Drogen. Unter Einfluss dieser Gefährdungen kann die Zelle unmittelbar HSP vermehrt synthetisieren und exprimieren. Andere Proteinsynthesen werden gestoppt. Die HSPs regulieren die zelluläre Homöostase und unterstützen beim Überleben der Zelle (Liu et al. 2012).

Das Hitzeschockprotein cognate Protein 70 (HSC 70) gehört zu der Familie der Hitzeschock Proteine 70 (HSP 70). Dieses Protein wird konstitutiv (permanent) exprimiert und fungiert als molekulares Chaperon. Es überwacht wichtige zelluläre Prozesse wie Proteinfaltung, erneute Faltung, Aufbau, Abbau und Proteintranslokation (Protein Transport) innerhalb von Membranen. Unter physiologischen Bedingungen unterstützt HSC 70 die Proteinfaltung und unterstützt den Bau des Steroid-Rezeptor-Komplexes. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Translokation des Transkriptionsfaktors nuclear factor kB zum Kern. HSC70 wird unter einigen Stressbedingen hochreguliert und verhindert die Denaturierung von Proteinen (Tsukahara et al. 2000).

Den Abfall der HSP 70 Konzentration im Alter, der mit einem niedrigeren Potential verbunden ist vor oxidativen Stress zu schützen, konnten einige Forschungsgruppen nachweisen (Kregel et al. 1995). Zusätzlich versuchten Hall et al für die Leber den Nachweis zu erbringen, dass wiederholte Wärmebelastung zu verminderter induzierte HSP 70 Expression führt und damit im Alter die Mortalität und die Morbidität ansteigen. Sie erbrachten den histologischen Nachweis, dass im Alter Hitzestress stärkere Gewebeschäden verursacht. Es konnte ein Zusammenhang hergestellt werden

mit einer verringerten HSP 70 Konzentration im Alter und resultierenden Gewebsschäden. Junge Ratten reagierten auf Hitzestress mit verstärkter HSP 70 Expression im Kern und im Zytosol, welches über 48h in den Hepatozyten in den zentralen Venen Regionen verblieb. Die jüngeren Tiere wiesen eine geringere und kürzere HSC 70 Expression auf. Im Alter verzögerte und verringerte sich die HSP 70 Expression im Kern und im Zytosol. Die älteren Tiere kompensierten den Mangel an den HSP 70 Protein mit einer verstärkten Ausschüttung von HSC 70 in der Umgebung der zentralen Venen, welche als vermeintlich sauerstoffarme Region angesehen wird. Aus ihren Ergebnissen leitet die Arbeitsgruppe ab, dass die verminderte HSP 70 Expression bei älteren Tieren zu einer vermehrten Zellschädigung und einer reduzierten Stresstoleranz führt. Diese Erkenntnisse erarbeiteten sie in Untersuchungen von männlichen Tieren des Stammes Fischer 344 einer Gruppe von jungen - 6 Monate alten - und alten - 24 Monate alten - Ratten (Hall et al. 2000).

4.1.5 Die HO-1Konzentration bei älteren Ratten

Hämoxygenase 1 (HO-1) wird als Schlüsselenzym vermehrt unter oxidativem Stress produziert. Es katalysiert hoch reaktive freie Hämprodukte. Bei der Umwandlung von Häm zu Biliverdin wird Eisen und Kohlenstoffmonoxid (CO) frei (Nath 2006). Aus Biliverdin bildet sich über die Biliverdin - Reduktase Bilirubin. Gewebeschäden führen zur Ausschüttung von HO- 1 und verringern diese (Nath et al. 1992). CO entfaltet in geringen Mengen eine zytoprotektive, antiapoptische, vasorelaxante und antiinflammatorische Wirkung. Geringen Mengen von Gallenfarbstoffen schreibt man auch eine antiinflammatorische und antioxidative Wirkung zu (Nath 2006).

Die Arbeitsgruppe Ferenbach untersuchte die Nieren von Mäusen und fand, dass bei älteren Tieren, welche unter renaler Ischämie/Reperfusionsschaden (IRI) leiden, die in akutes Nierenversagen führt, die HO-1 Induktion reduziert ist. In ihrer Studie wiesen sie nach, dass die Leber älterer Tiere – ca. 14 Monat alt - in Folge von IRI nur über eine geringe Fähigkeit verfügt, HO-1 hoch zu regulieren. Zusätzlich verschlimmerte sich- verglichen mit jüngeren Tieren (ca. 2 Monate alt)- der Krankheitsverlauf (Ferenbach et al. 2011).

In der Leber untersuchten Bloomer et all nach Hitzestress die HO-1 Expression bei jungen (6 Monate alt) und alten (24 Monate alt) Ratten (Bloomer et al. 2009). Nur die

Kupffer-Zellen in der Leber können unter normalen und stressfreien Bedingungen HO-1 exprimieren. Unter normalen, nicht gestressten Bedingungen war das HO-1 Protein kaum nachweisbar mittels Immunoblot. Sie zeigten, dass im Alter die HO-1 Expression signifikant erhöht ist, allerdings ist die zusätzliche stressinduzierte HO-1 Expression im Alter abgeschwächt. Die HO-1 Konzentration wurde bei älteren Tieren durch eine dreimal mal so hohe Anzahl von Kupffer-Zellen in der Leber erzeugt. Bei den jüngeren Tieren erfolgte nur ein moderater Anstieg an Kupffer-Zellen. Blommer et al. vermuten, dass die vermehrte HO-1 Expression bei jüngeren Tieren durch Hepatozyten erfolgt (Bloomer et al. 2009).

4.1.6 Forschungsergebnisse Selenmangel bei Hühnern in der Leber

Den vermehrten oxidativen Stress durch Selenmangel untersuchte eine Forschungsgruppe aus China in der Leber von einjährigen Hühnern (Liu et al. 2015).

Sie bestimmten unter anderem bei 300 Tieren die HSP 70 Konzentration in der Leber. Der Selengehalt der Nahrung betrug in der Kontrollgruppe 0,2 mg/kg, in der Selen-Mangelgruppe 0,02 mg/kg. 15 Hennen wurden immer nach 15, 25, 35, 45, 55, und 65 Tagen getötet. Die Autoren untersuchten das Lebergewebe auf morphologische Veränderung, auf antioxidative Enzyme (wie GSH (L-glutathione), GSHPx (Glutathion Peroxidase), MDA (Malondialdehyd)) und auf HSP (HSP 27,40,60,70 und 90).

Die Leber besteht aus Leberläppchen. Jedes Läppchen enthält Hepatozyten, Sinusoide und eine Zentralvene. Die Sinusoide verlaufen speichenförmig durch das Läppchen auf die Zentralvene zu. Die Zentralvene umgeben wenige Kollagenfasern. Zwischen den Sinusoiden liegen in Platten angeordnete Hepatozyten. Sie erscheinen als radiär ausgerichtete Leberzell-Bälkchen. Das Blut durchströmt die Sinusoide, kommt mit den Hepatozyten in Kontakt und der Stoffaustausch wird dadurch ermöglicht (Lüllmann-Rauch 2012). Die Autoren untersuchten bei Selen-defizienten Hennen histologische Veränderungen der Leber. Es fiel auf, dass sich Entzündungszellen histologisch zunächst nur vereinzelt ansammelten und mit zunehmendem Alter der Tiere Entzündungszellen das Gewebe immer stärker infiltrierten. Leberzellbänkchen waren irregulär angeordnet und die Zellkerne verändert (pyknotisch geschrumpft, das Chromatin war verdickt). Mit zunehmendem Alter der Tiere und mit anhaltender

Mangelernährung wurden auch die Hepatozyten nekrotisch. Die Autoren schlossen aus ihren Beobachtungen, dass Selenmangel die Infiltration von Entzündungszellen fördert, die zu oxidativen Stress führen. Das Lebergewebe wird geschädigt, was sich mit fortschreitendem Alter verstärkt. Die Aktivität der antioxidativen Enzyme wurde ebenfalls untersucht. Eine signifikant verminderte Aktivität der GSH-PX wurde festgestellt in der Selenmangelnahrungs- Gruppe ab Tag 25-65. Ein signifikantes Abfallen der GSH Aktivität wurde ebenfalls ab Tag 35-65 beobachtet. Die MDA-Aktivität stieg ab Tag 25 signifikant an. Eine mRNA Analyse von HSP70 der Leber ergab am Tag 35 einen steilen signifikanten Anstieg der HSP70 mRNA Konzentration (Liu et al. 2015). Diese Forschungsgruppe erhielt keine signifikanten Ergebnisse über die Westernblot-Analyse von HSP 70; über die mRNA- Analyse und die histologische Begutachtung erwiesen sich die Resultate als signifikant. In der vorliegenden Arbeit wurde über die DHE Färbung ein Trend über vermehrten oxidativen Stress ersichtlich.

4.1.7 Forschungsergebnisse Selenmangel bei Hühnern in der Niere

Dongbo et al. untersuchte bei Hühnern unter Selenmangel die Nierenfunktion. Die höchste Selen-Konzentration von allen Organen enthält die Niere. Selen reduziert den toxischen Schaden und schützt dadurch die Nieren. Es erhöht die glomeruläre Filtrationsrate und schwächt die Entzündung ab. 180 Hühner wurden in zwei Gruppen untersucht. Die Kontrollgruppe erhielt 0,15mg/kg Selen, die Selenmangel-Gruppe 0,033 mg/kg Selen. Die Hühner wurden nach 15, 25, 35, 45, 55, und 65 Tagen getötet. Die Studiengruppe untersuchte Nierenfunktionsindices (Kreatinin, Harnsäure), Nieren-Antioxidativ-Funktions-Indizes (GPx, Anti-Hydroxyl-Radikal, Katalase, H₂O₂, Stickstoffmonoxid, Glutathion, Malonyldialdehyd). Weiterhin wurden Indices gemessen, die auf eine Organ/Gewebe Verletzung deuten (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und Hämoxygenase). iNOS ist eine Isoform der Stickstoffmonoxid Synthase Familie. Unter pathologischen Umständen wird es vermehrt exprimiert. Dieses Enzym bildet vermehrt eine große Menge an Stickstoff, der DNA- Schäden hervorruft (Sun et al. 2015). Die Arbeitsgruppe Prabhu et al. konnte bei Makrophagen unter Selenmangel eine erhöhte Expression an iNOS nachweisen (Prabhu et al. 2002). Auch die Arbeitsgruppe Sun et al. fand, dass unter Selenmangel die Konzentration an iNOS in der Niere bei Hühnern signifikant ansteigt. Dadurch ist

vermehrt Stickstoff vorhanden, der oxidativen Stress in der Niere verursacht. Oxidativer Stress wurde in der vorliegenden Arbeit über DHE-Färbung gemessen. Als signifikant erweist sich, dass Selenmangel bei den 6 Monate alten Tieren einen erhöhten oxidativen Stress gegenüber der Kontrollgruppe verursachte. In der oben erwähnten Studie (Sun et al. 2015) zeigte die Analyse von HO-1 in der Niere eine eher steigende Tendenz. Diesen Trend konnte die vorliegende Arbeit nicht bestätigen. Der Vergleich junger mit älteren Ratten ergibt, dass bei dem durch Selenmangel verursachten oxidativen Stress in jungen Ratten die HO-1 stärker ansteigt als bei den älteren Tieren. Diese Ergebnisse entsprechen der Arbeit von Bloomer, der als Stressfaktor Hitze nutzte (Bloomer et al. 2009).

4.1.8 Mögliche fortführende Arbeiten

Die vorliegende Arbeit untersucht die Protein-Konzentration von Hsp70 und HO-1. Diese Proteine werden typisch bei vermehrtem oxidativen Stress in Leber, Niere und in anderen Organen gebildet. Bloomer fand u.a. heraus, dass bei älteren Tieren die HO-1 Konzentration bei Hitzestress weniger ansteigt als bei jüngeren Tieren (Bloomer et al. 2009). Tendenziell zeigte sich dieses Ergebnis auch in der vorliegenden Arbeit. Offen ist, ob eine verminderte mRNA Konzentration von HSP70/HO-1 bei älteren Tieren verglichen mit jüngeren Tieren nachweisbar ist oder ob bei beiden Gruppen die gleiche Konzentration vorliegt. Es ist nicht klar, wo auf dem Weg von der DNA über mRNA bis zum fertigen Protein die Ursache für den Konzentrationsabfall an Hitzeschockproteinen bei älteren Tieren liegt. Dies könnte weiter Aufschluss geben z.B. über eine etwaige verminderte Reparaturfunktion von Zellen im Alter. Solche Analysen würden einen Beitrag zur Klärung der Mechanismen von Alterungsprozessen leisten. So könnte es durchaus sein, dass dem Spurenelement Selen eine Bedeutung zukommt, die über die Funktion hinausgeht, oxidativen Stress zu vermindern.

Literaturverzeichnis

- Adam-Vizi, Vera (2005): Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. In: *Antioxidants & redox signaling* 7 (9-10), S. 1140–1149. DOI: 10.1089/ars.2005.7.1140.
- Arthur, J. R. (2001): The glutathione peroxidases. In: *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 57 (13), S. 1825–1835. DOI: 10.1007/PL00000664.
- Asea, A.; Kraeft, S. K.; Kurt-Jones, E. A.; Stevenson, M. A.; Chen, L. B.; Finberg, R. W. et al. (2000): HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. In: *Nature medicine* 6 (4), S. 435–442. DOI: 10.1038/74697.
- Barceloux, D. G. (1999): Selenium. In: *Journal of toxicology. Clinical toxicology* 37 (2), S. 145–172.
- Bauer, Michael; Bauer, Inge (2002): Heme oxygenase-1: redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress. In: *Antioxidants & redox signaling* 4 (5), S. 749–758. DOI: 10.1089/152308602760598891.
- Behne, D.; Hofer, T.; Berswordt-Wallrabe, R. von; Elger, W. (1982): Selenium in the testis of the rat: studies on its regulation and its importance for the organism. In: *The Journal of nutrition* 112 (9), S. 1682–1687.
- Bloomer, Steven A.; Zhang, Hannah J.; Brown, Kyle E.; Kregel, Kevin C. (2009): Differential regulation of hepatic heme oxygenase-1 protein with aging and heat stress. In: *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 64 (4), S. 419–425. DOI: 10.1093/gerona/gln056.
- Bramley, P. M.; Elmadfa, I.; Kafatos, A.; Kelly, F. J.; Manios, Y.; Roxborough, H. E. et al. (2000): Vitamin E. In: *J. Sci. Food Agric.* 80 (7), S. 913–938. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<913::AID-JSFA600>3.0.CO;2-3.
- Bravo, Paco E.; Morse, Stephen; Borne, David M.; Aguilar, Erwin A.; Reisin, Efrain (2006): Leptin and Hypertension in Obesity. In: *Vascular Health and Risk Management* 2 (2), S. 163–169. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1993994/>.
- Brigelius-Flohe, R.; Traber, M. G. (1999): Vitamin E: function and metabolism. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13 (10), S. 1145–1155.
- Burk, Raymond F. (2002): Selenium, an Antioxidant Nutrient. In: *Nutrition in Clinical Care* 5 (2), S. 75–79. DOI: 10.1046/j.1523-5408.2002.00006.x.
- Cem Ekmekcioglu, Wolfgang Marktl (2006): Essentielle Spurenelemente. Klinik und Ernährungsmedizin. Wien: Springer Verlag. Online verfügbar unter https://books.google.de/books?id=fJxmBJzlgRE&printsec=frontcover&dq=Essentielle+Spurenelemente:+Klinik+und+Ern%C3%A4hrungsmedizin&hl=de&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=Essentielle%20Spurenelemente%3A%20Klinik%20und%20Ern%C3%A4hrungsmedizin&f=false, zuletzt geprüft am 07.08.2016.

- Craig, Elizabeth A.; Gross, Carol A. (1991): Is hsp70 the cellular thermometer? In: *Trends in Biochemical Sciences* 16 (0), S. 135–140. DOI: 10.1016/0968-0004(91)90055-Z.
- Davies, K. J. (1995): Oxidative stress: the paradox of aerobic life. In: *Biochemical Society symposium* 61, S. 1–31.
- Enrique Cadenas and Lester Packer (Hg.) (2008): *Methods in Enzymology : Nitric Oxide, Part G Oxidative and Nitrosative Stress in Redox Regulation of Cell Signaling*: Academic Press.
- Ferenbach, David A.; Nkejabega, Noemie C J; McKay, Jennifer; Choudhary, Abhijeet K.; Vernon, Madeleine A.; Beesley, Matthew F. et al. (2011): The induction of macrophage hemoxygenase-1 is protective during acute kidney injury in aging mice. In: *Kidney international* 79 (9), S. 966–976. DOI: 10.1038/ki.2010.535.
- Finkel, Toren; Holbrook, Nikki J. (2000): Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. In: *Nature* 408 (6809), S. 239–247. DOI: 10.1038/35041687.
- Fisinin, Vladimir I.; Papazyan, Tigran T.; Surai, Peter F. (2009): Producing selenium-enriched eggs and meat to improve the selenium status of the general population. In: *Critical reviews in biotechnology* 29 (1), S. 18–28. DOI: 10.1080/07388550802658030.
- Flohé, Leopold (2007): Selenium in mammalian spermiogenesis. In: *Biological Chemistry* 388 (10). DOI: 10.1515/BC.2007.112.
- Fordyce, Fiona M. (2013): Selenium Deficiency and Toxicity in the Environment. In: Olle Selinus (Hg.): *Essentials of Medical Geology: Revised Edition*. Dordrecht: Springer Netherlands, S. 375–416. Online verfügbar unter http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-4375-5_16.
- Georgopoulos, Costa; Welch, W. J. (1993): Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. In: *Annual review of cell biology* 9 (1), S. 601–634.
- Gissel-Nielsen, Gunnar. (1971): Influence of pH and texture of the soil on plant uptake of added selenium. In: *J. Agric. Food Chem.* 19 (6), S. 1165–1167. DOI: 10.1021/jf60178a030.
- Gong, Pengfei; Cederbaum, Arthur I.; Nieto, Natalia (2004): Heme oxygenase-1 protects HepG2 cells against cytochrome P450 2E1-dependent toxicity. In: *Free Radical Biology and Medicine* 36 (3), S. 307–318. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.10.017.
- Hall, D. M.; Xu, L.; Drake, V. J.; Oberley, L. W.; Oberley, T. D.; Moseley, P. L.; Kregel, K. C. (2000): Aging reduces adaptive capacity and stress protein expression in the liver after heat stress. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 89 (2), S. 749–759.
- Hightower, Lawrence E. (1991): Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. In: *Cell* 66 (2), S. 191–197. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90611-2.
- Hoeijmakers, Jan H. J. (2001): Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. In: *Nature* 411 (6835), S. 366–374. DOI: 10.1038/35077232.

- Iglesias, Pedro; Selgas, Rafael; Romero, Sara; Díez, Juan J. (2013): Selenium and kidney disease. In: *Journal of nephrology* 26 (2), S. 266–272. DOI: 10.5301/jn.5000213.
- Jais, Alexander; Einwallner, Elisa; Sharif, Omar; Gossens, Klaus; Lu, Tess Tsai-Hsiu; Soyol, Selma M. et al. (2014): Heme Oxygenase-1 Drives Metaflammation and Insulin Resistance in Mouse and Man. In: *Cell* 158 (1), S. 25–40. DOI: 10.1016/j.cell.2014.04.043..
- Johnsson, Lars (1991): Selenium uptake by plants as a function of soil type, organic matter content and pH. In: *Plant Soil* 133 (1), S. 57–64. DOI: 10.1007/BF00011899.
- Kaushal, Naveen; Bansal, M. P. (2009): Diminished reproductive potential of male mice in response to selenium-induced oxidative stress: Involvement of HSP70, HSP70-2, and MSJ-1. In: *Journal of biochemical and molecular toxicology* 23 (2), S. 125–136.
- Keyse, S. M.; Tyrrell, R. M. (1989): Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (1), S. 99–103. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC286411/>.
- Kirkinezos, Ilias G.; Moraes, Carlos T. (Hg.) (2001): Reactive oxygen species and mitochondrial diseases: Elsevier (12).
- Kohen, Ron; Nyska, Abraham (2002): Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. In: *Toxicologic Pathology* 30 (6), S. 620–650. DOI: 10.1080/01926230290166724.
- Kregel, K. C.; Moseley, P. L.; Skidmore, R.; Gutierrez, J. A.; Guerriero, V., JR (1995): HSP70 accumulation in tissues of heat-stressed rats is blunted with advancing age. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 79 (5), S. 1673–1678.
- Kruger, NicholasJ. (1994): The Bradford Method for Protein Quantitation. In: JohnM Walker (Hg.): *Basic Protein and Peptide Protocols*, Bd. 32: Humana Press (Methods in Molecular Biology™), S. 9-15. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1385/0-89603-268-X%3A9>.
- Kühn, Hartmut; Borchert, Astrid (2002): Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes1. In: *Free Radical Biology and Medicine* 33 (2), S. 154–172. DOI: 10.1016/S0891-5849(02)00855-9.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.
- Laurindo, Francisco R.M.; Fernandes, Denise C.; Santos, Célio X.C. (2008): Assessment of Superoxide Production and NADPH Oxidase Activity by HPLC Analysis of Dihydroethidium Oxidation Products. In: *Nitric Oxide, Part G Oxidative and Nitrosative Stress in Redox Regulation of Cell Signaling*, Bd. 441: Elsevier (Methods in Enzymology), S. 237–260.
- Lavrovsky, Yan; Song, Chung S.; Chatterjee, Bandana; Roy, Arun K. (2000): Age-dependent increase of heme oxygenase–1 gene expression in the liver mediated by

- NFκB. In: *Mechanisms of Ageing and Development* 114 (1), S. 49–60. DOI: 10.1016/S0047-6374(00)00087-7.
- Lee, C. (1999): Gene Expression Profile of Aging and Its Retardation by Caloric Restriction. In: *Science* 285 (5432), S. 1390–1393. DOI: 10.1126/science.285.5432.1390.
- Levander, O. A. (1987): A global view of human selenium nutrition. In: *Annual review of nutrition* 7 (1), S. 227–250.
- Lindquist, S.; Craig, E. A. (1988): The heat-shock proteins. In: *Annual review of genetics* 22 (1), S. 631–677.
- Liu, C. P.; Fu, J.; Xu, F. P.; Wang, X. S.; Li, S. (2015): The role of heat shock proteins in oxidative stress damage induced by Se deficiency in chicken livers. In: *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 28 (1), S. 163–173. DOI: 10.1007/s10534-014-9812-x.
- Liu, Tuoen; Daniels, Christopher K.; Cao, Shousong (2012): Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. In: *Pharmacology & Therapeutics* 136 (3), S. 354–374. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2012.08.014.
- Lobo, Vijaya; Patil, Avinash; Phatak, A.; Chandra, Naresh (2010): Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. In: *Pharmacognosy reviews* 4 (8), S. 118.
- Loeb L A: Apurinic Sites as Mutagenic Intermediates. In: *Cell* (40), S. 483–484, zuletzt geprüft am 20.04.2015.
- Lüllmann-Rauch, Renate (2012): Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tabellen. 4., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Maines, M. D. (1997): The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. In: *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37, S. 517–554. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.37.1.517.
- Maiorino, M.; Ursini, F. (2002): Oxidative Stress, Spermatogenesis and Fertility. In: *Biological Chemistry* 383 (3-4). DOI: 10.1515/BC.2002.061.
- Mary Johnson (2014): Loading Controls for Western Blots. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.13070/mm.en.2.114>, zuletzt aktualisiert am 04.11.2014.
- McDonald, RuthJ.; Pan, LesterC.; St. George, JudithA.; Hyde, DallasM.; Ducore, JonathanM. (1993): Hydrogen peroxide induces DNA single strand breaks in respiratory epithelial cells. In: *Inflammation* 17 (6), S. 715-722. DOI: 10.1007/BF00920476.
- Michiels, Carine; Raes, Martine; Toussaint, Olivier; Remacle, José (1994): Importance of SE-glutathione peroxidase, catalase, and CU/ZN-SOD for cell survival against oxidative stress. In: *Free Radical Biology and Medicine* 17 (3), S. 235–248. DOI: 10.1016/0891-5849(94)90079-5.
- Modesti, Mauro; Kanaar, Roland (2001): DNA repair: Spot(light)s on chromatin. In: *Current Biology* 11 (6), S. R229. DOI: 10.1016/S0960-9822(01)00112-9.

- Nath, K. A. (2006): Heme oxygenase-1: a provenance for cytoprotective pathways in the kidney and other tissues. In: *Kidney international* 70 (3), S. 432–443. DOI: 10.1038/sj.ki.5001565.
- Nath, K. A.; Balla, G.; Vercellotti, G. M.; Balla, J.; Jacob, H. S.; Levitt, M. D.; Rosenberg, M. E. (1992): Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. In: *Journal of Clinical Investigation* 90 (1), S. 267–270. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC443091/>.
- Peng, DunFa; Hu, TianLing; Soutto, Mohammed; Belkhir, Abbas; Zaika, Alexander; El-Rifai, Wael (2014): Glutathione peroxidase 7 has potential tumour suppressor functions that are silenced by location-specific methylation in oesophageal adenocarcinoma. In: *Gut* 63 (4), S. 540–551. DOI: 10.1136/gutjnl-2013-304612.
- Piechotowski, I.; Weidner, U.; Zöllner, I.; Gabrio, T.; Link, B.; Schwenk, M. (2002): Serumselenkonzentrationen bei Schulkindern in Baden-Württemberg und ihre gesundheitliche Bewertung. In: *Gesundheitswesen* 64 (11), S. 602–607. DOI: 10.1055/s-2002-35540.
- Prabhu, K. Sandeep; Zamamiri-Davis, Faith; Stewart, Jennifer B.; Thompson, Jerry T.; Sordillo, Lorraine M.; Reddy, C. Channa (2002): Selenium deficiency increases the expression of inducible nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages: role of nuclear factor-kappaB in up-regulation. In: *The Biochemical journal* 366 (Pt 1), S. 203–209. DOI: 10.1042/BJ20020256.
- Ramming, Thomas; Hansen, Henning G.; Nagata, Kazuhiro; Ellgaard, Lars; Appenzeller-Herzog, Christian (2014): GPx8 peroxidase prevents leakage of H₂O₂ from the endoplasmic reticulum. In: *Free Radical Biology and Medicine* 70, S. 106–116. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.018.
- Rayman, M. P. (2000): The importance of selenium to human health. In: *Lancet (London, England)* 356 (9225), S. 233–241. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)02490-9.
- Rayman, Margaret P. (2008): Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. In: *The British journal of nutrition* 100 (2), S. 254–268. DOI: 10.1017/S0007114508939830.
- Rhee, S. G. (1999): Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. In: *Experimental & molecular medicine* 31 (2), S. 53–59. DOI: 10.1038/emmm.1999.9.
- Rimm, E. B.; Stampfer, M. J.; Ascherio, A.; Giovannucci, E.; Colditz, G. A.; Willett, W. C. (1993): Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. In: *The New England journal of medicine* 328 (20), S. 1450–1456. DOI: 10.1056/NEJM199305203282004..
- Ritossa, F. (1962): A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. In: *Experientia* 18 (12), S. 571–573. DOI: 10.1007/BF02172188.
- Rogakou, E. P.; Pilch, D. R.; Orr, A. H.; Ivanova, V. S.; Bonner, W. M. (1998): DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (10), S. 5858–5868.
- Roman, Marco; Jitaru, Petru; Barbante, Carlo (2014): Selenium biochemistry and its role for human health. In: *Metallomics : integrated biometal science* 6 (1), S. 25–54. DOI: 10.1039/c3mt00185g.

- Saito, Yoshiro; Yoshida, Yasukazu; Akazawa, Takashi; Takahashi, Kazuhiko; Niki, Etsuo (2003): Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (41), S. 39428–39434. DOI: 10.1074/jbc.M305542200.
- Sauer, H.; Wartenberg, M.; Hescheler, J. (2001): Reactive Oxygen Species as Intracellular Messengers During Cell Growth and Differentiation. In: *Cell Physiol Biochem* 11 (4), S. 173–186. Online verfügbar unter <http://www.karger.com/DOI/10.1159/000047804>.
- Schmitt, Roland; Cantley, Lloyd G. (2008): The impact of aging on kidney repair. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 294 (6), S. F1265-72. DOI: 10.1152/ajprenal.00543.2007.
- Schneider, Claus (2005): Chemistry and biology of vitamin E. In: *Molecular nutrition & food research* 49 (1), S. 7–30. DOI: 10.1002/mnfr.200400049.
- Schneider, Manuela; Forster, Heidi; Boersma, Auke; Seiler, Alexander; Wehnes, Helga; Sinowatz, Fred et al. (2009): Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (9), S. 3233–3242. DOI: 10.1096/fj.09-132795.
- Selen in der Umweltmedizin (2006). In: *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 49 (1), S. 88–101.
- Semenkovich, Clay F. (2006): Insulin resistance and atherosclerosis. In: *The Journal of clinical investigation* 116 (7), S. 1813–1822. DOI: 10.1172/JCI29024.
- Shibahara, S.; Muller, R. M.; Taguchi, H. (1987): Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. In: *J Biol Chem* 262 (27), S. 12889–12892.
- Siems WG, Sommerburg O, Mayer H, Grune T (1998): Die wichtigsten Radikalquellen im menschlichen Organismus (143), S. 1515–1527. Online verfügbar unter http://books.google.de/books?hl=de&lr=&id=uuTM08DfPnoC&oi=fnd&pg=PA43&dq=siems+Die+wichtigsten+Radikalquellen+im+menschlichen+Organismus&ots=Kd0k6VWu_f&sig=y7tY5k7rex2QZ6-Pb4PfKkccJMU, zuletzt geprüft am 05.05.2015.
- Sies, H. (1997): Oxidative stress: oxidants and antioxidants. In: *Exp Physiol* 82 (2), S. 291–295. DOI: 10.1113/expphysiol.1997.sp004024.
- Sikorski, Eric M.; Hock, Thomas; Hill-Kapturczak, Nathalie; Agarwal, Anupam (2004): The story so far: Molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 286 (3), S. F425-41. DOI: 10.1152/ajprenal.00297.2003.
- Singh, Narendra P.; McCoy, Michael T.; Tice, Raymond R.; Schneider, Edward L. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. In: *Experimental Cell Research* 175 (1), S. 184–191. DOI: 10.1016/0014-4827(88)90265-0.
- Sun, Dongbo; Li, Chunqiu; Gao, Jing; Li, Shu; Wang, Hongbin (2015): Effects of selenium deficiency on principal indexes of chicken kidney function. In: *Biological trace element research* 164 (1), S. 58–63. DOI: 10.1007/s12011-014-0196-0.
- Thomson, C. D.; Robinson, M. F.; Butler, J. A.; Whanger, P. D. (1993): Long-term supplementation with selenate and selenomethionine: selenium and glutathione

peroxidase (EC 1.11.1.9) in blood components of New Zealand women. In: *The British journal of nutrition* 69 (2), S. 577–588.

Thuluvath, P. J.; Triger, D. R. (1992): Selenium in chronic liver disease. In: *Journal of Hepatology* 14 (2–3), S. 176–182. DOI: 10.1016/0168-8278(92)90155-I.

Tissiéres, Alfred; Mitchell, Herschel K.; Tracy, Ursula M. (1974): Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. In: *Journal of Molecular Biology* 84 (3), S. 389–398. DOI: 10.1016/0022-2836(74)90447-1.

Trakshel, G. M.; Kutty, R. K.; Maines, M. D. (1986): Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase. The noninducible isoform. In: *Journal of Biological Chemistry* 261 (24), S. 11131–11137.

Tsukahara, Fujiko; Yoshioka, Toshimasa; Muraki, Takamura (2000): Molecular and Functional Characterization of HSC54, a Novel Variant of Human Heat-Shock Cognate Protein 70. In: *Molecular Pharmacology* 58 (6), S. 1257–1263. DOI: 10.1124/mol.58.6.1257.

van Attikum, Haico; Gasser, Susan M. (2005): The histone code at DNA breaks: a guide to repair? In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (10), S. 757–765. DOI: 10.1038/nrm1737.

van Dael, Peter; Davidsson, Lena; Ziegler, Ekhard E.; Fay, Laurent B.; Barclay, Denis (2002): Comparison of selenite and selenate apparent absorption and retention in infants using stable isotope methodology. In: *Pediatric research* 51 (1), S. 71–75. DOI: 10.1203/00006450-200201000-00013.

Vile, G. F.; Basu-Modak, S.; Waltner, C.; Tyrrell, R. M. (1994): Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (7), S. 2607–2610.

Vinceti, M.; Wei, E. T.; Malagoli, C.; Bergomi, M.; Vivoli, G. (2001): Adverse health effects of selenium in humans. In: *Reviews on environmental health* 16 (4), S. 233–251.

Anhang

Leber HO-1

HO-1 Leber						
07.01.15						
Gel 3						
	HO-1		beta Actin		HO-1/Beta Actin	HO-1/Beta Actin
	absolut	normiert	absolut	normiert		normiert
Leber 5A	kein Signal		1767,134			
Leber 5B	8552,317	1,037	7103,075	0,68569622	1,204	1,512
Leber 5D	10838,196	1,314	7102,418	0,68563279	1,526	1,916
Leber 25A	4331,497	0,525	8675,539	0,83749422	0,499	0,627
Leber 25C	10244,782	1,242	6290,075	0,60721316	1,629	2,045
Leber 25B	13639,024	1,653	9226,075	0,89064028	1,478	1,856
Leber 25E	13444,024	1,630	7846,640	0,75747636	1,713	2,152
Leber 25D	4925,033	0,597	7469,933	0,72111109	0,659	0,828
gemischt	8248,811	1,000	10358,924	1	0,796	1,000
14.01.15						
Gel 1						
	HO-1		beta Actin		HO-1/Beta Actin	HO-1/Beta Actin
	absolut	normiert	absolut	normiert		normiert
Leber 5A	kein Signal		10405,024			
Leber 5B	6220669	8,382	13785,045	0,9544771	0,451	8,782
Leber 5D	5180255	6,980	12110,016	0,83849802	0,428	8,325
Leber 5E	3912719	5,272	11116,823	0,76972929	0,352	6,850
Leber 25A	176092	0,237	13247,823	0,91727982	0,013	0,259
Leber 25 D	629799	0,849	11437,681	0,79194551	0,055	1,072
Leber 25 E	3884255	5,234	8293,610	0,57424991	0,468	9,115
gemischt	742113	1,000	14442,510	1	0,051	1,000
Leber 25B	1906770	2,569	5.362,78	0,37131925	0,356	6,920
19.01.15						
Gel 1						
	HSP70		beta Actin		HSP70/Beta Actin	HSP70/Beta Actin
	absolut	normiert	absolut	normiert		normiert
Leber 26A	2.293.941	0,374	24.872.087	1,17576078	0,092	0,318
Leber 26D	4.342.861	0,707	25.497.208	1,20531169	0,170	0,587
Leber 26 C	17.825.057	2,904	22.522.966	1,06471242	0,791	2,727
Leber 26B	1.383.598	0,225	22.057.945	1,04272981	0,063	0,216
Leber 26E	518.820	0,085	22.777.581	1,07674866	0,023	0,078
Leber 6C	16.965.543	2,764	21.532.702	1,01790037	0,788	2,715
Leber 6D	17.836.635	2,906	18.796.196	0,88853943	0,949	3,270
Leber 6E	16.249.978	2,647	20.159.803	0,95300027	0,806	2,778
gemsicht	6.138.811	1	21.154.037	1	0,290	1,000

Leber HSP70

HSP 70 Leber						
15.12.14						
Gel 1						
	HSP70		beta Actin		HSP70/Beta Actin	HSP70/Beta Actin
	absolut	normiert	absolut	normiert		normiert
gemischt	13682,731	1	14395,338	1,000	0,950	1,000
Leber 5A	9422,690	0,68865565	4019,912	0,279	2,344	2,466
Leber 5B	12853,317	0,93938242	11617,782	0,807	1,106	1,164
Leber 5D	13369,439	0,97710311	10590,731	0,736	1,262	1,328
Leber 5E	13739,146	1,00412308	11245,953	0,781	1,222	1,285
Leber 25A	13962,903	1,02047632	15836,610	1,100	0,882	0,928
Leber 25B	11104,518	0,81157175	13182,045	0,916	0,842	0,886
Leber 25D	11944,246	0,87294313	17254,974	1,199	0,692	0,728
Leber 25E	17450,681	1,27537997	13186,832	0,916	1,323	1,392
Gel 2						
	HSP70		beta Actin		HSP70/Beta Actin	HSP70/Beta Actin
	absolut	normiert	absolut	normiert		normiert
Leber 6B	11797,589	1,47303152	11423,832	0,913	1,033	1,614
Leber 6D	11932,882	1,48992403	11448,246	0,915	1,042	1,629
Leber 6E	12146,882	1,51664379	11105,468	0,887	1,094	1,709
Leber 26C	9428,104	1,17718073	7596,397	0,607	1,241	1,940
Leber 26E	9845,518	1,22929849	9643,468	0,770	1,021	1,596
gemischt	8009,054	1	12516,974	1,000	0,640	1,000
11.12.14						
Gel 2						
	HSP70		beta Actin		HSP70/Beta Actin	
	absolut	%	absolut	%		
Leber 5A	13230,903	10,933	3682,669	4,638	3,593	
Leber 5B	13965,368	11,540	7307,175	9,204	1,911	
Leber 5E	13922,196	11,505	10950,125	13,792	1,271	
Leber 5D	11149,468	9,213	8106,832	10,211	1,375	
Leber 25B	12192,054	10,075	15752,024	19,840	0,774	
Leber 25A	12637,397	10,443	15634,924	19,693	0,808	
Leber 25C	13127,326	10,848	14092,731	17,750	0,931	
Leber 25D	11697,811	9,666	3868,154	4,872	3,024	
gemischt	19091,782	15,776	Bande nicht gekommen			

06.01.15						
Gel 3						
	HSP70		beta Actin		HSP70/Beta Actin	HSP70/Beta Actin
	absolut	normiert	absolut	normiert		normiert
Leber 6A	9271,459		4982,175	8,325	1,861	0,857
Leber 6B	15490,309		6529,146	10,909	2,372	1,093
Leber 6D	19039,430		7992,581	13,354	2,382	1,098
Leber 6E	20164,380		4661,317	7,788	4,326	1,993
Leber 26A	16708,945		6504,903	10,869	2,569	1,184
Leber 26B	17331,652		4247,225	7,097	4,081	1,880
Leber 26C	15787,652		5260,397	8,789	3,001	1,383
Leber 26E	18163,744		8082,388	13,505	2,247	1,036
gemischt	25150,874		11589,279	19,364	2,170	1,000
20.01.15						
Gel 2						
	HSP70		beta Actin		HSP70/Beta Actin	HSP70/Beta Actin
	absolut	normiert	absolut	normiert		normiert
Leber 25B	10.650.104	0,99123598	9.167.711	0,50643093	1,161697178	1,957297465
Leber 25D	11.312.882	1,05292264	6.952.024	0,38403479	1,627278905	2,741737635
Leber 5D	15.110.903	1,40641544	7.320.539	0,40439182	2,064179017	3,477853294
Leber 5E	13.049.832	1,2145856	4.331.226	0,23926003	3,01296492	5,076425002
Leber 6E	11.345.711	1,05597813	8.990.388	0,49663548	1,261982353	2,126263975
Leber 6D	10.064.225	0,93670652	10.108.075	0,55837731	0,995661884	1,677551188
Leber 26D	11.029.347	1,02653322	9.153.589	0,50565082	1,204920496	2,030122718
Leber 26E	9.670.154	0,9000292	8.939.832	0,49384273	1,081693034	1,822501658
gemischt	10.744.267	1	18.102.589	1	0,593521015	1

Leber DHE Färbung

DHE SE-Def. Leber									
		alte Lampe				neue Lampe			
		original		normiert				original	
Kontroll - gruppe	5A					5A	60,670		
	5B	29,003		62,198		5B			
	5C					5C			
	5D	37,468		80,351		5D			
	5E	36,072		77,357		5E			
	6A					6A	42,621		
	6B					6B	32,771		
	6C					6C	69,454		
	6D					6D	68,018		
		Mittelwert	StAbW	Mittelwert	StAbW		Mittelwert	StAbW	
		30,465	6,632	65,333	14,223		65,333	21,207	
Selen- Def.- Nahrung	25A	43,124		76,259		25A			
	25B	48,966		86,590		25B			
	25C	45,895		81,159		25C			
	25D					25D	81,759		
	25E					25E	55,487		
	26A					26A	133,713		
	26B	51,018		90,218		26B			
	26C					26C			
	26D					26D	52,695		
	26E					26E	94,129		
			Mittelwert	StAbW	Mittelwert	StAbW		Mittelwert	StAbW
		47,251	3,464	83,557	6,126		83,557	33,057	

Niere HO-1

HO-1 Niere						
07.01.15						
Gel 1						
	HO-1		beta Actin		HO-1/Beta Actin	HO-1/Beta Actin
	absolut	normiert	absolut	normiert		normiert
Niere 5A	8.781,276	0,553	22.580,430	1,228	0,389	0,451
Niere 5B	20.753,459	1,308	34.848,924	1,894	0,596	0,690
Niere 5D	11.100,640	0,700	30.728,409	1,67	0,361	0,419
Niere 25A	22.243,510	1,402	27.273,894	1,483	0,816	0,946
Niere 25B	14.203,811	0,895	29.888,187	1,625	0,475	0,551
Niere 25C	4.066,184	0,256	32.229,288	1,752	0,126	0,146
Niere 25D	8.392,790	0,529	23.924,066	1,301	0,351	0,407
Niere 25E	1.074,113	0,068	9.000,610	0,489	0,119	0,138
gemischt	15.867,075	1,000	18.395,116	1	0,863	1,000
Gel 2						
	HO-1		beta Actin		HO-1/Beta Actin	HO-1/Beta Actin
	absolut	normiert	absolut	normiert		normiert
Leber 5A	5.364,841	1,279	6.149,924	0,733	0,872	1,745
Leber 5B	8.457,861	2,016	15.877,581	1,891	0,533	1,066
Leber 5D	10.366,447	2,471	18.472,338	2,2	0,561	1,123
Leber 5E	12.260,640	2,922	15.418,409	1,837	0,795	1,591
Leber 25A	6.351,255	1,514	14.371,631	1,712	0,442	0,884
Leber 25 D	1.797,991	0,429	13.067,752	1,557	0,138	0,275
Leber 25 E	1.818,284	0,433	15.719,681	1,873	0,116	0,231
gemischt	1.537,698	0,366	16.514,439	1,967	0,093	0,186
Leber 25B	4.195,891	1	8.394,832	1	0,5	1,000
20.01.15						
Gel 1						
	HSP70		beta Actin		HSP70/Beta Actin	HSP70/Beta Actin
	absolut	normiert	absolut	normiert		normiert
Niere 26B	1.192,477	0,186	7.050,602	0,955	0,169	0,195
Niere 26C	2.334,770	0,365	6.369,530	0,863	0,367	0,422
Niere 26D	1.959,234	0,306	5.951,338	0,806	0,329	0,379
Niere 26 E	1.924,355	0,301	6.011,610	0,815	0,320	0,369
Niere 6D	11.075,045	1,730	5.488,681	0,744	2,018	2,325
Niere 6B	10.213,388	1,595	4.632,974	0,628	2,204	2,541
Niere 6C	11.518,045	1,799	4.144,246	0,562	2,779	3,203
Niere 6E	8.839,560	1,380	4.978,146	0,675	1,776	2,046
gemischt	6.403,205	1	7.379,468	1	0,868	1,000

Niere HSP70

HSP 70 Niere						
02.12.14						
Gel 1						
	HSP70		beta Actin		HSP70/Beta Actin	HSP70/Beta Actin
	absolut	normiert	absolut	normiert		normiert
Niere 5D	20596,238	0,922	14825,317	0,75946915	1,389	1,215
Niere 5B	22532,581	1,009	16562,610	0,84846694	1,360	1,189
Niere 5A	21225,581	0,951	12231,882	0,62661304	1,735	1,517
Niere 25A	18319,359	0,820	10449,468	0,5353038	1,753	1,533
Niere 25B	18274,773	0,818	9865,054	0,50536553	1,852	1,620
Niere 25C	21023,945	0,942	10666,054	0,54639904	1,971	1,723
Niere 25D	21377,874	0,957	11301,589	0,57895613	1,892	1,654
Niere 25E	20758,530	0,930	16337,388	0,8369293	1,271	1,111
gemischt	22327,581	1,000	19520,631	1	1,144	1,000
Gel 2						
	HSP70		beta Actin		HSP70/Beta Actin	HSP70/Beta Actin
	absolut	normiert	absolut	normiert		normiert
Niere 6A	7388,447	1,651	17154,439	1,26768725	0,431	1,302
Niere 6B	13003,075	2,905	16742,317	1,23723206	0,777	2,348
Niere 6C	21275,974	4,754	15673,853	1,15827417	1,357	4,104
Niere 6D	14431,246	3,225	15406,610	1,13852532	0,937	2,832
Niere 26A	14717,317	3,288	16570,731	1,22455211	0,888	2,685
Niere 26B	14856,560	3,320	18408,974	1,3603955	0,807	2,440
Niere 26C	8729,075	1,950	16195,903	1,19685288	0,539	1,630
Niere 26D	3838,326	0,858	14962,317	1,10569273	0,257	0,776
gemischt	4475,397	1,000	13532,075	1	0,331	1,000
06.01.15						
Gel 1						
	HSP70		beta Actin		HSP70/Beta Actin	HSP70/Beta Actin
	absolut	normiert	absolut	normiert		normiert
Niere 6A	11689,217	1,386	5706,062	0,80793249	2,049	1,715
Niere 6B	18931,430	2,244	7131,376	1,00974549	2,655	2,223
Niere 6C	21954,217	2,603	9412,075	1,33267413	2,333	1,953
Niere 6D	21297,530	2,525	4674,548	0,6618784	4,556	3,815
Niere 26A	22268,702	2,640	6665,376	0,94376364	3,341	2,797
Niere 26B	19818,803	2,350	9339,276	1,32236638	2,122	1,777
Niere 26C	21588,874	2,559	8956,669	1,2681923	2,410	2,018
Niere 26D	13630,125	1,616	5240,477	0,7420094	2,601	2,178
gemischt	8435,054	1	7062,548	1	1,194335812	1,000

06.01.15						
Gel 2						
	HSP70		beta Actin		HSP70/Beta Actin	HSP70/Beta Actin
	absolut	normiert	absolut	normiert		normiert
Niere 5A	13679,267	0,931	10439,368	0,85412845	1,310	1,090
Niere 5B	19952,945	1,359	17978,924	1,47100001	1,110	0,924
Niere 5D	21435,409	1,460	14715,560	1,20399802	1,457	1,212
Niere 25A	12151,974	0,827	8218,104	0,67238902	1,479	1,231
Niere 25B	10713,832	0,729	8790,933	0,71925676	1,219	1,014
Niere 25C	11339,903	0,772	9257,811	0,75745579	1,225	1,019
Niere 25D	17010,459	1,158	11174,589	0,91428278	1,522	1,267
Niere 25E	13854,095	0,943	13128,711	1,07416517	1,055	0,878
gemischt	14.687	1	12.222	1	1,202	1,000

Niere DHE

Typ	1.Versuch			2.Versuch			3.Versuch			Zusammenfassung	
	Mean	STBW	Zellkerne	Mean	STBW	Zellkerne	Mean	STBW	Zellkerne	Mean	STBW
6A				56,889	19,65	200				6A	56,889
6B							49,084	16,14	200	6B	49,084
6C				36,651	13,385	200				6C	36,651
6D							49,129	18,997	200	6D	49,129
6E				58,886	24,203	200				6E	58,886
5A				42,282	19,195	200				5A	42,282
5B				59,162	32,5	200				5B	59,162
5D				34,849	11,439	200				5D	34,849
5E	55,431	24,191	200							5E	55,431
25A				61,884	27,694	200				25A	61,884
25B				65,848	29,667	200				25B	65,848
25C							59,061	18,953	200	25C	59,061
25D				61,389	15,541	200				25D	61,389
25 E				75,96	23,641	200				25 E	75,96
26 A	66,145	28,623	200							26 A	66,145
26B	78,13	46,569	200							26B	78,13
26C	59,178	29,976	200							26C	59,178
26D	55,016	31,806	200							26D	55,016
26E	53,43	27,693	200							26E	53,43

Danksagung

Bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Dr. Helga Stopper bedanke ich mich für die Überlassung des Themas und dass ich die Arbeit am „Institut für Pharmakologie und Toxikologie“ der Julius-Maximilians-Universität Würzburg durchführen durfte. Mit stetiger Unterstützung, in wissenschaftlichen Diskussionen und durch zahlreiche Anmerkungen stand sie mir immer hilfreich zur Seite.

Besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Eylül Ezgi Bankoglu. Sie war meine erste Anlaufstation während der Versuchsphase und führte mich ein in die Methodik der Versuche.

Auch bedanke ich mich bei meinen Eltern – Eva und Dr. Hans-Jürgen Cirkel –, die mir mein Studium ermöglichten und mich während der Anfertigung meiner Arbeit unterstützten. Meinem Vater danke ich zusätzlich für die kritische Durchsicht des Manuskripts.