

VORTRÄGE

Selenium and selenoproteins in the mammalian organism

D. Behne, D. Alber, A. Kyriakopoulos

Hahn-Meitner-Institut, Berlin,
Hahn-Meitner-Institut, Berlin, Abt. Molekulare Spurenelementforschung in den Biowissenschaften
Glienicke Str. 100, D-14109 Berlin

Selenium is an essential trace element, and selenium deficiency leads to various pathological changes. Almost all of the element present in the mammalian tissues is protein-bound, and its biological effects are due to the functions of specific selenoproteins in which the element is contained as selenocysteine. Non-specific incorporation has also been shown to exist, especially with selenomethionine which can partly replace methionine in methionine-containing proteins. We have been concerned with a long-term research program with the aim to obtain information on the distribution, metabolism and functions of selenium and the selenoproteins in the mammalian organism. Most of the studies have been carried out on rats. The development of a low selenium diet allowed investigations on animals with large differences in their selenium status. Radiotracer techniques and various procedures of trace element analysis such as neutron activation analysis, inductively coupled plasma - mass spectrometry, atomic absorption spectrometry and X-ray fluorescence have been valuable tools which have been applied in conjunction with biochemical and molecular biological methods. Information on the presence and distribution of selenium-containing proteins have been obtained by administration of ^{75}Se -selenite to rats and cell cultures, electrophoretic protein separation and autoradiographic detection of the labeled proteins. By using ^{75}Se with a very high specific activity detection levels in the fmol range could be achieved, and in this way numerous selenium-containing proteins have been detected. Based on these findings studies have been performed on the identification of novel selenoproteins, the localization of their sites of action, the elucidation of their biological functions, the investigation of their metabolism and their regulation mechanisms and the development of procedures for their measurement in human and animal tissues. In this survey the strategies and methods used in this field of research will be presented and discussed with the help of some examples.

„Leben am Ring“:

Bekannte und neue Möglichkeiten für die biologische Forschung bei BESSY.

Markus Sauerborn, BESSY GmbH, Berlin

Die biologische Forschung hat sich in den letzten 10 Jahren an vielen Synchrotronstrahlungsquellen als wichtiges Forschungsfeld etabliert. Zunächst beflügelt durch die spektakulären Erfolge in der Proteinkristallographie, sind weitere Methoden entwickelt worden, die inzwischen das gesamte verfügbare Energiespektrum von harter Röntgen- bis Infrarotstrahlung für die Untersuchung biologischer Proben mit Synchrotronstrahlung nutzbar machen.

An der Berliner Synchrotronstrahlungsquelle BESSY II wird der Aufbau biologischer Messplätze seit der Inbetriebnahme 1998 vorangetrieben. So stehen nun neben den drei Strahlrohren für die Proteinkristallographie, den beiden Röntgenmikroskopen sowie den Messplätzen für Mikrospektroskopie und Mikrofluorimetrie auch Einrichtungen für IR-Spektromikroskopie und CD-Spektroskopie zur Verfügung. Neueste Entwicklungen bei BESSY erweitern den Spektralbereich über Infrarot hinaus in die THz-Region. Durch die einzigartige Brillanz bei großer Bandbreite lässt sich Spektroskopie mit THz-Strahlung betreiben. Dies kann z.B. zur Untersuchung des Schwingungsverhaltens großer biologischer Makromoleküle genutzt werden.

Hochfeld-EPR und ENDOR Untersuchungen an Aminosäureradikalen in Eisen-Enzymen

Friedhelm Lenzian

Max-Volmer-Labor, Technische Universität Berlin, PC14, Str. des 17. Juni 135, 10623 Berlin

E-mail: lenzian@struktur.chem.tu-berlin.de

Aminosäureradikale werden in einer zunehmenden Zahl von Metall-Enzymen beobachtet. Mit Hilfe von Hochfeld-EPR und ENDOR können diese Radikale identifiziert und ihre elektronische und räumliche Struktur, sowie Wechselwirkungen mit dem Metallzentrum und der Proteinumgebung untersucht werden [1,2].

Transiente Radikale, welche als kurzlebige Intermediate in der Shunt-Reaktion von substratfreiem Cytochrom P450cam mit Peressigsäure auftreten [3], wurden mit Hilfe schneller Freeze-Quench Technik (8-40 ms) getrappt. Hochfeld-EPR ermöglichte eine eindeutige Identifizierung als Tyrosinradikale und darüber hinaus eine spezifische Zuordnung zu bestimmten Positionen im Protein. Wahrscheinlich werden die Radikale von einem transienten hochvalenten $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ Porphyrin-Kation (Compound I) des Häms durch Elektronentransfer und Deprotonierung generiert [4].

Ribonukleotid-Reduktase katalysiert die Synthese von Deoxy-Ribonukleotiden und ist daher ein wichtiges Enzym in der DNA-Synthese. Die Protein-Untereinheit R2 des Klasse I Enzyms besitzt ein für die Funktion essentielles Tyrosin-Radikal, welches durch die Reaktion des benachbarten zweikernigen Eisen-Zentrums mit molekularem Sauerstoff generiert wird. In verschiedenen Mutanten dieses Enzyms wurden Tryptophan-Radikale oder, mit Hilfe von ^{57}Fe ENDOR, stark gekoppelte $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{Fe}^{\text{III}}$ -Radikal-Zentren mit wahrscheinlich koordinierendem Radikal nachgewiesen und charakterisiert [1,2]. Mit Hilfe von Hochfeld-EPR an Einkristallen der R2-Untereinheit wurde die Orientierung des funktionellen Tyrosinradikals im Protein bestimmt [5]. Es zeigte sich eine signifikante Reorientierung des Radikals, weg vom zweikernigen Eisenzentrum, im Vergleich zum nichtradikalischen Tyrosin. Diese Konformations-änderung wird im Rahmen des vorgeschlagenen Mechanismus diskutiert.

-
- [1] G. Bleifuss, M. Kolberg, S. Pötsch, W. Hofbauer, R. Bittl, W. Lubitz, A. Gräslund, G. Lassmann, and F. Lenzian (2001) *Biochemistry*, **40**, 1562-1568.
 - [2] M. Kolberg, G. Bleifuss, S. Pötsch, A. Gräslund, W. Lubitz, G. Lassmann, and F. Lenzian, (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 9856-9857.
 - [3] V. Schünemann, C. Jung, A.X. Trautwein, D. Mandon, and R. Weiss (2000) *FEBS Letter* **479**, 149.
 - [4] V. Schünemann, F. Lenzian, C. Jung, J. Contzen, A.-L. Barra, S.G. Sligar, and A.X. Trautwein, *J. Biol. Chem.* (2003) submitted.
 - [5] M. Högbom, M. Galander, M. Andersson, M. Kolberg, W. Hofbauer, G. Lassmann, P. Nordlund, and F. Lenzian (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 3209-3214.

Kooperationen: P450cam: C. Jung, MDC, Berlin, V. Schünemann, Med. Universität, Lübeck, RNR: A. Gräslund, B.-M. Sjöberg, M. Högbom, and P. Nordlund, University of Stockholm, Sweden.

Analyse der Struktur und Dynamik von Proteinen in Grenzschichten

Peter Hildebrandt und Daniel H. Murgida

Technische Universität Berlin, Institut für Chemie, Max-Volmer-Laboratorium f. biophysikalische Chemie, Strasse des 17. Juni 135, D-10623 Berlin

Unter natürlichen Bedingungen laufen die Mehrzahl der Reaktionen von Proteinen an Membranen ab. Aufgrund des Transmembranpotentials sowie der Ladungsverteilung in der Grenzschicht sind so die Proteine starken elektrischen Feldern ausgesetzt, die deren molekulare Struktur sowie die Reaktionsmechanismen und –dynamik beeinflussen können. Diese Effekte können bei Proteinen untersucht werden, die auf Elektroden immobilisiert sind, die mit selbstorganisierten Monoschichten (SAM) aus bifunktionellen Thiolen beschichtet sind. Mit Hilfe des Elektrodenpotentials, der Dicke der SAMs und der Art der Kopfgruppe kann die Stärke des elektrischen Feldes am Ort der Proteinbindung variiert werden. Ein solches Modellsystem erlaubt den Einsatz der oberflächenverstärkten Resonanz-Raman (surface enhanced resonance Raman – SERR) Spektroskopie, die selektiv die aktiven Zentren nur der immobilisierten Proteine abfragt. Am Beispiel des Hämproteins Cytochrom c wird gezeigt, dass bei sehr hohen elektrischen Feldern eine reversible Strukturänderung im Redoxzentrum induziert wird, die mit einem Ligandenaustausch am Hämeisen und damit mit einer drastischen Erniedrigung des Redoxpotentials verbunden ist. Bei niedrigen Feldstärken liegt das immobilisierte Protein ausschließlich in seiner nativen Form vor. Die Elektronentransferdynamik ist bei schwachen Feldern durch „electron tunneling“ bestimmt, während mit steigender Feldstärke die Aktivierungsenergie für die Reorganisation des Wasserstoffbrückennetzwerkes im Protein bzw. in der Protein/SAM Grenzschicht soweit ansteigt, dass Protonentransfer geschwindigkeitsbestimmend wird. Dies gilt in ähnlicher Weise für Konformationsübergänge, die wie der Redoxprozess mit der Trennung und Neuknüpfung von Wasserstoffbrückenbindungen verbunden sind und somit auch bei starken Feldern erheblich verlangsamt werden. Die Kopplung von Elektronentransfer und Konformationsübergängen sowie die Modulation der Reaktionskinetiken durch das elektrische Feld weist auf mögliche Mechanismen für den Ladungstransport des Cytochrom c an der Mitochondrienmembran hin.

Aspekte der Strukturbestimmung von Proteinen mittels der NMR-Spektroskopie

Peter Schmieder

FMP, Berlin
Campus Berlin Buch
Robert-Rössle-Str. 10, D-13125 Berlin

Die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen mittels der NMR-Spektroskopie ist wohl etabliert und wird routinemäßig durchgeführt. In diesem Vortrag sollen zwei Aspekte der Strukturbestimmung behandelt werden, zum einen die Entwicklung neuer NMR-spektroskopischer Methoden zur Verbesserung der automatischen Zuordnung, zum anderen die Anwendung von NMR auf Metalloproteine unter Verwendung der Kerne der Metallatome. Bei den neuen NMR-Methoden handelt es sich um die Entwicklung aminosäure-spezifischer Experimente für Protein-Domänen, bei der Anwendung auf Metalloproteine um Strukturuntersuchungen an Metallothionein mittels der ^{113}Cd -NMR. Beiden Themen wird eine kurze Einführung in die NMR-Spektroskopie an Proteinen vorangestellt.

Rieske Eisen- Schwefel- Proteine – Strukturen und Funktionen

Christian L. Schmidt

Institut für Biochemie, Universität zu Lübeck,
Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Das erste Rieske Protein wurde vor nicht ganz 40 Jahren als Komponente der mitochondrialen Atmungskette beschrieben (Rieske *et al.* 1964). Charakteristisch für diese Proteine ist das Vorhandensein eines speziellen [2Fe-2S] Clusters. Während die Ligandensphäre eines der Fe-Ionen dieses Clusters von zwei Sulfidionen und den Schwefelatomen von zwei Cysteinseitenketten gebildet wird, wird das zweite Fe-Ion von den Sulfidionen und den ϵ -Stickstoffatomen zweier Histidinseitenketten koordiniert. Aus dieser Mischkoordination resultieren die typischen Eigenschaften der Rieske FeS Cluster: Ein deutlich positiveres Redoxpotential und einen geringeren Extinktionskoeffizienten verglichen mit rein Schwefel koordinierten [2Fe-2S] Clustern, sowie das typische ESR- Spektrum.

Seit ihrer Entdeckung wurden Rieske Proteine in einer Vielzahl von Organismen als essentielle Untereinheiten der Cytochrome *bc₁*- bzw. Cytochrome *b₆f*- Komplexe der respiratorischen und photosynthetische Elektronentransportsysteme nachgewiesen. Weitere Proteine mit Rieske- ähnlichen [2Fe-2S] Clustern, so genannte Rieske- Typ Proteine, wurden in der Folgezeit als Komponenten vieler an katabolen Stoffwechselwegen beteiligten bakterieller Oxigenasen in beschrieben. Erst in neuerer Zeit wurden auch eine Reihe von eukaryotischen Rieske- Typ Proteinen mit anabolen und regulatorischen Funktionen gefunden (Schmidt and Shaw 2001).

Rieske, J.S., MacLennan, H., and Coleman, R. (1964) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **15**: 338-344.

Schmidt, C.L., and Shaw, L. (2001) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **33**: 9-25.

Kristallstrukturen menschlicher Proteine mittels Struktureller Genomik

Udo Heinemann

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch & Institut für Chemie /
Kristallographie, Freie Universität Berlin

Unter Struktureller Genomik versteht man einen Forschungsansatz, der auf die systematische Analyse der dreidimensionalen Struktur von Proteinen mit hohem Durchsatz zielt.

Die Berliner Proteinstrukturfabrik ist einer der ersten Forschungsverbünde weltweit auf dem Gebiet der Strukturellen Genomik. Sie fokussiert sich auf die Strukturanalyse menschlicher Proteine und stellt Methoden und wissenschaftliche Infrastruktur für die halbautomatische Expressionsklonierung und Reinigung von Proteinen, die Zuordnung von Signalen in NMR-Spektren und die synchrotronbasierte Akquisition von Röntgenbeugungsdaten bereit [1].

Dieser Beitrag gibt einen Abriss über Strukturen menschlicher Proteine, die von der Proteinstrukturfabrik bestimmt wurden.

Literatur

1. Heinemann, U., Büssow, K., Mueller, U. & Umbach, P. (2003) Acc. Chem Res. 36, 157-163.

Das [NiFe] Zentrum von sauerstofftoleranten Hydrogenasen: Röntgenabsorptions-Spektroskopie Untersuchungen

Michael Haumann¹, Tanja Burgdorf², Peter Liebisch¹, Thorsten Buhrke², Wolfram Meyer-Klaucke³, Bärbel Friedrich², Holger Dau¹

¹Freie Universität Berlin, FB Physik, Arnimallee 14, D-14195 Berlin, Germany;

²Humboldt-Universität zu Berlin, Mikrobiologie, Chausseestr. 117, D-10115 Berlin, Germany; ³DESY, EMBL Outstation, Notkestr. 85, D-22603 Hamburg, Germany.

[NiFe] Hydrogenasen katalysieren die Spaltung und Produktion von molekularem Wasserstoff an einem proteingebundenem Nickel-Eisen Metallzentrum. Im „Standardtyp“ dieser Enzyme werden die katalytischen Reaktionen durch Sauerstoff inhibiert. Besonders interessant, im Hinblick auf die Produktion von Bio-Wasserstoff, sind [NiFe] Hydrogenasen, die in Anwesenheit von Sauerstoff aktiv sind. Solche Enzyme werden in aeroben Organismen gefunden. Das Bakterium *Ralstonia eutropha* enthält gleich drei verschiedene [NiFe] Hydrogenasen die nicht durch Sauerstoff inhibiert werden: (1) die regulatorische Hydrogenase (RH) dient als Wasserstoffsensoren der Zelle. (2) Die NAD-abhängige Hydrogenase (SH) und (3) die Membran-gebundene Hydrogenase (MBH) katalysieren die reversible Spaltung von Wasserstoff.

Die atomare Struktur und die Oxidationszustände von RH und SH im katalytischen Zyklus wurden mit Röntgenabsorptionsspektroskopie (X-ray absorption spectroscopy, XAS) an der Ni K-Kante untersucht. Die quantitative Analyse der XAS Daten ergibt Strukturmodelle der Ni Bindestelle mit atomarer Auflösung und Informationen über den Oxidationszustand des Nickels.

In der RH [1] und der SH [2] wird eine Struktur der Ni Bindestelle gefunden, die stark von der Struktur im Standardtyp der [NiFe] Hydrogenasen abweicht. In beiden Enzymen sind nicht alle der vier konservierten Cysteinreste, welche das Ni Atom in Standard-Hydrogenasen binden, an der Ni Bindung beteiligt. Zudem ändert sich die Ligandierung des Ni Atoms im katalytischen Zyklus, beeinflusst durch die Bindung von Wasserstoff am Ni.

Die erhaltenen Strukturmodelle der Ni Bindestellen in RH und SH erlauben die Formulierung von Reaktionsmodellen dieser Enzyme, die Erklärungsansätze für die Sauerstofftoleranz und für die molekulare Grundlagen der unterschiedlichen Funktionen, Wasserstoffsensoren und Wasserstoffspaltung, liefern.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 498, Projekte C1 und C8) für finanzielle Unterstützung.

[1] Haumann, M., Porthun, A., Buhrke, T., Liebisch, P., Meyer-Klaucke, W., Friedrich, B., Dau, H. (2003) *Biochemistry* 42, 11004-11015.

[2] Burgdorf, T., Liebisch, P., van der Linden, E., Meyer-Klaucke, W., Albracht, S. P., Friedrich, B., Dau, H., Haumann, M. (2003) Manuskript in Vorbereitung.

Ortsauflösende spektroskopische Untersuchungen von Metalloproteinen in Gewebeproben TSE infizierter Tiere an Synchrotronstrahlungsquellen

M. Kühbacher¹; G. Weseloh¹; G. Falkenberg²; U. Schade³; A. Kyriakopoulos¹; D. Behne¹

¹ *Hahn-Meitner-Institut Berlin, Abteilung Molekulare Spurenelementforschung in den Biowissenschaften, 14109 Berlin*

² *Hamburger Synchrotronstrahlungslabor HASYLAB am Deutschen Elektronensynchrotron DESY, Notkestr. 85, 22603 Hamburg*

³ *Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung mbH, Rudower Chaussee 5, 12489 Berlin*

Zu den Erkrankungen mit erheblicher epidemiologischer Bedeutung gehören die neurodegenerativen Erkrankungen. Obwohl die Ursachen für die neurodegenerativen Prozesse unterschiedlich sind, bilden sich in den meisten Fällen krankhafte Protein-Aggregationen, die sich im Gehirn ablagern und Nervenzellen schädigen können. Die Ergebnisse zahlreicher Studien lassen vermuten, dass bei diesen pathologischen Änderungen Metalle und Metalloide beteiligt sind. Bei den so genannten übertragbaren spongiformen Enzephalopathien (Transmissible Spongiform Encephalopathy; TSE) wie der Creutzfeld-Jakob-Krankheit oder Scrapie handelt es sich um neurodegenerative Erkrankungen, die sich durch einen massiven Untergang von Nervenzellen und eine schwammartige Umstrukturierung des Gehirnes auszeichnen. Während der Pathogenese wird das natürliche zelluläre Prion-Protein PrP_C in ein pathogenes Prion-Protein PrP_{Sc} umgewandelt, das anschließend aggregiert. Die physiologische Funktion des natürlichen zellulären Proteins PrP_C ist noch unbekannt. Es wird diskutiert, dass die kupferbindende Eigenschaft von PrP_C von zentraler funktioneller Bedeutung ist. Ortsauflösende spektroskopische Untersuchungen (Micro-SRXRF, Micro-XANES und SRFTIR-Spectromicroscopy) wurden an histologischen Schnitten von an TSE infizierten Hamstern im Rahmen einer Kooperation mit dem Robert-Koch-Institut am HASYLAB und BESSY durchgeführt.

Comparison of 2-DE/MS with ICAT-LC/MS proteomics

Peter R. Jungblut

Max Planck Institute for Infection Biology, Core Facility Protein Analysis, Berlin

Classical proteomics has combined two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) for the separation and quantification of the proteins in a complex mixture with mass spectrometric (MS) identification of selected proteins. More recently, the combination of liquid chromatography (LC), stable isotope tagging and tandem mass spectrometry (MS/MS) has emerged as an alternative quantitative proteomics technology. In this study we have analyzed the proteome of *Mycobacterium tuberculosis*, a gram positive bacterium comprising about 4000 genes, by 2-DE and MS and by the isotope coded affinity tag (ICAT) reagent method and MS/MS. The data obtained by either method were compared with respect to their selectivity for certain protein types and classes and with respect to accuracy of quantification. Initial data sets of 60,000 peptide MS/MS spectra and 1,800 protein spots for the ICAT-LC/MS and 2-DE/MS methods, respectively, were reduced to 280 and 108, respectively, conclusively identified and quantified proteins. ICAT-LC/MS showed a clear bias for high-Mr proteins and was complemented by the 2-DE/MS method that showed a preference for low-Mr proteins and also identified cysteine-free proteins that were transparent by the ICAT LC/MS method. Relative quantification between two strains of the *M. tuberculosis* complex also revealed that the two technologies provide complementary quantitative information: Whereas the ICAT-LC/MS method quantifies the sum of the protein species of one gene product, the 2-DE/MS method quantifies at the level of resolved protein species, including post-translationally modified and processed polypeptides.

The data indicate that different proteomic technologies applied to the same sample provide complementary types of information that contribute to a more complete understanding of the biological system studied.

Messung von stabilen Isotopenverhältnissen in biologischen Proben mittels HPLC-MC-ICP-MS Kopplung

Christian Wolf

Institute of Food Research, Dept. Mass Spectrometry
Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UA, UK

Bei Untersuchungen zur Aufnahme, zum Transport und zum Stoffwechsel von Spurenelementen verdrängt die Verwendung angereicherter stabiler Isotope mehr und mehr den Einsatz radioaktiver Substanzen. Besonders in vivo Experimente am Menschen sind auf diese Art ohne die gesundheitlichen Risiken ionisierender Strahlung möglich. Die Methoden zur Bestimmung der Isotopenverhältnisse in solchen Proben müssen extrem nachweisstark und präzise sein. Gerade bei Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit sollen die verabreichten Mengen den natürlichen, in der Nahrung vorkommenden Mengen entsprechen. Dies hat zur Folge, dass die Verschiebung der entsprechenden Isotopenverhältnisse äußerst gering ist. Der Einsatz der induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie unter Verwendung von Multikollektor-Detektoren ermöglicht solche Untersuchungen.

Ein Schritt weiter gehen Untersuchungen, bei denen nicht nur die Gesamtgehalte, sondern die Isotopenverschiebungen in unterschiedlichen Fraktionen beobachtet werden. Auf diese Weise könnten Stoffwechselforgänge detaillierter erfasst und verfolgt werden.

Die on-line Kopplung der chromatographischen Trennung mit der ICP-MC-MS zur Detektion von Eisen-Isotopen wird am Beispiel von Blutserumproben vorgestellt.

Der neueste Stand der ProteinChip® Technologie

Andreas Wiesner (awiesner@ciphergen.com)
Ciphergen Biosystems GmbH

Das von Ciphergen Biosystems Inc. entwickelte ProteinChip System basiert auf dem patentierten *surface enhanced laser desorption/ionization* (SELDI)-Verfahren. Die hier erstmals erfolgreich verwirklichte Kombination von Chromatographie und Massenspektrometrie bietet gegenüber der klassischen *matrix assisted laser desorption/ionization* (MALDI)-Methode folgende Vorteile:

1. Komplexe biologische Proben (Serum, Urin, Gewebelysate etc.) können ebenso wie stark mit Detergenz oder Salz versetzte Präparationen direkt eingesetzt werden, eine besondere Vorbehandlung ist nicht notwendig.
2. Proteine und Peptide können quantitativ erfasst werden.
3. Enzymatische Reaktionen können verlustfrei *on chip* erfolgen und im Zeitverlauf dokumentiert werden.
4. Antikörper-Antigen-Bindungsstudien und Rezeptor-Liganden-Interaktionen finden ebenfalls verlustfrei unter physiologischen Bedingungen *on chip* statt. Alternativ können auch chromatographische Materialien für *off chip* Experimente eingesetzt werden.
5. Die Software ist auf den Vergleich der Proteinprofile großer Probenmengen spezialisiert. Diese Fähigkeit wird besonders bei der Suche nach neuen Biomarkern eingesetzt.
6. Reinigungsprotokolle können mit geringstmöglichem Zeit- und Materialaufwand *on chip* entwickelt und auf den präparativen Maßstab übertragen werden.

Die Spotoberflächen der ProteinChip-Arrays weisen kationische, anionische, hydrophobe, hydrophile oder Metallionen-bindende (IMAC) Eigenschaften auf. Für spezifische Interaktionsstudien und Antikörperversuche stehen gleichartige Träger mit voraktivierten Spots zur Kopplung von Proteinen, DNA oder RNA zur Verfügung. Die Analyse der auf den Spots der ProteinChip Arrays befindlichen Proteine erfolgt im ProteinChip Reader, einem hoch sensitiven Time-of-Flight Massenspektrometer. Für Profilingstudien reichen µg-Mengen an Gesamtprotein, die Sensitivität für Peptide liegt in der Regel mindestens im unteren fmol-Bereich. Die Identifizierung von Proteinen erfolgt durch *peptide finger printing* im ProteinChip Reader und kann mit Hilfe einer Interface-Verbindung zu Tandem-MS-Geräten durch nähere Analysen ergänzt werden.

Für die automatisierte Durchführung von Expression Difference Mapping™ Studien wurde das ProteinChip® AutoBiomarker System entwickelt. Damit können pro Tag bis zu 400 Proben vergleichend analysiert werden. Die Automatisierung aller nötigen Pipettiervorgänge erfolgt hierbei mit Hilfe des Biomek® 2000 Systems. Die ProteinChip Arrays werden über einen ProteinChip AutoLoader selbsttätig in das Gerät eingeführt und nach der Analyse wieder entfernt. Die ProteinChip Arrays sind mit Barcodes markiert, die über Scanner eingelesen und den zugehörigen Spektren zugeordnet werden können. Die CiphergenExpress™ Data Manager Software ist für das Verwalten der dabei anfallenden großen Datenmengen speziell entwickelt worden, das Biomarker Analysis Module ermöglicht den schnellen Nachweis von singulären Biomarkern und die Biomarker Patterns™ Software unterzieht die Daten einer Multivarianzanalyse, wobei mehrere Marker zur Klassifizierung herangezogen werden, um eine bessere diagnostische Vorhersagekraft zu erhalten. Die Suche nach Bindungspartnern der Biomarker erfolgt auf der Interaction Discovery Mapping™ Plattform, einer methodischen Kombination von aktivierten Chromatographiematerialien und ProteinChip Arrays zum Identifizieren von weiteren Targetproteinen mit potentieller diagnostischer und therapeutischer Bedeutung.

Energetics of Electron Transfer in Photosynthetic Systems

Hiroshi Ishikita and Ernst-Walter Knapp

Institute of Chemistry, Department of Biology, Chemistry, and Pharmacy,
FU Berlin
Takustrasse 6, D-14195 Berlin

Energy conversion and transformation as well as the primary steps of enzymatic reactions generally involve electron transfer (ET) processes. This contribution considers ET processes in photosynthetic protein membrane complexes of bacterial and photosystem I (PS I) reaction centers. The focus will be on ET processes from the special pair to the quinones in the two branches and the ET processes between the quinones and in PS I from the quinones to the iron-sulfur center. The energetics of the ET processes in these systems is elucidated and it is demonstrated how the protein tunes the redox potentials of its cofactors.

ELEKTRODEN DESIGN FÜR ELEKTRONISCHE WECHSELWIRKUNG MIT MONOOXYGENASEN

Ulla Wollenberger*, Nikita Bistolas, Christiane Jung¹, Victoria Shumyantseva², Tautgirdas Ruzgas³,
Frieder Scheller

*Universität Potsdam, Institut für Biochemie und Biologie, Analytische Biochemie, D-14476 Golm

¹ Max Delbrück Centrum für Molekulare Medizin, D-13125 Berlin

² Institut für Biomedizinische Chemie, 119121 Moskau, Russland

³ Lund Universität, Analytische Chemie, 22100 Lund

Die Fähigkeit von Cytochrom P450 (P450) mit einer Vielzahl von Substanzen zu reagieren, macht diese Enzymklasse interessant für Anwendungen u.a. im Bereich der Analytik, Stoffwandlung und Entgiftung. Das Enzym benötigt neben Sauerstoff ebenfalls Elektronendonatoren. Gelingt es eine direkte elektronische Kommunikation zwischen P450 und Elektroden herzustellen, sollte die Elektrode als Quelle der Elektronen dienen und so eine Substratumwandlung ohne zusätzliche Redoxäquivalente stattfinden.

Es wurden Elektroden mit einer Schicht von colloidalen Nanopartikeln und Natriummontmorillonit modifiziert, die aufgrund ihrer Ionenaustauscherfunktion und der negativen Ladung das Cytochrom P450 binden.

Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene P450-Enzyme reversibel oxidiert und reduziert werden konnten.

P450cam zeigt einen quasi-reversiblen ein-Elektronentransfer mit E_o' (Formalpotential) von -165 mV (NHE). Dieser Wert entspricht dem des P450cam im „high-spin“-Zustand. Verschiedene Zusätze (Metyrapon, CO) stabilisieren die reduzierte Form, was sich in anodischen Verschiebungen des Formalpotenzials widerspiegelt.

Spektroelektrochemische Untersuchungen zeigen, dass eine direkte Reduktion des P450 durch eine modifizierte Elektrode möglich ist, wobei in Abhängigkeit vom Substratgehalt die Stabilität beeinträchtigt sein kann.

Am Beispiel von P450-2B4 wird gezeigt, dass durch nichtionische Detergenzien der Redoxprozess beschleunigt und ein Substratumsatz erreicht werden kann.

Es werden zusätzlich Untersuchungen zur Simulation des nativen Redoxpartners Putidaredoxin durch ein Peptid in der Elektrodenmodifikation vorgestellt.

Die Arbeiten wurden durch den Fond der Chemischen Industrie und Europäische Kommission finanziert (QLK3-CT-2000-01481).

Manganese speciation in biological samples

Bernhard Michalke, GSF National Research Center for Environment and Health, Ingolstaedter Landstr. 1, 85764 Neuherberg, Germany

Manganese is a trace element known to activate many enzymes involved in metabolic processes. Mn is needed for protein and fat metabolism, healthy nerves and healthy immune system as well as sugar regulation. Mn is one of the key elements for enzymes in energy production and increases the level of antioxidant [1,2]. It is also required for normal bone growth. On the other hand increased Mn-load is related to psychomotoric abnormalities and finally even related to Parkinson's disease. Recently, increasing Mn levels were seen in children's blood according to the use of Mn-organo species as anti-knock agent in fuel. Therefore a Mn speciation concept is set up to first investigate the "normal" Mn-species load to humans, *i.e.* children, subsequently preceeding with Mn-loads to liver, serum and finally Mn speciation at the blood-brain barrier. Human milk is the first food for humans and it serves as the source for "normal" Mn-species load to newborns. Mn content and Mn speciation in human milk is therefore of importance for understanding the healthy development of the newborn, being the first step in the Mn concept.

Mn is very low concentrated in (not Mn-loaded) human milk. Dependent on the stage post partum Mn concentrations between 2 and 5 µg/L for transitory and mature milk or up to 10 µg/L for colostrum are published [e.g. 3, 4, 5]. In this study pooled human milk ("HM": 3rd day after delivery) was investigated in subfractions, namely defatted fraction by centrifugation ("DFF": 10 min, 800 g, 10 °C), the latter subfractionated in pellet (protein) fraction ("PF") or supernatant ("LMW") fraction (30 min, 25800 g, 10 °C). It turned out that Mn concentrations were 3 µg/L (HM), 2.85 µg/L (DFF), 0.25 µg/L (PF) and 2.6 µg/L (LMW). The DFF was analyzed by SEC-ICP-MS at ⁵⁵Mn isotope. 10% of Mn were eluting in the void volume thus being related to compounds with higher molecular weight. However, the mainpeak eluted around 100 min. which was assigned to masses between 450 Da and ca. 200 Da due to the mass calibration of the TSK column (separation range between 130 – 2000 Da). The peakshape as well as peak evaluation indicated this peak consisting of more than one compound (which was expected). Investigations of DFF by reversed phase chromatography-ICP-MS indicated Mn compounds predominantly to be polar. SEC-fractions were investigated by SAX-ICP-MS, too. The method was used also for separations of commercial Mn-standard compounds, such as Isocitrate Dehydrogenase, Pyruvate Carboxylase, MnCl₂ and several more. The multi-dimensional approach (SEC-UV-ICP-MS + SAX-UV-ICP-MS) showed inorganic Mn species and Mn-citrate to be present in human milk. Some further compounds were found but not identified due to a lack of standards for comparison. A preliminary approach using ESI-MS as additional molecule selective detector indicated Mn-citrate as one of the compounds.

Further investigations were started to speciate Mn-compounds in liver being a next step in the Mn concept. Extraction procedures preserving Mn-species as well as increasing extraction efficiency were developed and investigated using SEC-ICP-MS. It turned out that in liver different Mn species are present predominantly associated to the HMW range.

Literature:

[1] W. Zidek, in H. Zunkley, Ed., Spurenelemente-Grundlagen-Ätiologie-Diagnosen-Therapie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1983**, pp140 – 151. [2] Manganese: Blood; Serum; Urine. <http://www.arupöab.comguides/clt/>, **2002**. [3] B. Lönnerdal, in A.M. Roussel, R.A. Anderson, A.E. Favrier, Eds, Trace Elements in Man and Elements, Plenum Publisher, New York, **2000**, 353 - 358. [4] R.M. Parr, E.M. DeMaeyer, V.G. Iyengar, A.R. Byrne, G.F. Kirkbright, G. Schöch, L. Niinisto, O. Pineda, H.L. Vis, Y. Hofvander, A. Omoloulu, **1991**, Biol Trace Elem. Res. 29: 51 – 75. [5] E. Coni, A. Alimonti, A. Bocca, F. La Torre, D. Pizzuti, S. Caroli, in S. Caroli, Ed, Element Speciation in Bioinorganic Chemistry, John Wiley & Sons, New York, **1996**, pp255 – 283.

Selenoproteins of the thyroid gland

Cornelia Schmutzler, Birgit Mentrup, Emine Griebert, Marianne Menth and Josef Köhrle; Institut für Experimentelle Endokrinologie und Endokrinologisches Forschungszentrum EnForCé, Charité, Universitätsmedizin Berlin

Thyroid hormones, central regulators of growth, differentiation and homeostasis, are synthesized by the epithelial cells of the thyroid gland, the thyrocytes. Thereby, high amounts of H₂O₂ are produced as a cosubstrate for thyroperoxidase in the oxidative iodination of thyroglobulin, an essential step in thyroid hormone biosynthesis. Thus, the gland is constantly exposed to reactive oxygen species (ROS) probably arising as byproducts of these processes. It is conceivable that effective protection of the thyrocytes against these ROS is required. This is achieved by compartmentalization of the synthesis reactions to the lumen of the thyroid follicles. However, H₂O₂ may diffuse into the cytoplasm and nucleus where it leads to aberrant iodination of proteins, trigger apoptosis and induce DNA damage, respectively.

The thyroid gland occupies a high rank in the tissue Se hierarchy, being one of the organs with the highest Se content in the adult as well as in children. Furthermore, during Se deficiency, the rodent thyroid gland retains high levels of Se. Therefore, an adequate Se supply seems to be essential for normal thyroid function. This is further illustrated by the finding that Se deficiency is involved in several diseases affecting the thyroid gland, among them autoimmune diseases, neoplasias, myxedematous cretinism, and Kashin-Beck disease. At least 11 selenoproteins are postulated to occur in the thyroid gland, many of them involved in the scavenging of ROS. We studied expression and regulation of thyroidal selenoproteins by a combination of *in vitro* and *ex vivo* analytical methods.

Several thyroid cell lines, including the differentiated rat thyroid cell line FRTL-5 and various human thyroid carcinoma cell lines exhibit glutathione peroxidase (GPx) and thioredoxin reductase (TrxR) activities which are dependent on the Se concentration in the culture medium. As determined by Western blot, in the case of XTC oncocyctic thyroid carcinoma cells, GPx-3 is completely secreted into the conditioned medium, whereas TrxR is found both intra- and extracellularly. By *in situ* hybridization, GPx mRNAs were found to be preferentially expressed in the epithelial cells of the thyroid gland. mRNA coding for the newly discovered GPx-6 was detected in several thyroid carcinoma cell lines by RT-PCR. Type I 5'-deiodinase (5'DI), involved in the metabolism of thyroid hormones, is highly expressed in the normal thyroid gland, but at reduced or even undetectable levels in differentiated and undifferentiated thyroid carcinomas, respectively. In immunocytochemistry, 5'DI staining was confined to the thyrocytes in human goiter specimen, and reduced signals were detected in samples of thyroid carcinomas using a tissue microarray. Selenoprotein P (SePP) was detected in thyroid carcinoma cell lines and their conditioned medium by Western blot and ⁷⁵Se metabolic labeling. *In situ* hybridization and immunocytochemistry suggested moderate expression of SePP and localization to single thyrocytes as well as single cells interspersed between the thyroidal follicles. SeP15 is discussed as a potential chaperone; its mRNA was amplified by RT-PCR from thyroid carcinoma cell lines. *In situ* hybridization revealed a widespread but weak expression of this protein throughout the thyroid.

Thus, the thyroid gland indeed expresses a wide variety of selenoproteins, many of them preferentially in the thyrocytes, main players in the biochemical activity of this tissue. This illustrates the central role of Se for maintaining proper function of this gland supplying the vertebrate organism with the essential thyroid hormones.

Supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Knockoutmäuse als Tiermodell in der Selenforschung

Markus Brielmeier

GSF-Forschungszentrum für Umwelt u. Gesundheit
Ingolstädter Landstr. 1, D-85764 Neuherberg

Seit den 1957 von Schwarz u. Folz beschriebenen Arbeiten mit Ratten gilt Selen als essentielles Spurenelement. Spätestens seit diesem Zeitpunkt spielen Tierversuche auch eine entscheidende Rolle in der Selenforschung. Über einen langen Zeitraum dominierte hier die Erforschung nutritiver Aspekte: sowohl nützlicher als auch schädlicher Wirkungen von Selen. Mit der Entdeckung, dass Selen Bestandteil der Glutathion-Peroxidase ist, öffnete sich ein Ansatzpunkt zur biochemischen Untersuchung der Essentialität des Selens, das für geraume Zeit dann immer im gleichen Atemzug mit Vitamin E genannt wurde. Durch die Aufklärung der revolutionären Tatsache, dass die Aminosäure Selenocystein durch ein bis dato nur als Stop-Codon bekanntes Basentriplett kodiert wurde, konnten in den folgenden Jahren viele bereits biochemisch beschriebene und auch eine Reihe neuer Selenoproteine molekularbiologisch charakterisiert werden. Damit war der Weg zur Untersuchung der Funktion einzelner Selenoproteine im Tierversuch durch gezielte Manipulation der Gene frei. Kürzlich wurde eine Arbeit veröffentlicht, die das gesamte Säugetiergenom nach potentiellen Selenoproteinen „*in silico*“ durchsucht hat. Die Autoren quantifizieren das „Selenoproteom“ des Menschen auf 25 Selenoproteine. Im Vortrag wird die Technik der Herstellung von Knockout-Mäusen, insbesondere die Verfahren zum gewebespezifischen und induzierbaren Genausfall beschrieben. Die derzeit veröffentlichten Knockout-Mausmodelle für Selenoproteingene werden beschrieben und Ergebnisse aus den eigenen Untersuchungen zur Funktion der Phospholipid-Hydroperoxid Glutathionperoxidase und mitochondrialen Thioredoxinreduktase in Knockout-Mäusen werden vorgestellt.

Rolle des Selens im Fettstoffwechsel. Interaktionen zwischen Nährstoffen mit oxidativer und antioxidativer Wirksamkeit

Klaus Schäfer

Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) sind zunehmend, vor allem aufgrund biologischer Wirkungen, in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Wie heute bekannt ist, sind es vor allem langkettige n-3 Fettsäuren des Fischöls, jedoch ebenso das Verhältnis von n-3/n-6 Fettsäuren, die für die menschliche Gesundheit von besonderer Bedeutung sind. Die mit der Nahrung aufgenommenen PUFA verändern das Fettsäuremuster in Zellmembranen, wodurch komplexe Regelmechanismen beeinflusst werden. Sie sind immunaktive Substrate. Durch PUFA können zum Teil positive Effekte auf den Metabolismus, die Mikrozirkulation und Entzündungsreaktionen bewirkt werden.

Nachteilig ist allerdings die starke Oxidationsanfälligkeit der PUFA, d.h. eine vermehrte alimentäre Zufuhr hochungesättigter n-3 Fettsäuren kann mit Lipidperoxidation und oxidativem Stress einhergehen. Voraussetzung für eine positive Wirkung ist daher eine adäquate Versorgung mit antioxidativ wirkenden Nährstoffen.

Unter den antioxidativ wirkenden Nährstoffen spielt Selen eine wichtige Rolle. In einer Reihe von Untersuchungen konnten wir zeigen, daß sich durch die Aufnahme von Nahrungsfetten der Selenstatus verändert. Bei Legehennen z.B. nahmen die Plasma Selengehalte von 116 µg/l in der ungesupplementierten Kontrollgruppe auf 77 – 60 µg/l bei einer 3%igen Sojaöl- bzw. Linolsäure-Zulage ab. In Körpergeweben wie Leber, Herz und im Eidotter waren die Selenkonzentrationen in den Fettzulagegruppen ebenfalls signifikant erniedrigt. In einer weiteren Studie am Tiermodell Ratte wurde außerdem geprüft inwieweit auch die thermische Behandlung von Nahrungsfetten den Selenstatus negativ verändert. Tiere, deren Futter mit oxidiertem Sonnenblumenöl supplementiert wurden, hatten erniedrigte Plasma-Selenkonzentrationen. Dieser Effekt war bei den selenunterversorgten Ratten stärker als in der Selen-Zulagegruppe. Über die Mechanismen, die diesen Veränderungen des Selen-Status zugrunde liegen, ist wenig bekannt. Es wird angenommen, daß Nahrungsfette die postabsorptive Nutzung und Verteilung des Selens, nicht jedoch die intestinale Absorption des Selens modulieren.

Eine zwischen Selen und Nahrungsfett bestehende Wechselwirkung zeigt sich im Einfluß von Selen auf den Fettstoffwechsel. In Ratten, die Vitamin E adäquat und mit erhöhten Fischöl-Zulagen ernährt wurden, veränderte ein Selenmangel den Fettstoffwechsel und die Fettsäurezusammensetzung. In den Leberphospholipiden der Selenmanetiere waren die Gehalte der n-3 Fettsäuren, wie z.B. der Docosahexaensäure (22:6 n-3) und anderer langkettiger PUFA C20 –C22 geringer, jedoch die Gehalte von n-6 Fettsäuren, wie der Linolsäure, größer. Der durch Selenmangel verursachte Effekt wird auf die Reduzierung von Selenoenzymen mit antioxidativen Funktionen zurückgeführt. Als kausale Mechanismen werden zudem auch Effekte des Selens auf die Absorption, Speicherung und Desaturierung von Fettsäuren vermutet.

RNA Sequence Structure Properties and Selenocysteine Insertion

Prof. Dr. Rolf Backofen

Lehrstuhl für Bioinformatik, Institut für Informatik, FSU Jena, Ernst-Abbe-Platz 2, D-07743 Jena, Germany

Previously, RNA was more or less considered to be just an intermediate step in the translation from DNA to protein. But recently, RNA gained more interest since it was found that it has much more functionality. This was the reason that research on small RNAs was cited as past year scientific breakthrough.

Hence, one is especially interested in finding conserved RNA-motifs. It has been shown that structure is more conserved than sequence when considering RNA-motifs. Hence, all sequence-based methods for finding RNA-motifs such as multiple sequence alignment will fail.

We will shortly give an overview over existing approaches for finding RNA-motifs, before we consider some problems (such as finding the consensus structure) in more detail.

In the next step, we will apply the techniques to the problem of Selenocysteine insertion. Selenocysteine is the 21st amino acid, which is encoded by the nucleotide triplet UGA (usually interpreted as a STOP signal). The insertion of selenocysteine requires an additional signal in form of a SECIS-element (Selenocysteine Insertion Sequence). This is an mRNA-motif, which is defined by both sequence-related and structure-related properties.

There are two bioinformatics problems of interest to be solved. The first is to find SECIS-elements, and the second is to design new selenoproteins (i.e., proteins containing selenocysteine). Finding SECIS-elements is an application of the RNA-motif finding problem discussed earlier.

For the design problem, we have the problem that in the bacterial system, the SECIS-element is in the region of the mRNA that is translated into the amino acid sequence. Hence, changes on the level of mRNA made in order to generate a SECIS-element will also modify the amino acid sequence. Thus, one searches for an mRNA that is maximal similar on both levels, and satisfies the constraints imposed by the structure.

We will show that this problem can be solved efficiently (though the problem is computationally very hard for arbitrary structural constraints), given a description of the SECIS-element. We will then discuss various approaches to generate a description of the SECIS-element (and its diversity) based on the available data.

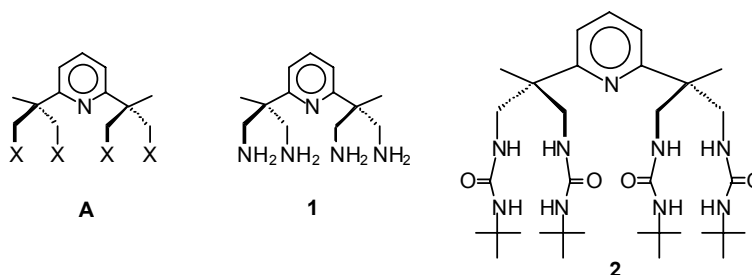
Grundlegendes zur Eisen-Koordinationschemie—und daraus abgeleitete bioanorganische Perspektiven

Andreas Grohmann, Technische Universität Berlin

Institut für Chemie, Sekretariat C 2, Straße des 17. Juni 135, 10623 Berlin

e-mail: andreas.grohmann@chem.tu-berlin.de

Nach Koordination tetrapodal-fünzfähriger Liganden verbleibt in oktaedrischen Übergangsmetallkomplexen eine einzelne "labile" Koordinationsstelle für Reaktivitätsuntersuchungen an kleinen einzährigen Spezies. Wir untersuchen Systeme hoher Symmetrie, welche sich vom Ligandgerüst **A** ableiten.¹ Im Falle des Pentaamins (X = NH₂, **1**) sind die Koordinationseinheiten elektronenreich und gleichzeitig gegenüber Komplexfragmenten des Typs [M(NH₃)₅]ⁿ⁺ stabilisiert. Der Chelatkomplex [(**1**)Fe^{II}Br]⁺ ist der stabile Vorläufer einer Reihe von Abkömmlingen [(**1**)Fe^{II}L]ⁿ⁺ (L = NO, NO₂⁻, ...), die durch Ligandenaustausch erhältlich sind. Der Nitro-Komplex zeigt ungewöhnliche Reaktivität: Koordiniertes Nitrit wird bei Anwesenheit von Protonen und eines geeigneten Reduktionsmittels (MeOH) zu NO reduziert, was an die Wirkungsweise häm-abhängiger Nitritreduktasen erinnert.¹ Wir haben kürzlich begonnen, die Chemie der Harnstoffderivate² von **A** zu entwickeln (z.B. X = NH(CO)NH-tBu, **2**), die unter Bildung von Tetraamidoamin-Liganden deprotoniert werden können. Die Peripherie dieser Liganden ist zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen befähigt. Über Fortschritte in der Koordinationschemie dieser Chelatoren wird berichtet.



1. J. Pitarch López, F.W. Heinemann, R. Prakash, B.A. Hess, O. Horner, C. Jeandey, J.-L. Oddou, J.-M. Latour, A. Grohmann, *Chem. Eur. J.* **2002**, 5709 – 5722.
2. C.E. MacBeth, A.P. Golombek, V.G. Young Jr., Cheng Yang, K. Kuczera, M.P. Hendrich, A.S. Borovik, *Science* **2000**, 289, 938 – 941.

Zinkfingerstrukturen in DNA-Reparaturproteinen als potentielle Angriffspunkte für toxische Metallionen und essentielle Spurenelemente

A. Hartwig, M. Asmuss, H. Blessing, G. Jahnke, A. Pelzer, T. Schwerdtle, I. Walter

Universität Karlsruhe, Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie

Verbindungen von Nickel(II), Cadmium(II), Cobalt(II) und Arsen(III) sind cancerogen beim Menschen und/oder im Tierversuch und tragen aufgrund ihrer weiten Verbreitung in der Umwelt und am Arbeitsplatz erheblich zum Krebsrisiko durch Schadstoffe bei. Ausgehend von nur sehr schwachen mutagenen Wirkungen, aber deutlich verstärkenden Effekten in Kombination mit anderen DNA-schädigenden Agentien konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von DNA-Reparaturprozessen bei sehr niedrigen, biologisch relevanten Konzentrationen einen gemeinsamen Mechanismus der Genotoxizität der untersuchten Metallverbindungen darstellt. Da einige Metallionen eine hohe Affinität zu SH-Gruppen aufweisen, stellte sich die Frage, ob sog. Zinkfingerstrukturen in DNA-Reparaturproteinen empfindliche intrazelluläre Angriffspunkte sind. Als Modelle wurden die Aktivitäten der an der Basenexzisionsreparatur beteiligten bakteriellen Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase (Fpg), des für die Nucleotid-Exzisionsreparatur essentiellen Xeroderma pigmentosum A (XPA)-Proteins sowie die durch die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) katalysierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung von Kernproteinen untersucht. Während Cadmium(II) in allen drei Testsystemen inhibitorisch wirkte, reduzierten Cobalt(II) und Nickel(II) die XPA-Aktivität und die Poly(ADP-Ribosyl)ierung, wohingegen die Fpg nicht beeinflusst wurde. Besonders interessant sind die Ergebnisse für unterschiedliche Arsenverbindungen: Hier zeigt sich eine Hemmung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung bei extrem niedrigen, nanomolaren Konzentrationen an Arsenit und seinen dreiwertigen methylierten Metaboliten sowie eine Zinkfreisetzung aus der Zinkfingerdomäne von XPA. Darüber hinaus können Zinkfingerstrukturen aber auch durch essentielle Spurenelemente beeinflusst werden: So zeigte sich eine Inaktivierung der Fpg durch die reduzierbaren Selenverbindungen Phenylseleninsäure(+II), Phenylselenenylchlorid(0), Selenocystin(-I), Ebselen(0) und 2-Nitrophenylselenocyanat(0); alle genannten Verbindungen verminderten darüber hinaus die DNA-Bindungsaktivität von XPA und/oder bewirkten eine Zinkfreisetzung aus dessen Zinkfingerdomäne. Vollständig reduzierte Selenverbindungen wirkten demgegenüber nicht inhibitorisch. Insgesamt zeigen die Versuche, dass Zinkfingerstrukturen empfindliche zelluläre Angriffspunkte sowohl für toxische Metallverbindungen als auch für oxidierende Selenverbindungen darstellen können, wobei sich jedoch die zugrunde liegenden Mechanismen unterscheiden.

Nickel Spezies im Cytosol von Normal- und Tumorgewebe des menschlichen gastrointestinalen Trakts

Tina Knispel¹, M. Kühbacher³, Evelin Denkhaus, ²Andreas Prange¹, A. Kyriakopoulos³, D. Behne³

¹GKSS-Forschungszentrum, Institut für Küstenforschung/Physikalische & Chemische Analytik, Max-Planck Straße 1, 21502 Geesthacht.

²Gerhard-Mercator-Universität Duisburg, Fakultät 4 - Instrumentelle Analytische Chemie, Lotharstraße 1, D-47048 Duisburg

³Hahn-Meitner Institut, Abteilung Spurenelementen (SF6), Glienicke Straße 100, 14109 Berlin

Es ist bekannt, daß der Umgang mit Nickel-Verbindungen großen negativen Einfluß auf die menschliche Gesundheit haben kann. Über die Nahrung nimmt ein Mensch im Durchschnitt die dreifache Menge des täglich benötigten Nickels auf wobei die Menge an absorbierten Nickel über den gastrointestinalen Trakt abhängig von den Nickel-Spezies in der Nahrung, vom Nickel-Gesamtgehalt und natürlich der individuellen Aufnahmefähigkeit von Nickel ist. Die Bindungspartner von Nickel im Darmgewebe bzw. die Rolle von Nickel bei der Karzinogenese von Darmkrebs sind dabei so gut wie unbekannt.

In vorausgegangenen Studien (CE/ICP-MS, SEC/ICP-MS) von insgesamt 11 Zytosolen von tumorösen und gesunden menschlichen Darmgeweben konnte durch Vergleich der erhaltenen Peakflächen ein quantitativer Unterschied an Nickelspezies der beiden Gewebearten gefunden werden.

Unsere Motivation ist es nun, diese neuen Nickel Spezies mittels multidimensionaler chromatographischer Methoden bzw. spektrometrischer Methoden zu isolieren und mittels ESI/MS-MS zu charakterisieren.

Da eine Isolierung des Spezies aus den Geweben aufgrund der komplizierten Matrix und der geringen Konzentration sehr schwer ist, wurde versucht mit Hilfe der menschlichen Tumorzelllinie HT29/B6, diese Nickelspezies zu finden und zu isolieren. Diese Zelllinie wurde gewählt, da sie Eigenschaften ähnlich des menschlichen Darmgewebes besitzt und weiterhin relativ einfach in Kulturflaschen vermehrt werden kann. Außerdem ist die Matrix im Vergleich zum Zytosol der Darmgewebe weniger kompliziert. Um sicher zu stellen, daß die Nickel-Spezies in ausreichender Menge von den Zellen produziert werden, wurde ein Nickelstandard in verschiedenen Konzentration in das Kulturmedium (RPMI 1640) hinzugegeben.

Auf der Basis von HPLC-ICP-MS (offline) wurden Methoden entwickelt, um die Nickel Spezies zu isolieren und aufzukonzentrieren. Die gefundenen Nickel Spezies besitzen eine molekulares Gewicht zwischen 5- und 10 kDa.

Technetium und Rhenium – zur Bindung der nuklearmedizinisch wichtigen Metalle an Biomoleküle

Ulrich Abram, Roger Alberto

(FU-Berlin),
(Universität Zürich)

Eine der großen Herausforderungen der gegenwärtigen nuklearmedizinischen Forschung ist die Entwicklung funktions- und targetspezifischer Radiopharmaka für diagnostische und therapeutische Anwendungen. Dabei nehmen die homologen Übergangsmetalle Technetium und Rhenium eine besondere Stellung ein, da sie über dafür sehr gut geeignete und zugängliche radioaktive Nuklide verfügen. Das metastabile Kernisomere ^{99m}Tc (Halbwertszeit $t_{1/2} = 6 \text{ h}$, $E_{\gamma} = 322 \text{ keV}$) ist seit Jahren das „Arbeitspferd“ der nuklearmedizinischen Diagnostik und das Element Rhenium ist mit den β^{-} -strahlenden Isotopen ^{186}Re und ^{188}Re für die Radioimmunotherapie von erheblichem Interesse.

Bei der Markierung von Biomolekülen mit diesen radioaktiven Metallen treten gleichartige Probleme auf, die sich im wesentlichen darauf zurückführen lassen, dass eine Koordination von Übergangsmetallen an Donoratome von Peptiden, Proteinen oder anderer biologisch aktiver Zentren meist eine Beeinträchtigung oder einen Verlust der biologischen Aktivität nach sich zieht. Dem kann durch die Entwicklung von Rhenium- und Technetiumkomplexen mit hoher Bindungsspezifität (direkte Markierung), der Verwendung spezieller Chelat-Komplexe, die über kopplungsfähige Gruppen in ihrer Peripherie an das Biomolekül gekoppelt werden können (bifunktionaler Weg) oder durch den Versuch, die Topologie und physiko-chemischen Eigenschaften von bioaktiven Molekülen durch metallhaltige Fragmente nachzubilden (biomimetischer Ansatz) begegnet werden.

Die drei unterschiedlichen Ansätze werden anhand von Beispielen vorgestellt und verglichen. Dabei wird insbesondere auf metallorganische Grundkörper und ihre Verwendung in der Nuklearmedizin eingegangen.

Neutronendiffraktion zur Lokalisierung von Peptiden und Co-Enzymen in Membranen

Thomas Hauß

Membranen dienen der Abgrenzung verschiedener Organellen in biologischen Zellen. Die Grundbausteine dieser Membranen sind Lipide, aber die Spezifität wird durch eine Vielzahl membranboundener Proteine, Peptide und Coenzyme hervorgebracht. Die Funktion dieser Membranen kann nur verstanden werden, wenn die Struktur der Komponenten (Lipide, Proteine u.a.) und ihre Lage zueinander bekannt ist. Am Beispiel des Peptids β -Amyloid, das eine wesentliche Rolle im Verlauf der Alzheimer'schen Demenz spielt, wird demonstriert, wie die Technik der Neutronendiffraktion zur Lokalisierung dieses kleinen Proteins in der Lipidmembran eingesetzt werden kann. Eine Schlüsselrolle spielt dabei die spezifische Deuterierung einzelner Aminosäuren. Ein ähnliches Verfahren wird eingesetzt, um Co-Enzyme wie Coenzyme-Q10 oder Squalene zu lokalisieren.

Spurenelemente und antioxidativer Status bei No-goes, Slow-goes und Go-goes

Rükgauer M. (1), Fetzer, G. (2), Zeyfang A. (2)

(1) Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Katharinenhospital, Stuttgart

(2) Samariterstift Aalen, Geriatrische Rehabilitationsklinik, Aalen

Nach heutigem Kenntnisstand sind Alterungsprozesse durch endogen und exogen entstehende freie Radikale mitverursacht. Ziel dieser Arbeit war es daher, das spurenelementabhängige antioxidative System von sich selbst versorgenden älteren Menschen zu untersuchen und die Werte mit altersspezifischen Unterschieden in Bezug auf die psychische und physische Funktionalität zu vergleichen. Dazu wurden bei 63 geriatrischen Probanden (G, Alter 75; 65-89 Jahre als Mittelwert; Minimum-Maximum) und bei 32 jüngeren Probanden (V, 32; 17-45 Jahre) der Gehalt an Selen, Chrom, Kupfer, Zink in Vollblut (VB), Plasma (PL) und Erythrozyten (ERY) sowie die Aktivität der Superoxiddismutase (SOD), der Glutathionperoxidase (GPx) und die Konzentration an Malondialdehyd (MDA) bestimmt und antropometrische, klinisch-chemische und geriatrische Daten erfasst.

Selen war bei G im PL verringert ($p < 0,01$, -14,8%) und nahm ab mit zunehmendem Alter (VB, PL und ERY: p jeweils $< 0,01$), bei steigender Diagnosenzahl (VB, PL und ERY: p jeweils $< 0,02$), bei reduziertem Allgemeinzustand (VB, PL und ERY: p jeweils $< 0,01$), bei reduzierter Mobilität (VB und ERY: p jeweils $< 0,01$) und erhöhtem Sturzrisiko (VB: $p = 0,03$), bei steigender Medikamentenzahl (VB: $p = 0,02$) und bei schlechterer Kognition (PL: $p < 0,01$). Eine Zunahme an Selen fand sich bei besserem Ernährungsstatus (VB: $p = 0,02$, PL: $p < 0,01$, ERY: $p = 0,03$). **Chrom** lag bei G höher in VB und ERY (+27,2% bzw. +25,1%, p jeweils $< 0,01$). Es nahm mit zunehmendem Body-Mass-Index ab (PL: $p = 0,02$). **Kupfer** war bei G erhöht in PL und ERY ($p = 0,04$, +10,3% bzw. $p < 0,01$, +17,6%). Es nahm bei schlechterem Allgemeinzustand zu (ERY: $p < 0,01$). **Zink** lag bei G höher in ERY ($p < 0,01$, +11,8%). Abnehmende Zinkwerte fanden sich mit zunehmendem Alter (VB: $p < 0,05$, PL: $p = 0,01$) und bei reduziertem Allgemeinzustand (VB: $p < 0,05$) und zunehmende bei besserem Ernährungszustand (VB: $p < 0,05$), bei höheren Diagnosenzahlen (ERY: $p = 0,03$) und bei reduzierter Mobilität (ERY: $p = 0,03$).

Die Aktivität der **Superoxiddismutase** in ERY war bei G verringert ($p = 0,03$, -5,3%), zeigte eine Zunahme mit zunehmendem Alter ($p < 0,01$), bei zunehmender Anzahl an Diagnosen ($p = 0,03$) und verordneten Medikamenten ($p < 0,01$), bei Verschlechterung des Allgemeinzustandes ($p < 0,05$) und der Mobilität ($p < 0,01$) sowie bei erhöhtem Sturzrisiko ($p < 0,05$). Eine Abnahme fand sich bei verbessertem Ernährungsstatus ($p < 0,01$). Die Aktivität der **Glutathionperoxidase** im PL lag niedriger bei G ($p = 0,01$, -13,4%), nahm ab mit zunehmendem Alter ($p < 0,01$), zunehmender Anzahl an Diagnosen ($p = 0,03$) und an verordneten Medikamenten ($p < 0,01$), nahm ferner ab bei Verschlechterung des Allgemeinzustandes ($p < 0,05$) und der Mobilität ($p < 0,01$) sowie bei erhöhtem Sturzrisiko ($p = 0,04$). Für **Malondialdehyd** wurde kein Unterschied zwischen G und V beobachtet, es war jedoch innerhalb G bei kognitiv Eingeschränkten erhöht ($p < 0,01$).

Deutlich zeigt sich, dass verminderte Selen-, Zink- und erhöhte Kupfergehalte sowie veränderte Enzymaktivitäten mit psycho-physischen und funktionellen Veränderungen von gesunden geriatrischen Probanden einhergehen, wobei fitte ältere Personen (Go-goes) einen wesentlich besseren Spurenelementstatus besitzen als weniger fitte (Slow-goes).

Reaktion der Zn-Homöostase auf eine bedarfsüberschreitende Zn-Aufnahme in Form von Sulfat, Gluconat, Orotat, Aspartat und Histidin am Modell der ⁶⁵Zn-markierten adulten Ratte

W. Windisch

BOKU - University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna
Department of Livestock Sciences
Gregor-Mendel-Strasse 33, A-1180 Vienna

Organische Zn-Verbindungen stehen im Ruf einer hohen Bioverfügbarkeit, denn sie erhöhen den Zn-Gehalt des Bluts nach einmaliger, hochdosierter oraler Aufnahme stärker und nachhaltiger als anorganische Zn-Quellen. Derartige Studien dauern jedoch nur wenige Stunden, so dass die homöostatische Reaktion des Zn-Stoffwechsels auf die veränderte Zn-Versorgung nicht miterfasst wird. Es sollte deshalb am Tiermodell der Ratte untersucht werden, inwieweit sich die Zn-Homöostase an eine langfristige Zn-Zufuhr aus gängigen organischen Supplementen anpasst.

Dazu erhielten 30 ⁶⁵Zn-markierte, adulte Ratten eine semisynthetische Basisdiät mit 50 ppm Zn aus ZnSO₄, die zur Simulation der nativen Komplexbildner in der alltäglichen Nahrung mit Na-Phytat angereichert war (8 mg/g). Die Tiere wurden in 6 Gruppen eingeteilt (n = 5) und erhielten entweder keine Zn-Zulage (Kontrolle) oder eine Zulage von 50 ppm Zn aus Sulfat, Gluconat, Orotat, Aspartat oder Histidin. Die Kot- und Harnausscheidungen wurden gesammelt und die Tiere nach 14 Tagen getötet und quantitativ in Gewebefractionen zerlegt. Das Futterangebot wurde durchgehend auf 8 g je Tiere und Tag begrenzt (energetischer Erhaltungsbedarf).

Die Lebendmasse der Tiere sowie der Zn-Konzentration und die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Blutplasma blieben durchwegs unverändert.

Die Zinkzulage erhöhte unabhängig von der Art der Zinkquelle die Menge an wahr absorbiertem Nahrungszink sowie die endogene fäkale Zn-Exkretion. Beide Effekte hoben sich gegenseitig auf. Die scheinbare Absorption des Nahrungszinks, die renale Zn-Exkretion sowie die Zn-Retention wurden weder von der Zn-Zulage noch von der Art der zugesetzten Zn-Verbindung beeinflusst.

Weder die Zinkzulage *per se*, noch die Art der Zn-Quelle hatte einen Effekt auf die Konzentrationen und Gesamtbestände an Zink in den einzelnen Organen, Blut, Muskel- und Fettgewebe, Haut, Haare, Skelett und Ganzkörper.

Der Zn-Austausch (Elimination von ⁶⁵Zn aus dem markierten Gewebe durch neu absorbiertes Zink) wurde durch die Zulage von 50 ppm Zn verstärkt. Zwischen den einzelnen Zn-Quellen bestand langfristig kein Unterschied.

Insgesamt scheint der Zn-Stoffwechsel die untersuchten Verbindungen gleichermaßen als Zn-Quellen zu erkennen. Unter der Bedingung einer bedarfsdeckenden Zn-Versorgung werden eventuelle Unterschiede in der Bioverfügbarkeit von der Zn-Homöostase offenbar schon auf der Stufe der Verdauungsvorgänge vollständig nivelliert.

Alterations of selenoprotein transcript levels in cancer

L. Schomburg and J. Köhrle

Institut für Experimentelle Endokrinologie & Endokrinologisches Forschungs-Centrum EnForCé, Charité Universitätsmedizin Berlin, Germany.

Selenium (Se) represents an essential trace element in the nutrition of animals and humans. It is present as selenocysteine (SeCys) in a number of Se-containing enzymes that participate in antioxidant defense (glutathione peroxidases), regulate intracellular redox potential (thioredoxin reductases), repair oxidized residues (methionine sulfoxide reductase) or control thyroid hormone metabolism (deiodinases). During translation, specific UGA “stop”-codons are recoded to SeCys-codons by the presence of certain secondary structures within the 3'-UTR of the mRNA. Thus, SeCys represents the 21st proteinogenic amino acid.

Many health benefits have been attributed to Se and a number of epidemiological reports clearly underscore that reduced Se concentrations predispose to a variety of pathologies including cancer. Prospective studies even indicate that Se supplementation reduces the incidence of prostate, colon and lung cancer and thus Se has become one of the most promising chemopreventive agents. Since these beneficial effects are likely to depend on the expression of selenoproteins, we have analyzed the transcript levels of respective candidates using Reverse-Format Arrays containing samples from cancer and neighboring normal tissues from individual patients. A complex picture emerged for the different tumor types and transcripts. Generally, tissue-specific expression patterns correlated well with reported sites of expression and activity (e.g. high levels of 5'-deiodinase type I in kidney or thyroid samples). Comparing cancerous and normal samples, some of the Se-protein encoding transcripts did not reveal consistent changes in expression levels excluding them as first choice candidates involved in the neoplastic processes. Others were found to be expressed at discordant levels, some of them especially in certain tumors. Intense downregulation was observed for e.g. renal pGPx or renal selenoprotein P mRNA-levels. In cancerous thyroid tissues, 5'-deiodinase type I was only hardly detectable. In essence, the results obtained provide a good overview of the tissue distribution of these selenoproteins, indicate interindividual and tumor-specific variabilities of expression-levels and help to identify candidates that might be important players or good markers for cancer biology or Se-based chemoprevention.

Supported by the Deutsche Krebshilfe (10-1792 Schol)

Selen und die Schilddrüsenhormonachse - Ansätze zur Prävention, Intervention oder Therapie mit Selenverbindungen ?

Josef Köhrle

Institut für Experimentelle Endokrinologie und Endokrinologisches Forschungs-Centrum der Charité EnForCé, Campus Charité Mitte, Charité Universitätsmedizin Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, Schumannstr. 20/21; D-10098 Berlin, Germany ; email: josef.koehrle@charite.de

Neben dem essentiellen Spurenelement Iod, das Hauptbestandteil der Schilddrüsenhormone ist (65 Gewichtsprozent des Prohormons L-Thyroxin (T₄) und 59 % des aktiven Hormons 3,3',5-Triiod-L-thyronin (T₃)), benötigt die effektive Schilddrüsenhormonsynthese und der deiodierende Schilddrüsenhormonstoffwechsel als zweites essentielles Spurenelement Selen (Se). Das Mengenelement Eisen erhöht die Effizienz der Schilddrüsenhormonsynthese und die Iodverwertung, wahrscheinlich in seiner Funktion als Zentralatom des Hämoproteins Thyroperoxidase.

Die gesunde Schilddrüse zählt zu den Organen mit dem höchsten Selengehalt und auch unter Selenmangelbedingungen im Tierversuch behält dieses Organ seine hohe Selenkonzentration. Kombiniertes schwerer Iod- und Selenmangel wird für die Entwicklung der in Regionen von Zaire beobachteten Form des myxödematösen Kretinismus verantwortlich gemacht.

In der Schilddrüse werden mehrere Selenocystein-haltige Proteine exprimiert z.B. verschiedene Glutathionperoxidasen (H₂O₂- und Peroxid-Abbau) und die 5'-Deiodasen Typ I und Typ II (Aktivierung der Prohormons T₄ zum aktiven T₃ in der Schilddrüse und anderen in Organen wie Leber oder Niere). Die Glutathionperoxidasen sind an der Protektion der Schilddrüse vor H₂O₂ beteiligt, das für die Hormonsynthese benötigt wird. Spezifische Funktionen weiterer Selenoproteine in der Schilddrüse sind noch zu klären.

Pathophysiologische Veränderungen der Schilddrüse (benigne und maligne Tumoren, Autoimmunerkrankungen) führen zu einer Änderung des Selengehalts und der Expression der Selenoproteine in der Schilddrüse, so dass Selenintervention oder Prävention mit Selenverbindungen in mehreren Studien jetzt untersucht wird. Außer bei Risikogruppen gibt es in Mitteleuropa keinen definitiven Selenmangel, der zu einer Beeinträchtigung der Aktivität der 5'-Deiodasen mit Folgen für die notwendige T₃-Bildung führen würde, da auch bei marginaler Selenzufuhr, diese beiden Enzyme ausreichend Selen erhalten. Mehrere Studien zeigen jedoch bei unzureichender Selenfunktion eine Beeinträchtigung der Schilddrüsenfunktion selbst (ältere Bevölkerung mit nicht ausgewogener Ernährung, Verzehr proteinarmer Spezialdiäten, Patienten mit destruktiven Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse) und Supplementation mit Selenverbindungen konnte hier positive Veränderungen bewirken. Ob eine unzureichende Selenversorgung auch die Entstehung und den Verlauf von Schilddrüsenkrebserkrankungen beeinflusst, kann noch nicht abschließend beurteilt werden. Im Rahmen groß angelegter Studien werden mögliche präventive Wirkungen von Selenverbindungen auf die Schilddrüsenhormonachse und andere Endpunkte hin untersucht.

Literatur: Zimmermann MB, Köhrle J (2002) The impact of iron and selenium deficiencies on iodine and thyroid metabolism: biochemistry and relevance to public health. *Thyroid* 12:867-878

Aspekte zur Pathologie der Matrix-Aktion von MMP's

Norbert Ulbrich, BioCol GmbH, Jägerallee 15, 14469 Potsdam

Umbauvorgänge der extrazellulären Matrix sind zeitlich klar definierte und strukturierte Prozesse an denen die Matrix Metalloproteinasen massgeblich beteiligt sind. Die gesunden Prozesse verlangen nach einem ausgeglichenem Wechselspiel in dem Matrix Metalloproteinasen, deren Aktivatoren und spezifische Hemmer, wechselwirken. Solche Prozesse sind die Embryonalentwicklung, die Morphogenese, die Reproduktion, Gewebe-Resorption bzw. Gewebeumbau, Angiogenese und die Zellwanderung. Werden diese Prozesse negativ moduliert oder gestört, kann die Induktion und Chronifizierung von Erkrankungen, die die Matrixintegrität des Binde- und Stützgewebe betreffen, einsetzen.

Die Zellen des Binde- und Stützgewebes können auf Kontakt mit antigenwirksamen Stoffen (Autoimmunogene, Viren und Bakterien, Lipopolysaccharide) nicht nur als antigenpräsentierende Zellen dienen sondern auch mit der Sekretion von Signalsubstanzen reagieren, wobei parakrin wirkende Mediatoren und entzündungsunterhaltende und knochenbau-beeinflussende Zytokine, insbesondere Interleukine (IL-1, IL-6, TNF-alpha) eine tragende Rolle spielen. Sie aktivieren die Zellen, die mit der Ausschüttung von Matrix-Metalloproteinasen und der Zerstörung der sie umgebenen bindegewebigen Matrix antworten. Dieses Reaktionsschema ist bei allen Zellen des Binde- und Stützgewebes ähnlich und äußert sich je nach Lokalisation in den unterschiedlichsten Erkrankungen des Binde- und Stützgewebes. Genannt seien zwei Volkskrankheiten, wie die rheumatoide Arthritis, bei der eine alles verdrängende Knorpel und Knochen zerstörende Synovialwucherung zu beobachten ist und die Parodontitis, eine Erkrankung des Zahnhalteapparates, die durch eine peridontale und gingivale Entzündung gekennzeichnet ist und die letztendlich über die Aktion von Matrix Metalloproteinasen zum Verlust des alveolaren Knochen, des Bindegewebes und der Zähne führt. Nicht zuletzt sei auch auf die hervorragende Rolle der Matrix Metalloproteinase in der Matrix/Gewebe Invasivität von Tumorzellen in der Metastase und der Tumor-Angiogenese, hingewiesen.

Uran in der Nahrungskette des Menschen, Verzehr, scheinbare Absorption und Bilanz

Manfred Anke, Olaf Seeber, Ulrich Schäfer

Institut für Ernährung und Umwelt, Friedrich-Schiller-Universität Jena,
D-07743 Jena

Die Verwitterungsböden des Granites erzeugen in Deutschland die uranreichste Vegetation, die des Rotliegenden, des Muschelkalkes, Lösses und Phyllites liefern 25 bis 30 % weniger Uran in die Nahrungskette und die des Buntsandsteins, Keupers, Gneisses und der diluviale Sand erzeugen eine um etwa 50 % uranärmere Flora als die des Granites. Der Urangehalt des Trinkwassers wird gleichermaßen durch die geologische Herkunft des Gesteins, welche dieses liefert, variiert. Trinkwasser aus Lebensräumen diluvialer Sande enthält nur 1 bis 10 % der Uranmengen, die in dem des Granites gefunden werden. Der Urangehalt der Pflanzen ist artabhängig, einjährige Pflanzen vermindern ihren Uranbestand mit zunehmendem Alter. Wild- und Kulturpflanzen aus der unmittelbaren Umgebung von Abräumhalden des Uranbergbaus können die zehnfache Uranmenge enthalten, die in Kontrollpflanzen auf geologisch gleichen Standorten abseits des Uranbergbaus vorkommen.

Blattreiche Pflanzenarten akkumulieren regelmäßig mehr Uran als blattarme. Knollen, Stengelverdickungen und Früchte sind uranarm. Der Urangehalt von 117 Nahrungsmitteln und Getränken (jeweils n 15) schwankte zwischen 0,7 bzw. 0,8 µg/kg Trockenmasse in Honig, Butter bzw. Margarine und 105 µg/kg in Mischpilzen, 50 µg/kg in Spargel und 40 µg/kg Trockenmasse in Majoran und Kopfsalat. In der Regel sind zucker-, stärke- und fettreiche Lebensmittel ebenso wie Früchte, Mehl und Fleisch uranarm, während Blattgemüse, Schwarztee, Kräuter und auch Hühnereier viel Uran enthalten können. Auch Säuglingsnahrung enthält wenig Uran. Ihr Urangehalt kann aber auf das 50-fache der in der Mutter- und Kuhmilch vorkommenden Uranmenge ansteigen, wenn uranreiches Mineralwasser zu ihrer Präparation verwendet wird.

Der Uranverzehr in Deutschland betrug zur Jahrtausendwende 2,7 µg/Tag im Wochenmittel. Er wurde bei 18 Testpopulationen aus jeweils mindestens sieben Frauen und Männern in Deutschland und Mexiko mit Hilfe der Duplikatmethode über sieben aufeinanderfolgenden Tagen ermittelt. Der Uranverzehr wird durch den Lebensraum hochsignifikant variiert. Die Testpopulationen auf pleistozänen Sanden (Norddeutschland) verzehrten nur ein Drittel der Uranmengen, die in Thüringen aufgenommen wurden. Der Lebensraum beeinflusst den Uranverzehr über den Urangehalt des Trink- und Mineralwassers hochsignifikant.

Die scheinbare Uranabsorptionsrate beider Geschlechter der Mischköstler erreichte 6 % und ist damit im Vergleich zu anderen Schwermetallen umfangreich. Die Uranbilanz der Frauen und Männer war mit – 2,4 und – 3,2 % ausgeglichen. Uran wird nicht im Körper akkumuliert. Der Urangehalt des Trink- und Mineralwassers bedarf der Kontrolle. Das gilt keineswegs nur für Uranbergbauggebiete, sondern für alle Lebensräume. Mineralwasser, das aus größerer Tiefe kommt, wo Granit ansteht, kann extrem uranreich sein.

Neurological deficits in mice lacking selenoprotein P. Lack of evidence for a developmental defect due to hypothyroidism

Ulrich Schweizer^{1,2}, Lutz Schomburg¹, Marten Michaelis¹, Josef Köhrle¹

1 Institute for Experimental Endocrinology, Charité University School of Medicine Berlin,

2 Neurobiology of Selenium, Charité University School of Medicine Berlin, Campus Mitte, Schumannstrasse 20/21, 10117 Berlin, Germany

The role of selenium (Se) for proper brain function is largely unresolved. This may be due to the fact that the brain, unlike e.g. the liver, effectively retains its Se during times of dietary Se restriction. Gene targeting and transgenic overexpression of selenoproteins have recently shed new light on this issue.

We have inactivated the gene for selenoprotein P (SePP) and observed neurological deficits in SePP knockout (KO) mice in spite of adequate Se supply through the diet (Schomburg, Schweizer et al., 2003). The most striking neurological phenotypes are recurrent seizures and a movement disorder, both of which are more severe under conditions of limited Se supply. The brains of SePP KO mice display strongly reduced Se levels as well as glutathione peroxidase and thioredoxin reductase activities. Increased dietary Se, however, normalizes brain Se levels and effectively prevents the development of the neurological phenotype, i.e. performance on the rotarod device and footprinting patterns of Se treated SePP KO mice were indistinguishable from their wildtype litter mates.

All thyroid hormone deiodinases are selenoenzymes. Neonatal hypothyroidism results in ataxia due to a developmental defect of the cerebellum that is mainly characterized by incomplete migration of granule neurons during the appropriate time window. We tested the hypothesis that SePP KO mice could suffer from local hypothyroidism due to impaired brain deiodinase activity that might result from reduced brain Se levels. Histological analysis of cerebellar development of SePP KO mice at postnatal days 11 (P11) and P21 did not support this hypothesis. In addition, SePP KO mice initially rescued by increased Se supply did develop the phenotype after Se withdrawal arguing for a degenerative rather than a developmental pathomechanism.

supported by the DFG and the Deutsche Krebshilfe e.V.

POSTER

NAA-Laboratory and Irradiation Service at BER II for Trace Element Analysis

D. Alber, G. Bukalis, , A. Kyriakopoulos, D. Behne
Hahn-Meitner-Institut, Berlin, Dept. Molecular Trace Element Research in the Life Sciences
Glienicke Str. 100, D-14109 Berlin, Germany

The laboratory for neutron activation analysis (NAAL) at the BERII provides radiation services for universities, scientific institutions and industry. Typical fields of applications are:

- Trace elements analysis with neutron activation analysis (NAA) for example in biology, medicine, geology and archeology. Certification of reference materials.
- Irradiation experiments, such as isotope production for medical applications, sources for Mößbauer spectroscopy and production of tracers for industrial applications.
- Doping of semiconductor materials and Transmutation.

The poster shows selected examples of the application of NAA.

Determination of selenium and zinc in very small amounts of human sperm nuclei

Holger Bertelsmann¹, Ulrich Rösick¹, Dorothea Alber¹, Antonios Kyriakopoulos¹, Mohammed Hammadeh² and Dietrich Behne¹

Hahn-Meitner-Institut Berlin, Dept. Molecular Trace Element Research in the Life Sciences¹
Department of Obstetrics & Gynecology, University of Saarland, Homburg/Saar²

The trace elements selenium and zinc are present in relatively high concentrations in the sperm nuclei of many mammalian species compared to other biological matter. Zinc appears to stabilize the integrity of the chromatin structure and selenium is necessary for the correct chromatin condensation of mammalian sperm nuclei. This event which is essential for fertility, leads to a tenfold reduction in volume of the chromatin compared to chromatin of somatic cells. This condensation is mediated through the replacement of somatic- type histone proteins to sperm- specific protamine proteins. Selenium in the sperm nuclei is restricted to the selenoenzyme snGPx with protamine related properties and zinc is bound to protamine P2 in humans.

In order to clarify the significance of these trace elements for fertility in humans the sperm nuclei from the semen of 19 different donors were isolated. An average quantity of 2,3 µg / million Spermatozoa were obtained from samples with a volume in the range of one millilitres.

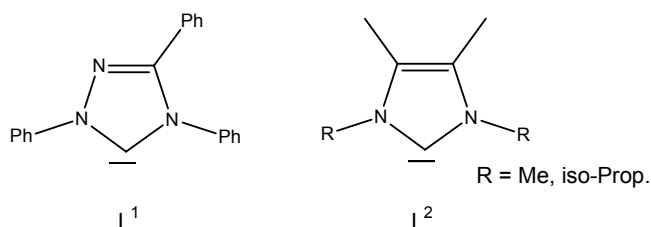
In this poster we present appropriate material, equipment and the evaluation of the analytical methods used for the trace element determination in very small amounts of biological samples. We also found positive correlation between selenium and zinc in human sperm nuclei.

Stabile Carbenkomplexe des Technetiums und Rheniums

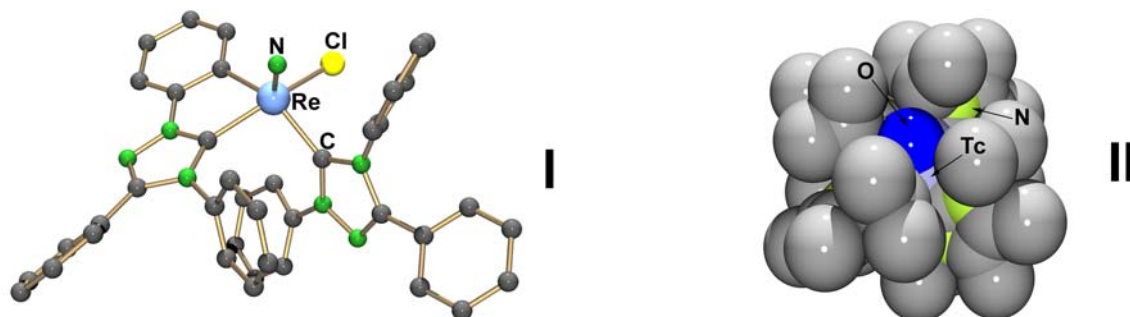
Henrik Braband, Theresa Kückmann, Ulrich Abram

FU Berlin, Institut für Chemie

Verbindungen der Elemente Technetium und Rhenium besitzen ein großes Anwendungspotential in der Nuklearmedizin. Um die Wirksamkeit und Selektivität neuer Radiopharmaka für diagnostische Zwecke und für die Radioimmuntherapie zu verbessern, sind in jüngster Zeit verstärkt Bemühungen unternommen worden, Biomoleküle mit metallorganischen Rhenium- und Technetiumkomplexen zu markieren. Ein neuer Ansatz ist dabei, die Verwendung von Technetium- und Rheniumkomplexen mit heteroatomstabilisierten Carbenen. Mit diesen Ligandensystemen konnten erste Modellverbindungen mit elektronenarmen Technetium- und Rheniumzentren synthetisiert und charakterisiert werden.



Bei der Umsetzung von Carbenen des Triazolyl-yliden- (L^1) und Imidazolyl-yliden-Typs (L^2) mit verschiedenen Rhenium- und Technetiumkomplexen wurden sehr differenzierte Reaktionsmuster gefunden. Während mit L^1 stabile Nitridokomplexe der Zusammensetzung $[\text{ReN}(L^1)\text{Cl}_2(\text{PMe}_2\text{Ph})_2]$ und $[\text{ReN}(L^1)(L^1\text{-H})\text{X}]$ (I) ($\text{X} = \text{Halogenid}$ oder Pseudohalogenid) isoliert werden konnten, aktivieren die nukleophileren Imidazolyl-Derivate den Nitridoliganden und es entstehen kationische Dioxokomplexe mit sterisch stark abgeschirmten Metallzentren (II).



Verbindungen beider Typen sind wasserstabil und für Kopplungsreaktionen an Biomoleküle interessant. Während bei den Nitridokomplexen Verknüpfungen über den nukleophilen Nitridoliganden oder durch Austausch des Halogenliganden denkbar sind, erfordern die stark abgeschirmten Dioxokomplexe Substitutionen in der Peripherie der organischen Liganden oder die Herstellung von Gemischtligandkomplexen, in denen ein Carbenligand durch eine Donorfunktion des Biomoleküls ersetzt ist.

Determination of trace elements and trace-element-containing proteins in the lung of the rat

K. Bukalis, A. Kyriakopoulos, D. Behne

Hahn-Meitner-Institut, Dep. "Molecular Trace Element Research in the Life Sciences"
Glienicker Str. 100, D-14109 Berlin, Germany

Depending on their chemical forms trace elements may have harmful or beneficial effects. This is especially true in case of the lung. As this organ is exposed to considerable oxidative stress, several metals and metalloids are needed as essential constituents of enzymes active in the antioxidative defense system. On the other hand toxic forms of metals and metalloids may be contained in aerosols and may be incorporated by inhalation. It is therefore of great interest to determine the trace elements present in the lung and to obtain information on their distribution, their chemical forms and their biological effects.

In the present study selenium, nickel and arsenic have been investigated in the lung of rats by means of several analytical and biochemical methods. Instrumental neutron activation analysis (INAA) has been used to determine the concentrations of several trace elements in the whole organ. Information on the distribution of selenium, nickel and arsenic among the subcellular fractions, separated by ultracentrifugation, was obtained by analyzing the nuclear, mitochondrial, microsomal and cytosolic fraction by means of graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). After fractionation of the cytosolic proteins by size exclusion chromatography, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) has been employed to determine the trace element-containing proteins on-line in the eluate. The selenium-containing proteins in the lung and its subcellular fractions have been investigated by labeling of rats *in vivo* with Se-75, gel electrophoretic separation of the proteins and autoradiographic detection of the tracer.

Our results show that the three elements are distributed inhomogeneously among the cellular compartments of the rat lung and are associated with various proteins. Further investigations will have to follow to identify these compounds and to elucidate their biological effects.

REGULATION OF MICROGLIAL ACTIVATION AND PROLIFERATION BY THE ESSENTIAL TRACE ELEMENT SELENIUM

**L. Dalla Puppa^{1,2}, N.E. Savaskan², I.Y. Eyüpoglu², A.U. Bräuer², A.
Kyriakopoulos¹,
D. Behne¹ & R. Nitsch²**

¹Hahn-Meitner-Institute, Department of Molecular Trace Element Research in the Life Sciences, Berlin, Germany. ²Department of Cell Biology & Neurobiology, Institute of Anatomy, Charité University Medical School Berlin, Berlin, Germany.

Oxidative brain damage, such as in excitotoxicity and stroke, leads to primary neuronal destruction which is potentiated by late-occurring secondary cell death response. This secondary neuronal cell death is mediated primarily by activated microglial cells. Here we report that simultaneous applications of and rescue experiments with selenium in oxidative damaged brain slices significantly prevent neuronal cell death. In addition, these protective selenium effects not only prevent neurons from cell death but also attenuate the secondary cell death cascade, due to the inhibition of microglial activation. In experiments with isolated microglia cells, selenium abrogates stress-induced cell adhesion molecules expression and activation. Furthermore, oxidative stress-induced cell rounding and migration in microglia is prevented by physiological selenium concentration.

Our results indicate the importance of the nutritionally essential trace element selenium for the prevention of neuronal cell death. Thus, selenium is not only beneficial for neurons but also inhibits microglial activation and thereby reduces secondary cell death.

DISPLACEMENT OF THE TYROSYL RADICAL COFACTOR IN RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE OBTAINED BY SINGLE-CRYSTAL HIGH-FIELD EPR AND 1.4-Å X-RAY DATA

Marcus Galander^{*}, Martin Högbom[#], Martin Andersson[#], Matthias Kolberg^{*§}, Pär Nordlund[#] and Friedhelm Lenzian^{*}

^{*}Max-Volmer-Laboratorium für Biophysikalische Chemie, Institut für Chemie, Technische Universität Berlin, PC 14, Straße des 17. Juni 135, D-10623 Berlin

[#]Department of Biochemistry and Biophysics, Stockholm University, Albanova University Centre, Roslagstullsbacken 15, SE-10691 Stockholm, Sweden

[§]present address: Department of Biochemistry, University of Oslo, N-0316 Oslo, Norway

Das stabile Tyrosin Radikal Y122[•] in der Nähe des zweikernigen Eisenzentrums (aktiver Zustand Fe(III)Fe(III)...Y122[•]) in der Untereinheit R2 der Klasse I der Ribonukleotid-Reduktase ist der Ausgangspunkt einer Elektron-Proton Transfer-Reaktion, welche in der Untereinheit R1 ein postuliertes Cystein Radikal (C439[•]) erzeugt, das seinerseits die Reduktion des Ribonukleotids auslöst. Ein detaillierter Mechanismus zur Funktion wurde auf der Basis von Untersuchungen mittels ortsgerechter Mutagenese und sowie der Röntgenstrukturanalyse [1] vorgeschlagen, wobei aber keinerlei strukturelle Informationen über das Radikal selbst gewonnen werden konnten.

In unserer Untersuchung wurde das Tyrosin Radikal erstmalig in Enzym-Kristallen erzeugt, und diese mit Hilfe von Hochfeld EPR (94 GHz) vermessen. Hochfeld EPR erlaubt eine wesentlich bessere Auflösung des g-Tensors von Tyrosin-Radikalen [2] und die Untersuchung erheblich kleinerer Kristalle [3]. Wir nahmen ein volles Rotationsspektrum des Kristalls auf und analysierten es mit einem selbstgeschriebenen Simulationsprogramm (simplex downhill und simulated annealing), welches gleichzeitig für alle Kristallebenen die orientierungsabhängigen Spektren simuliert. So konnte eindeutig die Orientierung des g-Tensors, welcher direkt die Orientierung des Radikals widerspiegelt, in Bezug zum Kristallachsensystem bestimmt werden [4]. Die EPR-Struktur-Daten wurden im Vergleich mit der 1.42 Å Röntgenstruktur der Met-Form (Fe(III)Fe(III)...Y122-OH) diskutiert. Dieser Vergleich zeigt klar eine Rotation der Seitenkette des Tyrosin-Radikals, weg vom zweikernigen Eisenzentrum. Die sich daraus ergebenden möglichen Schlussfolgerungen für den katalytischen Elektron-Proton Transfer werden diskutiert.

[1] Eklund, H., Uhlin, U., Färnegårdh, M., Logan, D.T. & Nordlund, P. (2001) *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **77**, 177-268.

[2] Bleifuss, G., Kolberg, M., Pötsch, S., Hofbauer, W., Bittl, R., Lubitz, W., Gräslund, A., Lassmann, G. & Lenzian, F. (2001) *Biochemistry* **40(50)**, 15362-15368

[3] Hofbauer, W., Zouni, A., Bittl, R., Kern, J., Orth, P., Lenzian, F., Fromme, P., Witt, H.T. & Lubitz W. (2001) *PNAS* **98**, 6623-6628.

[4] Högbom, M., Galander, M., Andersson, M., Kolberg, M., Hofbauer, W., Lassmann, G., Nordlund, P. & Lenzian, F. (2003) *PNAS* **100**, 3209-3214.

Immunocytochemical staining reveals localization of type I 5'-deiodinase in the follicular cells of the thyroid gland and reduced expression in thyroid carcinoma

Emine Griebert (1), Cornelia Schmutzler (1), Birgit Mentrup (1), George G. J. M. Kuiper (2), Theo J. Visser (2) and Josef Köhrle (1)

(1) Institut für Experimentelle Endokrinologie und Endokrinologisches Forschungs-Centrum der Charité EnForCé, Campus Charité Mitte, Charité, Universitätsmedizin Berlin, Schumannstraße 20/21, D-10117 Berlin, Germany and (2) Department of Internal Medicine, Room Bd 234, Erasmus University Medical Center, P.O. Box 1738, 3000DR Rotterdam, The Netherlands.

Type I 5'-deiodinase (5'DI) is involved in the metabolism of thyroid hormones. This enzyme catalyzes both the activation of the "prohormone" T₄ to the biologically active T₃ and the inactivation of thyroid hormones and their metabolites. High 5'DI activity is mainly found in the liver, the kidney and the euthyroid pituitary. In the thyroid gland, 5'DI is a sensitive differentiation marker, as its expression and activity are high in the normal thyroid gland, but reduced to undetectable in thyroid carcinomas in correlation to their degree of de-differentiation.

Here, we used *in situ* hybridization of frozen sections and immunocytochemistry of paraffin sections to study the expression of 5'DI in thyroid tissues.

By *in situ* hybridization, 5'DI signals were detected in the thyrocytes of rat thyroids. An antiserum was raised against a C-terminal peptide of feline 5'DI and used in Western blots. 27 kDa bands, corresponding to the substrate binding catalytic subunit of 5'DI, were detected in tissue samples and cell lines deriving from the liver or the thyroid gland of rat, mouse, pig or human origin. The antiserum also stained tubular regions and parenchymal cells in human kidney and liver sections, respectively. In human goiter samples, staining for 5'DI was solely confined to the intracellular compartment of the thyrocytes. Signals were of variable intensity differing from follicle to follicle, and within follicles, signal intensity varied between individual thyrocytes. Stromal cells, blood vessels and lymphocytic infiltrates of pathological thyroid tissues were free of staining. A tissue microarray was used to study expression levels of 5'DI protein in 11 thyroid carcinomas and matched normal controls (1 undifferentiated, 3 follicular and 7 papillary thyroid carcinomas). Down-regulation of 5'DI protein levels was seen in all of the 11 matched thyroid normal/cancer pairs examined.

In summary, our results suggest a localization of 5'DI exclusively in the epithelial cells of the thyroid gland and a reduced expression in thyroid carcinomas.

Supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Selenium-containing proteins in the cells involved in the blood-brain barrier

B. Hoppe, A. Kyriakopoulos, D. Behne
Hahn-Meitner Institut, Dept. "Molecular Trace Element Research in the Life Sciences", Glienicker Str. 100, D-14109 Berlin

It has been shown in many studies that selenium is of special importance for the brain. This is emphasized by the fact that with insufficient selenium supply the organism strives to maintain above all the selenium level the central nervous system. In our research we are concerned with the investigation of the role of selenium in the different types of brain cells and in the identification and characterization of the selenoproteins involved in this processes.

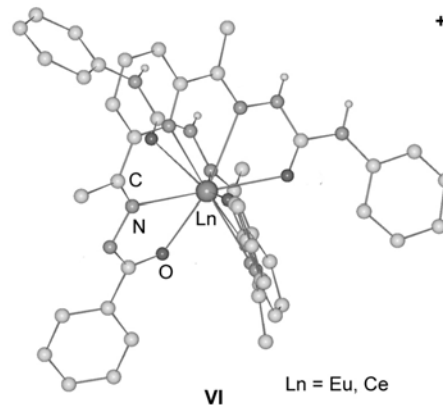
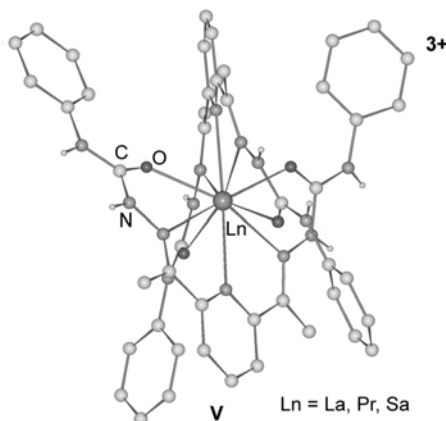
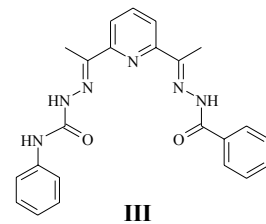
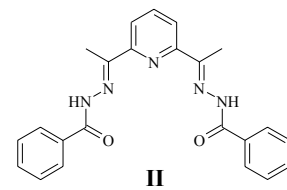
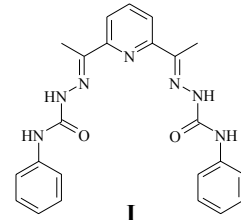
In the present study we have been investigating the selenium-containing proteins in the endothelial cells and the connecting astrocytes. These two cell types contribute to the special barrier functions of the blood-brain barrier (BBB) that is crucial for maintaining and controlling the supply to this organ. A cell culture model of blood-brain barrier has been developed to investigate the uptake and incorporation of selenium into both cell types. After labeling with ^{75}Se - selenite and proliferation, the cells were harvested separately and the selenium-containing proteins determined by SDS- PAGE and two-dimensional electrophoresis and autoradiographic detection of the tracer distribution among the separated proteins. In this way more than 18 selenium-containing proteins in each cell types could be distinguished. The patterns and the differences between the two cell types will be discussed.

Vielzählige Hydrazon- und Semicarbazon-Liganden zur Komplexierung nuklearmedizinisch interessanter Lanthanoide

Alexander Jagst (FU-Berlin), Agustín Sanchez Díaz (Universität Santiago de Compostela, Spanien), Ezequiel Vazquez Lopez (Universität Vigo, Spanien), Ulrich Abram (FU-Berlin)

Radioaktive Isotope von Lanthanoiden und verwandten Elementen (^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{90}Y) besitzen ein beträchtliches Potential in der Radioimmunotherapie. Da eine direkte Koordination der Metall-Ionen an Donoratome nativer Biomoleküle meist zu entscheidenden Funktionsbeeinträchtigungen führt, besteht Interesse an Liganden, die Ln^{3+} -Ionen effektiv chelatisieren, ihre Ladung kompensieren und zur Kopplung an Proteine geeignet sind. Semi- bzw. Thiosemi-carbazone erscheinen dafür aufgrund ihrer zusätzlichen antibakteriellen und cytostatischen Wirkung als vielversprechend. Wir synthetisierten durch Derivatisierung mit Semicarbaziden und Benzoylhydrazin eine Reihe von Liganden, die sich alle von 2,6-Diacetylpyridin ableiten (**I** – **III**) und untersuchten deren Komplexbildung mit La^{3+} , Ce^{3+} , Pr^{3+} , Sm^{3+} und Eu^{3+} .

Die potentiell fünfzähligen Liganden bilden mit diesen Ionen Bis-Komplexe, deren Nettoladung sich aus dem Anteil von Benzoylhydrazon-Einheiten ergibt, die im Gegensatz zu Semicarbazon-Seitenarmen bei der Komplexbildung deprotoniert werden. Während mit bis-substituierten Semicarbazonen ausschließlich dreifach positiv geladene Komplexe vom Typ **IV** entstehen, gelingt die Synthese von einfach kationische Lanthanoid-Komplexen (**V**) mit unsymmetrischen Liganden, die sowohl Benzoylhydrazon-, als auch Semicarbazon-Seitenketten tragen. Die Bis-Chelate besitzen meist die



Koordinationszahl 10 und die Koordinationspolyeder lassen sich als zweifach überkappte Würfel bzw. Antiprismen beschreiben. Die Koordination eines zusätzlichen Ethanol-Liganden wird lediglich beim Lanthan-Komplex beobachtet.

Neurodegenerative disorders investigated with Micro-SRXRF, Micro-XANES and SRFTIR-Spectromicroscopy

M. Kühbacher¹; G. Weseloh¹; G. Falkenberg²; U. Schade³; A. Kyriakopoulos¹; D. Behne¹

¹ *Hahn-Meitner-Institut Berlin, Department Molecular Trace Element Research in the Life Sciences, D-14109 Berlin, Germany*

² *Hamburger Synchrotronstrahlungslabor HASYLAB at Deutsches Elektronen Synchrotron DESY, Notkestr. 85, D-22603 Hamburg, Germany*

³ *Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung mbH, Rudower Chaussee 5, D-12489 Berlin, Germany*

Most of the metals and metalloids present in the mammalian organisms are bound to proteins. These metalloproteins play a central role as structural or catalytic components. Metalloproteomics, i.e. proteomics focused on the metalloproteins, require specific bioanalytical tools to identify these compounds and study their distribution and biological functions.

Microprobe-synchrotron radiation X-ray fluorescence (micro-SRXRF) has been applied to determine the distribution of a larger number of elements within a tissue. In studies carried out at HASYLAB, micro-SRXRF has been optimized with regard to its use in trace element mapping in histological tissue sections. The possibility of micro-X-ray absorption near edge structure (micro-XANES) has been tested. XANES can provide information about vacant orbitals, electronic configuration, site symmetry and oxidation state of the absorbing atom.

The use of synchrotron light, which covers the complete electromagnetic spectrum from infrared radiation to hard X-rays, offers the possibility to combine the micro-SRXRF analyses with synchrotron radiation-based Fourier transform infrared (SRFTIR) spectromicroscopy which may give information on the biochemical environment of the elements of interest.

The application of the combined methods in the investigation of metals and metalloids in neurodegenerative disorders will be discussed: In brain tissues, knowledge about the spatial distribution of certain metals, as copper, zinc and manganese, may help to explain the etiology of Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE). TSE's such as scrapie in sheep, Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) in cattle, or Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in man are infectious neurodegenerative disorders of the central nervous system (CNS). The TSE's are associated with the accumulation of an abnormal form of a host-encoded glycoprotein, PrP_{Sc}, which is found in nerve and glial cells throughout the brain. Its N-terminal region was found to bind copper, zinc, and manganese, and changes in the binding of these two metals may play a role in the pathogenesis of TSE's. The distribution of several metals and metalloids in cryo-sections of 10 µm thin brain sections of TSE affected Syrian hamsters and control animals were investigated.

Localization of selenoproteins in the cell compartments of the kidney and liver of the rat

A. Kyriakopoulos, A. Graebert, K. Bukalis, C. Kiesel, D Alber and D. Behne
Hahn-Meitner-Institut, Berlin, Dept. Molecular Trace Element Research in the Life Sciences
Glienicke Str. 100, D-14109 Berlin

Investigations have been performed on rats to obtain information on the distribution of selenoproteins in the subcellular fractions, especially in the membranes of the cell compartments in the liver and kidney. For the determination of the selenium content instrumental neutron activation analysis via ^{75}Se was used. Membrane-bound selenium-containing proteins were detected by labeling of rats with ^{75}Se -selenite, subcellular fractionation of the tissue homogenates, separation of the proteins by electrophoretic techniques and detection of ^{75}Se by autoradiography (1,2). In this way in the present study a large number of selenium-containing proteins have been detected in the hepatic and renal microsomal fractions separated by differential fractionation. In the kidney seven of the selenium-containing proteins with molecular masses of about 15, 16, 20, 23-25, 42-44, 58-60, and 72 kDa were found in the endoplasmic reticulum. The bands with molecular masses of 15 and 20 kDa and those in the range of 23-25, 42-44 and 58-60 kDa could be attributed to known selenoproteins. A further ^{75}Se -labeled 16 kDa protein, which had been detected in an earlier study (3), was characterized as a selenocysteine-containing selenoprotein with an isoelectric point of 5.4. At present the 72 kDa-protein can only be classified as a selenium-containing protein. In the lysosomal fraction of the liver three ^{75}Se -labeled bands were found, two with molecular masses in the ranges of 60-58 and 50-48 kDa, similar to the apparent masses of thioredoxin reductase and the isoforms of SelP, and the third in the molecular mass range of 76-75 kDa. For the latter an isoelectric point between 7.0 and 7.2 was determined. By means of RP-HPLC it was characterized as a selenocysteine-containing protein.

Möglichkeiten der Laserablation-ICP-Massenspektrometrie zur Identifizierung von Metallo- und Metalloidoproteinen durch Scannen von gelelektrophoretisch getrennten Proteinen

A. Plotnikov, A. Kyriakopoulos, D. Behne

Hahn-Meitner-Institut Berlin, Abteilung „Molekulare Spurenelementforschung in den Biowissenschaften“, Glienicker Str. 100, D-14109 Berlin
E-Mail: plotnikov@hmi.de

Die Laserablation-ICP-MS (LA-ICP-MS) ist eine nachweisstarke Methode zur Multielementanalyse im Spuren- und Ultraspurenbereich, die als Scan-Verfahren die schnelle Bestimmung von Elementverteilungen in Probenoberflächen erlaubt. Dadurch wird sie attraktiv für die Untersuchung der Verteilung von proteingebundenen Spurenelementen nach der Trennung durch Gel-Elektrophorese. Diese befinden sich in Polymermembranen, auf die sie nach dem Trennprozess vom Gel transferiert werden. Durch die Verwendung der Scan-LA-ICP-MS, bei der die Fokusposition des Laserstrahls während der Ablation mit konstanter Wiederholungsrate des Laserpulses parallel zur Probenoberfläche verschoben wird, werden sowohl Nachweisgrenze als auch Analysenzeit reduziert. Allerdings sind diese Vorteile des Scan-Verfahrens wegen der Dispersion beim Transport des laserinduzierten Aerosols aus der Ablationszelle auch mit einem gewissen Verlust an Ortsauflösung verbunden. Weiterhin wird das Profil des transienten analytischen Signals im Vergleich zum wahren Konzentrationsprofil etwas verzerrt [1].

Es wurde ein Algorithmus der Quantifizierung von transienten Messdaten durch eine zweifache Entfaltungsprozedur vorgeschlagen. Bei dem ersten Schritt werden durch Anwendung der Parameter der analytischen Antwort auf einen einzelnen Laserschuss die Eigenschaften des Transportsystems (Ablationszelle und Transportschläuche) berücksichtigt. Der Einfluss der Transportphänomene ist besonders wichtig bei der Analyse der Polymermembranen, da diese aufgrund ihrer Abmessungen eine große Ablationszelle erfordern. Im zweiten Schritt wird die Geometrie der Projektion des Laserstrahls auf die Probenoberfläche berücksichtigt.

Der Erfolg der Entfaltungsprozedur hängt stark von der Qualität der Messdaten ab, die sich aus dem Signal-Rausch-Verhältnis ergibt. Von Vorteil ist hier der Einsatz von Lasern mit kürzeren Wellenlängen (213 oder 193 nm), bei denen die Partikel des laserinduzierten Aerosols klein genug sind, um die Entstehung von Spitzen des Mess-Signals zu vermeiden.

Literatur

[1] A. Plotnikov, C. Vogt, K. Wetzig, *J. Anal. Atom. Spectrom.* **9** (2002) 1114-1120

Selenoprotein W expression in the human brain and its function in neurons

Ingo Przesdzing, Nicolai E. Savaskan, Robert Nitsch & Anja U. Bräuer

Dept. Cell Biology and Neurobiology, Institute of Anatomy, Charité University Medical School Berlin

Using differential hippocampus cDNA library screening we recently identified Selenoprotein W (SelW) transcripts upregulated following brain trauma. Despite the fact, that SelW is expressed in organs like liver, testis, and heart, high levels are found in the brain. There, SelW is exclusively expressed in neurons, whereas glial cells are devoid of any SelW positive signals.

Brain selenium levels, in contrast to selenium levels in other organs, retain high even after long-term selenium depletion, indicating its importance for proper brain function. However, while some selenoproteins are transcriptionally down-regulated under selenium deficiency, SelW mRNA is not affected. This points to a high ranking of SelW in the selenoprotein hierarchy. In human brain, selenoprotein W mRNA is expressed in pyramidal neurons. High expression of SelW mRNA was also found in human neuronal cell lines. To elucidate the functional role of SelW in the brain, we constructed various SelW bearing constructs fused to reporter genes. In first experiments we could demonstrate that SelW is located in the cytosol.

Transfection studies with neuronal cells are underway to test whether SelW is as neuroprotective as selenoprotein P is. Therefore we are using common neurotoxic compounds such as glutamate, NO, and GSH interfering drugs. Furthermore, RNA interference assays will be performed to unravel SelW function beyond its proposed neuroprotective effects.

This study was supported by the DFG priority program (SPP322-1087).

Bestimmung des spurenelementabhängigen antioxidativen Systems bei geriatrischen Patienten mit Schlaganfall

Bausenhardt-Ahl C. (1), Rückgauer M. (2), Zeyfang A. (1)

(1) Samariterstift Aalen, Geriatrische Rehabilitationsklinik, Aalen

(2) Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Katharinenhospital, Stuttgart

Die Arteriosklerose, eine der Ursachen eines Schlaganfalls, wird u.a. durch oxidative Prozesse ausgelöst. In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob bei geriatrischen Schlaganfallpatienten ($n=83$, Alter: $76,8 \pm 6,7$ Jahre; 37% Männer) im Vergleich zu einer gesunden Referenzgruppe ($n=30$, Alter $34,5 \pm 8,1$ Jahre, 23% Männer) Veränderungen im spurenelementabhängigen antioxidativen System bestehen und in welchem Zusammenhang dazu biometrische, metabolische und klinisch-geriatrische Parameter sowie die Intima-Media-Dicke der Arteria carotis communis stehen. Die Konzentrationen von Kupfer, Zink und Selen in Vollblut, Plasma und Erythrozyten wurden atomabsorptionsspektrometrisch bestimmt, die Aktivitäten der Superoxiddismutase und der Glutathionperoxidase wurden kinetisch und die Lipidperoxidation über eine Farbreaktion ermittelt.

Die **Kupfergehalte** der Patientengruppe waren gegenüber der Referenzgruppe im Plasma um 19,6% erhöht und in den Erythrozyten um 34,7% vermindert (p jeweils $<0,001$). Die Plasmawerte stiegen mit dem Alter an ($r=0,23$, $p=0,039$) und lagen bei weiblichen Patienten um 15,3% höher als bei männlichen ($p=0,06$ und $p=0,001$). Die Kupferkonzentrationen in Plasma und Vollblut korrelierten positiv mit der Blutsenkungsgeschwindigkeit ($r=0,37$ und $r=0,43$, p jeweils $<0,001$). Höhere Plasmawerte waren ferner mit einer höheren Konzentration an Gesamt- und LDL-Cholesterin verbunden ($p=0,003$ bzw. $p=0,01$). Die Kupfergehalte im Plasma lagen bei androider Waist-to-Hip-Ratio um 12,2% höher als bei gynoider Fettverteilung ($p=0,031$). Entgegengesetzt zu den Kupfer- waren die **Zinkgehalte** im Plasma vermindert und in den Erythrozyten erhöht (10,9%, $p=0,016$ bzw. 20,7%, $p=0,001$). Für die **Selengehalte** wurden im Vollblut um 37,2%, im Plasma um 21,7% und in den Erythrozyten um 33,3% niedrige Werte gefunden (alle $p<0,001$). Einen noch weiter verminderten Selenstatus hatten geriatrische Schlaganfallpatienten mit KHK, pAVK und mit einer nicht verbesserten Mobilität im Verlauf des Reha-Aufenthalts gegenüber nicht betroffenen Patienten.

Zwischen den Selenwerten in Vollblut, Plasma und Erythrozyten und der **Glutathionperoxidase**-Aktivität in Erythrozyten bestand ein positiver Zusammenhang ($r=0,34$, $p=0,002$; $r=0,36$, $p=0,004$ und $r=0,34$, $p=0,002$). Entsprechend war bei den Patienten auch die Aktivität der Glutathionperoxidase in Erythrozyten um 11,7% erniedrigt ($p=0,042$). Die Aktivität der **Superoxiddismutase** lag um 48,7% niedriger ($p<0,001$) und die Lipidperoxidation um 48,4% höher als in der Referenzgruppe ($p=0,003$). Positive Zusammenhänge bestanden zwischen der **Lipidperoxidation** und den Kupfergehalten in Vollblut oder Plasma ($r=0,64$, $p<0,001$ bzw. $r=0,69$, $p<0,001$), sowie zwischen der Waist-to-Hip-Ratio und der Blutsenkungsgeschwindigkeit. Sowohl in der Referenz- als auch in der Patientengruppe zeigten Frauen einen höheren oxidativen Stress als Männer (p jeweils $<0,001$).

Die bei geriatrischen Schlaganfallpatienten gewonnenen Daten weisen auf ein deutlich vermindertes Spurenelement-abhängiges antioxidatives System hin, verbunden mit erhöhtem prooxidativen Potential und erhöhtem oxidativen Stress. Der verminderte Schutz korreliert mit Entzündungs- und Stoffwechselfparametern und ist bei Schlaganfallpatienten mit schlechterem klinisch-geriatrischen Bild unabhängig vom Ernährungsstatus (gemessen als Body-Mass-Index) noch weiter beeinträchtigt. Der prooxidative Status der Patienten ist damit als (Mit-)Ursache für die Entstehung der Arteriosklerose anzusehen.

Changes of Copper Distribution in Syrian Hamster Brain with Aging, as investigated with the SRXFA- Microprobe

Weseloh, G.¹; Kühbacher, M.¹; Falkenberg, G.²; Kyriakopoulos, A.¹; Behne, D.¹:

Hahn-Meitner-Institut, Berlin, Dept. Molecular Trace Element Research in the Life Sciences
Glienicke Str. 100, D-14109 Berlin¹

Alterations of metal levels with aging have been associated with normal aging processes and a variation of disease states, including alzheimer's disease, parkinson's disease and transmissible spongiforme encephalopathies (TSEs). Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) are a common model for the investigations of TSEs such as scrapie and bovine spongiforme encephalopathies (BSE).

Examinations with the synchrotron-radiation x-ray fluorescence microprobe (μ -SRXF) reveal marked alterations of the distribution of the essential trace element copper within selected regions of the hamster brain with age. These findings may stimulate further research on the role of copper in the aging brain.