

# **Biochemische und molekularbiologische Effekte einer suboptimalen Manganversorgung bei der wachsenden Ratte**

**Klaus Brandl**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. oec. troph.)  
am Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Aus dem Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Josef Pallauf

---

**Biochemische und molekularbiologische Effekte  
einer suboptimalen Manganversorgung  
bei der wachsenden Ratte**

---

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. oec. troph.)  
am Fachbereich Agrarwissenschaften,  
Ökotoxikologie und Umweltmanagement  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
**KLAUS BRANDL**  
aus Lahnau

Gießen 2010

Dissertation am Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und  
Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen

- Dekanin: Prof. Dr. Ingrid-Ute Leonhäuser -

Vorsitzender: Prof. Dr. S. Hoy

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Pallauf

2. Gutachter: Prof. Dr. E. Weigand

Prüferin: Prof. Dr. I. Bitsch

Prüfer: Prof. Dr. U. Wenzel

Tag der mündlichen Prüfung: 19.03.2010

*Meinen Eltern,  
meiner Frau Michi  
und meinem Sohn Justus*



## Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Tabellen .....	III
Verzeichnis der Abbildungen .....	V
Verzeichnis der Abkürzungen .....	VII
Verzeichnis der Anhangstabellen .....	VIII
1 Einleitung .....	1
2 Literaturübersicht .....	2
2.1 Mangan .....	2
2.1.1 Grundlagen .....	2
2.1.2 Essentialität .....	2
2.1.3 Mangan in der Tierernährung .....	3
2.1.4 Stoffwechsel und biochemische Funktionen .....	3
2.1.5 Klinische und subklinische Mangelsymptome unterschiedlicher Species .....	10
2.1.6 Empfehlungen zur Manganversorgung unterschiedlicher Species .....	12
2.1.7 Toxizität .....	13
2.2 Möglichkeiten und Grenzen der Microarraytechnologie .....	15
Fragestellung .....	19
3 Experimenteller Teil .....	20
3.1 Stoffwechselversuch .....	20
3.1.1 Versuchstiere .....	20
3.1.2 Versuchsdiet .....	20
3.1.3 Versuchsdurchführung .....	22
3.1.4 Gewinnung und Aufbereitung des Analysenmaterials .....	23
3.2 Analytische Methoden .....	23
3.2.1 Analyse der Diäten .....	23
3.2.2 Blutanalysen .....	24
3.2.3 Analyse der Organ- und Gewebeproben .....	25
3.2.4 Differenzielle Genexpressionsanalyse mittels cDNA Microarray .....	26
3.2.5 Wiederholung der Differenziellen Genexpressionsanalyse .....	28
3.2.6 Verifizierung der differenziellen Genexpressionsanalyse - Northern Blot der MnSOD-mRNA .....	28
3.2.7 Verifizierung der differenziellen Genexpressionsanalyse - RT-PCR der MnSOD-mRNA .....	31
3.2.8 Verifizierung der differenziellen Genexpressionsanalyse - RT-PCR der MT1-mRNA .....	32
3.2.9 Bestimmung der mitochondrialen, manganabhängigen Superoxiddismutase (MnSOD) .....	32
3.2.10 Arginasebestimmung .....	34
3.2.11 Bestimmung des totalen antioxidativen Status (TAOS) .....	35
3.2.12 Bestimmung der Thiobarbitursäure reaktiven Substanzen (TBA-RS) .....	36
3.2.13 Metallothioneinbestimmung .....	37
3.2.14 Proteinbestimmung .....	37

3.3	Statistische Auswertung und Ergebnisdarstellung .....	38
4	Ergebnisse .....	39
4.1	Rohnährstoffkonzentrationen und Bruttoenergie der Versuchsdäten.....	39
4.2	Mineralstoffkonzentrationen der Versuchsdäten .....	39
4.3	Versuchsverlauf .....	40
4.4	Zootechnische Parameter .....	40
4.5	Blutparameter .....	41
4.6	Mangankonzentrationen in Leber, Femur und Plasma .....	42
4.7	Elementkonzentrationen in Leber und Femur .....	43
4.8	Differenzielle Genexpressionsanalyse mit cDNA-Microarrays .....	43
4.9	Wiederholung der Differenziellen Genexpressionsanalyse.....	47
4.10	Verifizierung der differenziellen Genexpressionsanalyse - Northern Blot der MnSOD-mRNA .....	50
4.11	Verifizierung der differenziellen Genexpressionsanalyse - RT-PCR der MnSOD-mRNA .....	50
4.12	Verifizierung der differenziellen Genexpressionsanalyse - RT-PCR der MT1-mRNA.....	51
4.13	Bestimmung der mitochondrialen, manganabhängigen Superoxiddismutase (MnSOD) .....	52
4.14	Arginasebestimmung .....	56
4.15	Bestimmung des totalen antioxidativen Status (TAOS) .....	57
4.16	Bestimmung der Thiobarbitursäure reaktiven Substanzen (TBA-RS).....	58
4.17	Metallothioneinbestimmung .....	59
5	Diskussion .....	60
5.1	Versuchsdät .....	60
5.2	Einfluss des Mangans auf zootechnische Parameter und Blutparameter .....	60
5.3	Mangan- und weitere Elementkonzentrationen im Gewebe.....	62
5.4	Differenzielle Genexpressionsanalyse mittels Microarrays .....	63
5.5	Einfluss des Mangans auf die Genexpression .....	71
5.6	Einfluss des Mangans auf Enzymaktivitäten und Parameter des oxidativen Stresses.....	75
6	Schlussfolgerungen .....	80
7	Zusammenfassung .....	82
8	Summary .....	86
9	Literaturverzeichnis .....	90
10	Anhang.....	108

## Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1:	Empfehlungen zur Manganversorgung unterschiedlicher Species .....	12
Tabelle 2:	Als Futterzusatzstoffe zugelassene Manganverbindungen (GEMEINSCHAFTSREGISTER DER FUTTERMITTELZUSATZSTOFFE GEMÄSS DER VERORDNUNG (EG) Nr. 1831/2003) .....	13
Tabelle 3:	Zusammensetzung der Versuchsdäten .....	21
Tabelle 4:	Angestrebte Mineralstoffgehalte in den Diäten .....	22
Tabelle 5:	Versuchsplan .....	22
Tabelle 5:	Analytisch ermittelte Gehalte an Rohnährstoffen (%) und Brutto- energie (kJ/g) der Versuchsdäten bezogen auf die Frischmasse .....	39
Tabelle 6:	Analytisch ermittelte Mineralstoffgehalte der Versuchsdäten, bezogen auf die Anfangsmasse .....	40
Tabelle 7:	Futteraufnahme (g) pro Versuchswoche und Futtermittelverwertung (FV g Futter/g Zunahme) der Ratten über den 6wöchigen Versuchszeitraum .....	41
Tabelle 8:	Lebendmasse (g) und tägliche Zunahme (g/d) der Ratten über den 6wöchigen Versuchszeitraum .....	41
Tabelle 9:	Hämatokrit (%), Hämoglobin (g/dL) und Blutglucose (mg/dL) der Ratten nach 6 Versuchswochen .....	42
Tabelle 10:	Mangankonzentrationen in Leber (mg/kg FM), Femur ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ FM) und Plasma ( $\mu\text{g}/\text{l}$ ) der Ratten nach 6 Versuchswochen und im Vergleich dazu in der Leber der $t_0$ -Gruppe zu Versuchsbeginn .....	42
Tabelle 11:	Mineralstoffkonzentrationen im Lebergewebe der Ratten nach 6 Versuchswochen .....	43
Tabelle 12:	Mineralstoffkonzentrationen im Femur der Ratten nach 6 Versuchswochen .....	43
Tabelle 13:	Einfluss eines Manganmangels auf die Genexpression in der Rattenleber nach 6 Versuchswochen (Signifikanzfaktor > 2,5) (I = Gruppe I – Mn; III = Gruppe III + Mn a.l.) .....	44
Tabelle 14:	Einfluss eines Manganmangels auf die Genexpression in der Rattenleber nach 6 Versuchswochen (Faktor > 2) (Wiederholungsuntersuchung mit dem Atlas Rat Toxicology 1.2 Array) (I = Gruppe I – Mn; II = Gruppe II + Mn p.f.) .....	48
Tabelle 15:	Einfluss eines Manganmangels auf die Genexpression in der Rattenleber nach 6 Versuchswochen (Faktor > 2) (Neuauswertung des Atlas Rat Toxicology 1.2 Array der ersten Untersuchung) (I = Gruppe I – Mn; III = Gruppe III + Mn a.l.) .....	49
Tabelle 16:	RT-PCR-Quantifizierung der MnSOD-mRNA (relative optische Dichte/ $\text{mm}^2$ bezogen auf GAPDH) in der Rattenleber .....	51
Tabelle 17:	RT-PCR-Quantifizierung der MT1-mRNA (relative optische Dichte/ $\text{mm}^2$ bezogen auf GAPDH) in der Rattenleber .....	52

---

Tabelle 18:	MnSOD-Aktivität in der Rattenleber bestimmt mit der Methode nach MARKLUND und MARKLUND (1974).....	53
Tabelle 19:	Densitometrische Auswertung der MnSOD-PAGE mit jeweils 40 µg bzw. 80 µg Protein (relative optische Dichte/mm <sup>2</sup> ).....	54
Tabelle 20:	MnSOD-Aktivität in der Rattenleber bestimmt durch die Methode nach CRAPO et al. (1978).....	55
Tabelle 21:	Arginasebestimmung in der Rattenleber durch die Methode nach ÖZER (1985).....	56
Tabelle 22:	Totaler antioxidativer Status nach MILLER et al. (1993) der Rattenleber in mM TEAC (Trolox Equivalent Antioxidative Capacity) in prozentualer kompetitiver Hemmung der Radikalbildung im Vergleich zum Blindwert nach 2 min bzw. 3 min Inkubation.....	57
Tabelle 23:	TBA-RS (nmol/g Leber FM) in der Rattenleber bestimmt durch die Methode nach GÜNTHER et al. (1994).....	58
Tabelle 24:	Metallothioneinkonzentration (µg/g Protein bzw. µg/g Leber FM) in der Rattenleber bestimmt durch die Methode nach EATON und TOAL (1982).....	59

## Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1:	Die enzymatische Reaktion der MnSOD basiert auf einem katalytischen Zyklus mit zwei Reaktionshälften. Zum einen wird das Superoxidradikal zu O <sub>2</sub> oxidiert und zum anderen wird es zu H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> reduziert (X = dead end complex) (nach BULL et al. 1991 bzw. Hsu et al. 1996).....	6
Abb. 2:	Schematische Anordnung der Gene auf einem Atlas <sup>TM</sup> Rat Microarray. In der unteren Reihe befinden sich die Housekeeping Gene (Positionen 11, 13, 15, 27, 29, 31, 43, 45, 47), Negativkontrollen (04, 20, 36) und zusätzliche Orientierungspunkte für die Software-Auswertung (01, 02, 18, 34).....	27
Abb. 3:	Reaktionsschema der photochemischen Bestimmung der SOD-Aktivität.....	34
Abb. 4:	Mit Methylenblau angefärbter RNA-Blot .....	50
Abb. 5:	RT-PCR Gelscan der MnSOD-mRNA-Expression (361 bp) nach 25 (oben links), 27 (oben rechts) und 29 PCR-Zyklen (unten links) sowie der GAPDH-m-RNA-Expression (303 bp) nach 29 PCR-Zyklen (unten rechts).....	51
Abb. 6:	RT-PCR Gelscan der MT1-mRNA-Expression (186 bp) nach 17 (oben links), 19 (oben rechts) und 21 Zyklen (unten links) sowie der GAPDH-mRNA-Expression (303 bp) nach 21 Zyklen (unten rechts)...	52
Abb. 7:	Beispiel eines NBT-gefärbten Gels nach nativer PAGE der Leberhomogenate (B, D = Gruppe I – Mn; A, C = Gruppe II + Mn p.f.; Kleinbuchstaben = 40 µg Protein, Großbuchstaben = 80 µg Protein) .	54
Abb. 8:	Lebendmasseentwicklung (g) der wachsenden Ratten über den 6wöchigen Versuchszeitraum.....	61
Abb. 9:	Hämatokrit (%), Hämoglobin (g/dl) und Blutglucose (mg/dl) der Ratten nach 6 Versuchswochen (unterschiedliche Kleinbuchstaben markieren signifikante Gruppenunterschiede: p < 0,05) .....	61
Abb. 10:	Mangankonzentrationen in Leber (mg/kg), Plasma (µg/l) und Femur (µg/kg) der Ratten nach 6 Versuchswochen (unterschiedliche Großbuchstaben markieren hochsignifikante Gruppenunterschiede: p < 0,01) .....	62
Abb. 11 a:	Korrelationsanalyse der Intensitäten mit Beispielen von signifikant beeinflussten Genen (L08831 = gastric inhibitory polypeptide precursor; M18547 = 40S ribosomal protein S12; M84716 = 40S ribosomal protein S3A, vgl. Tabelle 13a) und Phosphorimages des Atlas Rat 1.2 Array (erste Untersuchung) der RNA-Pools aus Gruppe I (- Mn) und Gruppe III (+ Mn a.l.). Die Pfeile zeigen ein Beispiel nicht berechneter Intensitäten für einen Genspot durch die hohe Intensität eines benachbarten Genspots .....	67
Abb. 11 b:	Korrelationsanalyse der Intensitäten mit Beispielen von signifikant beeinflussten Genen (U05014 = Sprague/Dawley PHAS-I protein; X15741 = polymeric immunoglobulin receptor; X13549 = 40S ribosomal protein S10, vgl. Tabelle 13b) und Phosphorimages des	

	Atlas Rat 1.2 Array II (erste Untersuchung) der RNA-Pools aus Gruppe I (- Mn) und Gruppe III (+ Mn a.l.).....	68
Abb. 11 c:	Korrelationsanalyse der Intensitäten und Phosphorimages des Atlas Rat Toxicology 1.2 Array (erste Untersuchung) der RNA-Pools aus Gruppe I (- Mn) und Gruppe III (+ Mn a.l.). Die Pfeile zeigen zwei Beispiele nicht berechneter Intensitäten für Genspots durch die hohe Intensität eines jeweils benachbarten Genspots (J00750 = metallothionein 1, vgl. Tabelle 13c).....	69
Abb. 12:	Korrelationsanalyse der Intensitäten und Phosphorimages des Atlas Rat Toxicology 1.2 Array (Wiederholungsuntersuchung) der RNA-Pools aus Gruppe I (- Mn) und Gruppe II (+ Mn p.f.) (J00750 = metallothionein 1, vgl. Tabelle 14).....	70
Abb. 13:	Aktivität der MnSOD (A = Methode nach MARKLUND and MARKLUND 1974; B = Methode nach CRAPO et al. 1978) und der Arginase in den Leberhomogenaten der Ratten nach 6 Versuchswochen bezogen auf den Proteingehalt (unterschiedliche Buchstaben markieren signifikante Gruppenunterschiede: Großbuchstaben $p < 0,01$ , Kleinbuchstaben $p < 0,05$ ).....	77
Abb. 14:	Der totale antioxidative Status (TAOS) nach 2 bzw. 3 Minuten Reaktionszeit, die Thiobarbitursäure reaktiven Substanzen (TBA-RS) als Maß der Lipidperoxidation und die Metallothioneinkonzentration (MT) bezogen auf den Proteingehalt in den Leberhomogenaten der Ratten nach 6 Versuchswochen (unterschiedliche Buchstaben markieren signifikante Gruppenunterschiede: Großbuchstaben $p < 0,01$ , Kleinbuchstaben $p < 0,05$ ).....	79

## Verzeichnis der Abkürzungen

- <sup>32</sup>P-dATP = radioaktiv markiertes Desoxyadenosintriphosphat  
a.l. = ad libitum  
AAS = Atomabsorptionsspektrometrie  
ABTS = 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate)  
ALP = Alkalische Phosphatase  
AP = Activator Protein  
ATP = Adenosintriphosphat  
BHT = Butylhydroxytoluol  
bp = Basenpaare  
C/EBP = CCAAT/enhancer-binding-proteins  
cDNA = complementary DNA  
Cts = Counts pro Minute  
DCT1 = divalenter Kationentransporter 1  
DEPC = Diethylpyrocarbonat  
DNA = Desoxyribonukleinsäure  
FM = Frischmasse  
FV = Futtermittelverwertung  
fw = forward  
GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase  
GS = Glutaminsynthetase  
Hb = Hämoglobin  
HK = Hämatokrit  
ICP-AES = Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry  
IFN- $\gamma$  =  $\gamma$ -Interferon  
IL = Interleukin  
I $\kappa$ B = inhibitorische  $\kappa$ B-Proteine  
LPS = Lipopolysaccharide  
M = arithmetischer Mittelwert  
MGED = Microarray Gene Expression Data  
MIAME = Minimum Information about a Microarray Experiment  
MRE = metallresponsive Elemente  
mRNA = messenger Ribonukleinsäure  
MT = Metallothionein  
MTF-1 = MRE-bindender Transkriptionsfaktor-1  
NBT = Nitrobluetetrazolium  
NF-1 = Nuclear Factor 1  
NF- $\kappa$ B = Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells  
OD = optische Dichte  
p.f. = pair fed  
PAGE = Polyacrylamidgelelektrophorese  
PC = Pyruvatcarboxylase  
PEPCK = Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase  
PGE2 = Prostaglandin E2  
rev = reverse  
ROS = reaktive Sauerstoffspezies  
RT-PCR = Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction  
SAGE = Serial Analysis of Gene Expression  
SD = Standardabweichungen der Einzelwerte  
SOD = Superoxiddismutase  
SOD1 = Cu/ZnSOD  
SOD2 = MnSOD  
SZ = Sicherheitszuschlag  
TAE = TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)-Acetat-EDTA (Ethylendiamintetraacetat)  
TAOS = totaler antioxidativer Status  
TBA-RS = Thiobarbitursäure reaktive Substanzen  
TEAC = Trolox Equivalent Antioxidant Capacity  
TEP = Tetraethoxypropan  
TM = Trockenmasse  
TNF- $\alpha$  = Tumor Necrosis Factor- $\alpha$   
Tth = Thermus thermophilus  
USF1 = Upstream Stimulatory Factor 1  
VDLUFA = Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten  
VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor

## Verzeichnis der Anhangstabellen

Anhangstab. 1:	Mittels Flammen-AAS analysierte Mangangehalte (mg/kg) in den Einzelkomponenten der Diäten, in den Mengen- und Spurenelementverbindungen für die Mineralstoffmischung, in der Mineralstoffmischung, in der Manganmischung und in den Endmischungen der Diäten für die Gruppen I (- Mn) sowie II (+ Mn p.f.) und III (+ Mn a.l.) ..... 108
Anhangstab. 2:	Futtermenge (g) nach Versuchswoche und Futtermenge (FM g Futter/g Zunahme) der Ratten über den 6wöchigen Versuchszeitraum ..... 109
Anhangstab. 3:	Lebendmasse (g) und tägliche Zunahmen (g/d) der Ratten über den 6wöchigen Versuchszeitraum ..... 110
Anhangstab. 4:	Hämatokrit (HK %), Hämoglobin (Hb g/dl) und Blutglucose (mg/dl) der Ratten nach 6 Versuchswochen ..... 111
Anhangstab. 5:	Mangankonzentrationen in Leber (mg/kg FM), Femur (µg/kg FM) und Plasma (µg/l) der Ratten nach 6 Versuchswochen und im Vergleich dazu in der Leber der t <sub>0</sub> -Gruppe zu Versuchsbeginn ..... 112
Anhangstab. 6:	Mineralstoffkonzentrationen im Lebergewebe der Ratten nach 6 Versuchswochen ..... 113
Anhangstab. 7:	Mineralstoffkonzentrationen im Femur der Ratten nach 6 Versuchswochen ..... 114
Anhangstab. 8:	MnSOD-Aktivität im Lebergewebe der Ratten nach 6 Versuchswochen ..... 115
Anhangstab. 9:	Densitometrische Auswertung der nativen MnSOD-PAGE mit jeweils 40 µg bzw. 80 µg Protein und Arginaseaktivität im Lebergewebe der Ratten nach 6 Versuchswochen ..... 116
Anhangstab. 10:	Totaler antioxidativer Status in mM TEAC (Trolox Equivalent Antioxidative Capacity) und in prozentualer kompetitiver Hemmung der Radikalbildung im Vergleich zum Blindwert nach 2 min bzw. 3 min Inkubation im Lebergewebe der Ratten nach 6 Versuchswochen ..... 117
Anhangstab. 11:	Metallothioneinkonzentration und Thiobarbitursäure reaktive Substanzen (TBA-RS) im Lebergewebe der Ratten nach 6 Versuchswochen ..... 118

# 1 Einleitung

Mangan ist ein essentielles Spurenelement für den Säugerorganismus. Es ist Bestandteil verschiedener Metalloenzyme und erfüllt so wichtige Funktionen im Kohlenhydrat- und Proteinstoffwechsel sowie bei antioxidativen Abwehrreaktionen. Einige dieser Enzyme sind nicht spezifisch auf Mangan angewiesen, sondern können auch andere divalente Kationen, wie z.B. Magnesium binden. Zu den Enzymen, deren Funktion ausschließlich durch Mangan gewährleistet wird, gehören unter anderem die mitochondriale Form der Superoxiddismutase (MnSOD oder SOD2) und die Arginase. Während solche biochemischen Funktionen des Mangans, bzw. die Auswirkungen niedriger bzw. erhöhter alimentärer Manganzufuhr bei unterschiedlichen Species bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen waren, existieren bisher mit Ausnahme der MnSOD-mRNA keine Studien zur Auswirkung suboptimaler Manganversorgung auf die Genexpression.

Der alimentäre Versorgungsstatus mit Nährstoffen kann auf direktem und/oder indirektem Weg, durch deren Metabolite bzw. die durch diese induzierten Stoffwechselbedingungen, Einfluss auf die Genexpression ausüben. Ziel dieser Arbeit soll es daher sein, in einem Stoffwechselversuch mit wachsenden Ratten die Auswirkungen einer Manganunterversorgung zum einen auf verschiedene biochemische Parameter und zum anderen auf die Genexpression zu untersuchen. So soll mittels differenzieller Genexpressionsanalyse unter Verwendung von cDNA-Microarrays geprüft werden, welche Gene unter den Versuchsbedingungen beeinflusst werden bzw. ob im Umkehrschluss anhand eines Genexpressionsmusters auf eine Manganunterversorgung geschlossen werden kann. Im Vergleich der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse mit einer Reihe von biochemischen Parametern sollen Rückschlüsse darauf gezogen werden, ob die Beeinflussung von Enzymen bzw. Proteinen durch eine Manganunterversorgung auf prae- oder posttranskriptionaler Ebene stattfindet, bzw. welchen weiteren Einflussfaktoren diese Veränderungen unterliegen können.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Mangan

#### 2.1.1 Grundlagen

Mangan ist das mit 0,085 % in der oberen Erdkruste am zweithäufigsten enthaltene Schwermetall, kommt in der Natur nur in Verbindungen und nicht in reiner Form vor und tritt häufig zusammen mit Eisen auf (auf 60t Eisen kommt 1t Mn). Die häufigsten Verbindungsformen im Mineralgestein sind Pyrolusit ( $MnO_2$ ), Manganit ( $MnO(OH)$ ), Braunit ( $Mn_2O_3$ ) und Rhodochrosit ( $MnCO_3$ ). In Mikroben, Pflanzen und Säugetieren kommt Mangan in Spuren vor, Böden müssen als Voraussetzung für das Wachstum von photosynthesefähigen Pflanzen Mangan enthalten (COTZIAS 1961, LEACH and LILBURN 1978, SAKURAI et al. 1982, FALBE und REGITZ 1991). Mangan gehört zu den unedlen Metallen, hat die Ordnungszahl 25 und besteht als anisotopes Element ausschließlich aus dem Isotop 55. Daneben existieren noch die künstlichen Isotope 49 – 62, von welchen das  $^{54}Mn$  für Bilanzstudien eingesetzt wird. Mangan kann als einziges chemisches Element in elf unterschiedlichen (-III bis +VII) Oxidationsstufen auftreten, wobei im Säugetierorganismus nur die Oxidationsstufen +II und +III vorkommen, und zwar proteingebunden oder in freier ionischer Form (FALBE und REGITZ 1991). Mangan ist eines der wenigen reichlich vorkommenden Spurenelemente, wobei die Gesamtkörperkonzentration etwa bei 1 % der Konzentration an Zink bzw. bei 20 % der Konzentration an Kupfer liegt (UNDERWOOD and SUTTLE 1999).

#### 2.1.2 Essentialität

Zum ersten Mal wurde die Essentialität von Mangan in den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts bei Mäusen und Ratten nachgewiesen. Die Tiere zeigten in Folge eines alimentär herbeigeführten Manganmangels Wachstums- und Fertilitätsstörungen (KEMMERER et al. 1931, ORENT and MCCOLLUM 1931). In der Folgezeit konnte gezeigt werden, dass das Auftreten der Geflügelkrankheit Perosis bzw. Chondrodystrophie durch mit Mangan supplementierte Diäten verhindert werden konnte (LYONS and INSKO 1937, WILGUS et al. 1937). Erst in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts konnten die biochemischen Zusammenhänge der Ursachen der Manganmangelsymptome aufgezeigt werden. Durch seine Funktion im aktiven Zentrum der Pyruvatcarboxylase, der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und der

Arginase erfüllt Mangan wesentliche Funktionen im Kohlenhydrat- und Protein-Stoffwechsel (FRIEDMANN and RASMUSSEN 1970, HIRSCH-KOLB et al. 1970, 1971, CARVAJAL et al. 1971, SCRUTTON et al. 1972, WIMHURST and MANCHESTER 1973, BOND et al. 1983, BALY et al. 1984, 1985a, 1985b, HURLEY et al. 1984, KANYO et al. 1992). Als ein wesentlicher Bestandteil der mitochondrialen Form der Superoxiddismutase (MnSOD bzw. SOD2) verfügt Mangan zudem über antioxidative Eigenschaften (PAYNTER 1980, ZIDENBERG-CHERR et al. 1983). Weiterhin ist Mangan essentiell für die Aktivierung der Glycosyltransferasen zur Synthese von Mucopolysacchariden des Knorpels (LEACH 1971). Des Weiteren fungiert Mangan als Aktivator weiterer Enzyme (Hydrolasen, Kinasen, Decarboxylasen, Transferasen).

### **2.1.3 Mangan in der Tierernährung**

Auf Getreide basierende Futtermittel können in Abhängigkeit von Boden-pH, Feuchtigkeitsgehalt, Wachstumsdauer und Düngung zwischen 40 und 200 mg Mangan / kg TM variieren, Grünfutter kann im Bereich zwischen 40 und 900 mg/kg liegen (HURLEY and KEEN 1987). Die Mangangehalte in Futtermitteln aus Leguminosen und Mais liegen allgemein niedriger als bei Getreide. Futtermittel tierischen Ursprungs weisen mit maximal 2 - 4 mg/kg sehr niedrige Mangankonzentrationen auf (MITCHELL 1957, WHITE et al. 1981, KEEN et al. 1984, MINSON 1990). Im Vergleich zu anderen Spurenelementen ist die Entstehung eines Mangels an Mangan durch die gute Versorgung über die Böden weniger wahrscheinlich. Andererseits ist die Diagnose eines Manganmangels am lebenden Tier in Haaren bzw. Blut komplizierter als bei anderen Spurenelementen (COMBS et al. 1982, KEEN et al. 1983, CLEGG et al. 1986, COMBS 1987). Die Wichtigkeit einer adäquaten Manganversorgung zeigt sich am deutlichsten bei der Ernährung des Geflügels (GREVE et al. 1987, OCHRIMENKO et al. 1992, LIU et al. 1994).

### **2.1.4 Stoffwechsel und biochemische Funktionen**

Mangan wird von Pflanzen in Form von Mn(II)-Salzen aufgenommen und spielt dort eine wichtige Rolle in der Photosynthese als Bestandteil des Wasser spaltenden Enzyms P680. Manganreiche Nahrungs- und Futtermittel sind daher hauptsächlich pflanzlicher Herkunft, also Gemüse, Vollkornprodukte, Nüsse, Keimlinge, Kakao, Tee, Gewürze. Die Zufuhr an Mangan über die Nahrung beträgt beim erwachsenen Menschen etwa 2 – 22 mg/d (PETERSON and SKINNER 1931, SCHROEDER et al. 1966, HURLEY and KEEN 1987).

Im sauren Milieu des Magens wird das Mangan aus seinen Verbindungen in die ionische Form (Oxidationsstufen +II und +III) überführt. In Duodenum und proximalem Jejunum erfolgt die Manganabsorption in den Enterocyten über den divalenten Kationentransporter 1 (DCT1), welcher auch für die Absorption von Eisen zuständig ist. Wie bei der Eisenabsorption spielen Mucine eine wichtige Rolle, um das Mangan in Lösung zu halten. Die Manganabsorption wird durch hohe Diätgehalte an Eisen, Calcium, Phosphor, Rohfaser und Phytinsäure negativ beeinflusst. Die Ursache hierfür liegt in der Konkurrenz um den gleichen Transporter bzw. in der Bildung unlöslicher Komplexe (VAN BRUWAENE et al. 1984, JOHNSON and KORYNTA 1992, DAVIDSSON et al. 1995, GUNSHIN et al. 1997, CONRAD and UMBREIT 2000). Zudem hat die Fettzusammensetzung der Nahrung einen indirekten Einfluss, da die Eisenabsorption bei hohem Gehalt an gesättigten Fettsäuren in der Nahrung höher ist als wenn viele mehrfach ungesättigte Fettsäuren zugeführt werden. So konnte bei geringer Manganzufuhr ein negativer Einfluss von Stearinsäure auf die Absorption festgestellt werden (FINLEY and DAVIS 2001).

Die scheinbare Manganabsorption aus der Nahrung ist mit 2 – 15 % bei Monogastriern und mit etwa 1 % bei Wiederkäuern relativ niedrig, wobei die Absorptionsrate mit dem Gehalt an Mangan in der Nahrung invers korreliert. Diese geringe Absorption stellt andererseits einen guten Schutz vor einer oralen Manganintoxikation dar (HIDIROGLOU 1979, WEIGAND et al. 1986, WEDEKIND and BAKER 1990, HENRY et al. 1992, SMITH et al. 1995, FINLEY et al. 1997).

Im Portalblut liegt Mangan als Mn II in freier Form oder gebunden an  $\alpha_2$ -Macroglobulin und Albumin vor. Nach der Oxidation von Mn II zu Mn III bindet es an Transferrin und wird so zur Leber transportiert (COTZIAS 1958, DAVIDSSON et al. 1989).

Die Leber scheint die zentrale Rolle in der Manganhomöostase zu spielen, da das absorbierte Mangan zum größten Teil sehr schnell über Lysosomen in die Galle (enterohepatischer Kreislauf) und damit wieder in das Darmlumen gelangt und auf diesem Weg aus dem Körper ausgeschieden wird. Die Manganausscheidung über den Urin und endogene Quellen (Schweiß, Haut, Haare, Zellabschilferungen) ist dagegen sehr niedrig und scheint bei niedriger alimentärer Manganzufuhr noch weiter eingeschränkt zu werden. Die scheinbare Manganabsorption ist bei Neugeborenen höher als beim Erwachsenen, was auf die verminderte biliäre

Ausscheidung zurückzuführen ist (BERTINCHAMPS et al. 1966, LEE and JOHNSON 1988, DAVIS et al. 1992, 1993).

In den Leberzellen ist Mangan hauptsächlich in Mitochondrien (MnSOD) und in den Zellkernen und kurz nach oraler Zufuhr in Lysosomen lokalisiert. Weiterhin liegt es an Proteine gebunden (z.B. Metalloenzyme) oder als freies  $Mn^{2+}$  vor. In anderen Geweben werden die höchsten Mangankonzentrationen in den Mitochondrien und im Zellkern gefunden. Mit Ausnahme der Knochen, des Pankreas und der Nieren (bei der Ratte auch der Schilddrüse und der Nebennieren) finden sich in anderen Geweben relativ niedrige Mangankonzentrationen, da hier keine Akkumulation stattfindet. Die Ganzkörperkonzentration bei verschiedenen Spezies liegt abhängig vom jeweiligen Gewebe zwischen 0,5 und 3,5 mg/kg. Allerdings konnten nach der Gabe hoher Dosen Mangans (bis zu 500 mg/kg Diät) an mangandepletierte Tiere deutlich erhöhte Gewebkonzentrationen gemessen werden, besonders in Leber, Niere, Pankreas, Nebenniere, Milz, Muskel und Knochen. Diese Zunahmen an Mangan im Gewebe bei sehr hohen Aufnahmen scheinen aber eher auf Mängel bei der Homöostase als auf eine verbesserte Speicherung hinzudeuten (COTZIAS et al. 1966, SAKURAI et al. 1985, HALPIN and BAKER 1986, MASTERS et al. 1988, GRACE and LEE 1990, LEACH and HARRIS 1997, GAVIN et al. 1999).

Mangan fungiert im Organismus als Bestandteil von Metalloenzymen und aktiviert Hydrolasen, Kinasen, Decarboxylasen und Transferasen. Manganhaltige, bzw. vorwiegend durch Mangan aktivierte Enzyme sind Mangansuperoxiddismutase (MnSOD), Arginase, Pyruvatcarboxylase, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK), Glutaminsynthetase und die Glycosyltransferasen (SCRUTTON et al. 1966, HIRSCH-KOLB et al. 1971, WEISIGER and FRIDOVICH 1973, POWELL and BREW 1976, SCHRAMM et al. 1981). Eine große Zahl weiterer Enzyme, wie z.B. Mevalonatkinase (→ Cholesterinbiosynthese), Tyrosinkinase (Insulinrezeptorkinase → Autophosphorylierung) und Caspase (→ Einfluss auf die Apoptose) können durch Mangan aktiviert werden. Die Aktivierung erfolgt entweder durch direkte Bindung an das Protein oder durch Bindung an ein Substrat. Bei diesen nicht manganspezifisch aktivierten Enzymen kann eine Aktivierung auch durch andere divalente Kationen (z.B.  $Mg^{2+}$ ) erfolgen (WHITE et al. 1984, GARCIA-MARTINEZ et al. 1982, SWARUP et al. 1984, SCHULTE et al. 2000, OUBRAHIM et al. 2001, 2002). Weiterhin werden für biotechnologische Applikationen manganabhängige Enzyme mikrobiellen Ursprungs eingesetzt, wie die thermostabile Tth- (*Thermus thermophilus*) Catalase (→

Entgiftung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  z.B. bei der Textilbleichung) und die Tth-DNA-Polymerase ( $\rightarrow$  zum Einsatz in der PCR) (TABOR and RICHARDSON 1989, HIDALGO et al. 2004). Abhängig von der jeweiligen Species kann sich ein Manganmangel bzw. -überschuss demnach in Form unterschiedlicher Störungen und Symptome auswirken.

### MnSOD (SOD2)

Die Funktion der mitochondrialen Form der Superoxiddismutase (MnSOD oder SOD2) liegt in der Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), insbesondere des Superoxidradikals ( $2 \text{O}_2^{\cdot -} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ ), welches im Gewebe als Nebenprodukt der mitochondrialen Atmungskette entsteht. Bei der Dismutation des Superoxidradikals unterliegt das Mangan im aktiven Zentrum der MnSOD einem ständigen Wechsel zwischen den Oxidationsstufen +II und +III (Abb. 1).

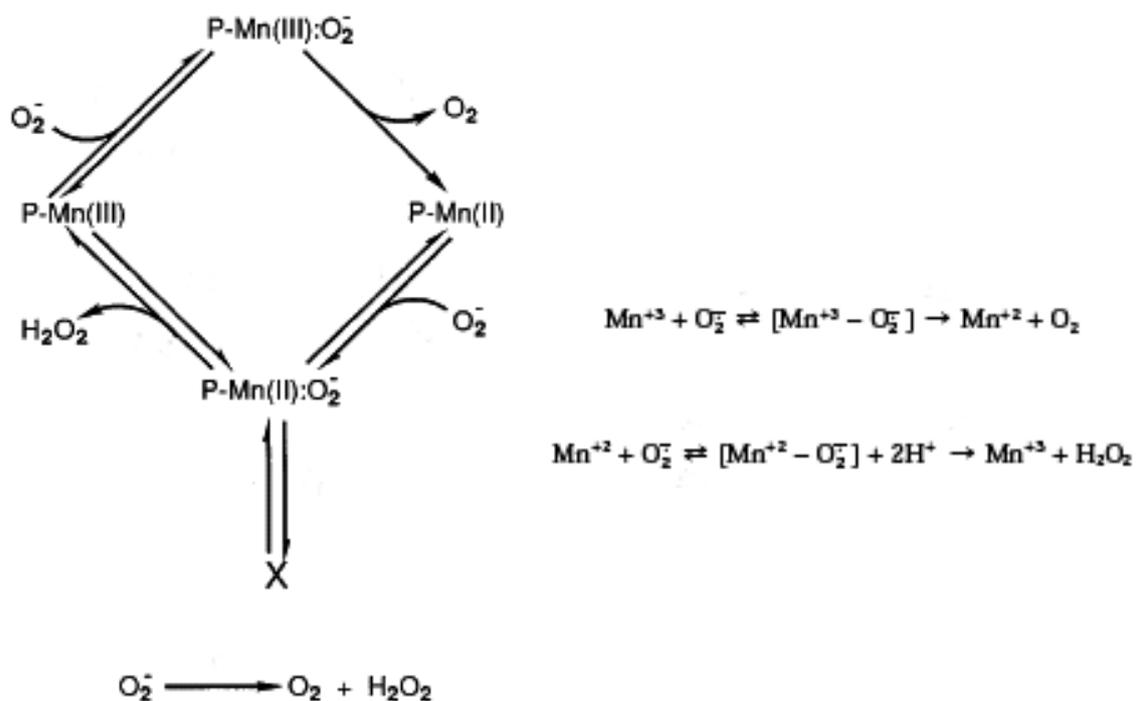


Abb. 1: Die enzymatische Reaktion der MnSOD basiert auf einem katalytischen Zyklus mit zwei Reaktionshälften. Zum einen wird das Superoxidradikal zu  $\text{O}_2$  oxidiert und zum anderen wird es zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduziert (X = dead end complex) (nach BULL et al. 1991 bzw. HSU et al. 1996).

Die MnSOD ist ein homotetramer angeordnetes Protein, unterscheidet sich in der Struktur also von der homodimeren cytosolischen Cu/ZnSOD (SOD1). Eine weitere Form der SOD ist die extrazelluläre, Cu/Zn-abhängige SOD3, welche auch tetramer aufgebaut ist (FRIDOVICH 1976, BANNISTER et al. 1987, ROBERTS et al. 1991, LAMB et

al. 2001, ZELKO et al. 2002). Beide Enzyme gehören zu unterschiedlichen Genfamilien, wobei die Genexpression der MnSOD u.a. durch die folgenden, teils redoxsensitiven Faktoren beeinflusst wird: NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells), VEGF (vascular endothelial growth factor), Thioredoxin, C/EBP (CCAAT/enhancer-binding-proteins) und NF-1 (nuclear factor 1) (DAS and WHITE 1997, BORRELLO and DEMPLÉ 1997, FLOHE et al. 1997, XU et al. 1999, ABID et al. 2001, MURLEY et al. 2001). Die Transkription der SOD2 wird in unterschiedlichen Geweben und Zelltypen stimuliert durch Zytokine wie Interleukin (IL)-1, IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), LPS (Lipopolysaccharide) und IFN- $\gamma$  ( $\gamma$ -Interferon) (MASUDA et al. 1988, WONG and GOEDEL 1988, VISNER et al. 1990, 1992, DOUGALL and NICK 1991, HARRIS et al. 1991, WHITE et al. 2000, ROGERS et al. 2001). Zu einer Hemmung der SOD2-Expression kommt es durch erhöhte Level des Transkriptionsfaktors AP-2 (activator protein-2), welcher eine verminderte Promotoraktivität hervorruft (ZHU et al. 2001). Die Expression der MnSOD wird nicht nur auf der Stufe der Transkription beeinflusst, sondern auch posttranskriptional, wobei hier die Stabilität der mRNA eine Rolle spielt (DAVIS et al. 2001). Die Translationseffizienz wird durch ein RNA-Bindungsprotein erhöht, welches in dephosphorylierter Form an die MnSOD-mRNA bindet, dessen Bindungsaktivität allerdings durch die Phosphorylierung durch Tyrosinkinase gehemmt werden kann (CHUNG et al. 1998, KNIRSCH and CLERCH 2001).

Ob ein direkter Einfluss des Mangans auf die Genexpression der MnSOD existiert, ist noch nicht umfassend geklärt. THONGPHASUK et al. (1999) zeigten, dass in kultivierten humanen Brustkrebszellen durch Manganchlorid die mRNA-Expression der MnSOD induziert werden kann. BORRELLO et al. (1992 a) brachten eine down-Regulation der MnSOD im Manganmangel auf prätranskriptionalem Level mit der Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies auf redoxsensitive Transkriptionsfaktoren in Verbindung. Neben der Manganversorgung unterliegt die Aktivität der MnSOD also eher anderen Einflussfaktoren, insbesondere dem oxidativen Stress durch hohe Zufuhr an Alkohol, an ungesättigten Fettsäuren und nicht-Häm-Eisen (JIRALERSPONG et al. 2001).

Im Manganmangel wurden bei Labortieren und Schweinen Schädigungen an Mitochondrienmembranen, Zellmembranen und DNA festgestellt, welche zum überwiegenden Teil auf eine reduzierte Aktivität der MnSOD zurückzuführen waren (BELL and HURLEY 1974, HURLEY and BELL 1974, ZIDENBERG-CHERR et al. 1983, MALECKI et al. 1994, MALECKI and GREGER 1996, ROBINSON 1998, MACMILLAN-CROW

and CRUTHIRDS 2001). Ein Knockout der MnSOD bei Mäusen führte innerhalb von acht Tagen zum Tod. Bei den Tieren wurden dilatative Kardiomyopathie, Leberdysfunktion, metabolische Acidose, Veränderungen der mitochondrialen Enzymatik und oxidative DNA-Schädigungen festgestellt (HUANG et al. 2001, LEBOVITZ et al. 1996, MELOV et al. 1998).

### Arginase

Neben der antioxidativen Wirkung spielt Mangan auch eine wichtige Rolle im Aminosäure-, bzw. Stickstoffmetabolismus und bei der Säuren-Basen-Regulation des Organismus. Eine Funktion liegt in der Ausscheidung bzw. Entgiftung des im Zellstoffwechsel durch Desaminierung von Aminosäuren entstehenden cytotoxischen Ammoniaks. Die Ammoniakausscheidung erfolgt über die Harnstoffsynthese in der Leber. Die im Cytosol vorliegende manganhaltige Arginase hydrolisiert als terminales Enzym des Harnstoffzyklus Arginin zu Ornithin und Harnstoff. Eine durch Manganmangel reduzierte Harnstoffsynthese führt zu einer Erhöhung der Ammoniakkonzentration im Plasma und damit zu einer chronischen Vergiftung des Organismus (KIRCHGESSNER and HEISEKE 1978, BROCK et al. 1994, ASH et al. 2000). Die Aktivität der Arginase ist allerdings neben der Manganversorgung auch abhängig von der alimentären Proteinzufuhr, von Hormonen und von bestimmten Krankheiten (z.B. Diabetes, Leberschädigungen). In der Leber ist die Aktivität 15- bis 5000fach höher als in anderen Geweben (HERZFELD and RAPER 1976). Zudem unterscheidet sich die homotrimere Arginase je nach Gewebe. Es existieren zwei Isoformen, die hepatische Arginase I und die extrahepatischen Arginase II-Typen, wobei sich die genetische Regulation der beiden Isoformen unterscheidet (SALIMUDDIN et al. 1999). Die Genexpression der auch im peripheren Gewebe vorkommenden Arginase I ist glucocorticoidempfindlich, vermittelt durch die C/EBP-Transkriptionsfaktoren (GOTOH et al. 1997), während die Arginase II-Expression durch IL-4, IL-10, PGE2 (Prostaglandin E2) und LPS stimuliert werden kann (CORRALIZA et al. 1995, MODOLELL et al. 1995, SONOKI et al. 1997). Weiterhin gibt es unterschiedliche Formen der Leberarginase bei unterschiedlichen Species, z.B. ist die Leberarginase der Ratte ein basisches Protein und die des Kaninchens sauer. Weitere Unterschiede liegen im antigenen Verhalten, in der Affinität zu Mangan II und in der strukturellen Veränderung bei der Aktivierung (HIRSCH-KOLB et al. 1970, BOND 1973, BOND et al. 1983).

### Glutaminsynthetase (GS)

Die neben Magnesium auch durch Mangan aktivierte Glutaminsynthetase katalysiert die ATP-abhängige Reaktion von Glutamat zu Glutamin und bindet dabei freies Ammoniak. Die höchsten GS-Aktivitäten werden in Gehirn, Milz, Leber und Niere gefunden wobei 80 % des Mangangehaltes im Gehirn gebunden an die GS vorliegen (WU 1963, PERNECCO and VIRDIS 1977, WEDLER et al. 1982). Die Funktionen sind hier die Entgiftung des freien Ammoniaks und die L-Glutamin-Synthese in den Gliazellen aus dem durch Neuronen freigesetzten Neurotransmitter L-Glutamat (MARTINEZ-HERNANDEZ et al. 1977, NORENBORG 1979, COOPER et al. 1983, WALKER 1983). Das Enzym besteht aus acht identischen Untereinheiten und weist ebenfalls gewebsspezifische Unterschiede auf. Im Manganmangel auftretende neurologische Schädigungen können eine Folge der reduzierten Aktivität der GS sein, welche noch zusätzlich durch die Oxidationsempfindlichkeit der GS eingeschränkt wird (MEISTER 1984, WEDLER and DENMAN 1984, YAMAMOTO et al. 1987, CARL et al. 1993, WEBER et al. 2002, MONTES et al. 2003, TAKEDA 2003)

### Pyruvatcarboxylase (PC) und Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK)

Die ersten zwei Markerenzyme der Gluconeogenese, die Pyruvatcarboxylase (biotinabhängige Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat) und die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (Decarboxylierung von Oxalacetat unter Bildung von Phosphoenolpyruvat) binden ebenfalls Mangan, wobei nur die PC vorwiegend manganspezifisch ist, die PEPCK hingegen auch Magnesium binden kann. Allerdings hat ein Manganmangel nur geringe Auswirkungen auf die Gluconeogenese, da die Funktion dieser Enzyme auch noch anderweitig beeinflusst wird. Ein Einfluss auf den Kohlenhydratstoffwechsel konnte erst nach einem lange andauernden Manganmangel beobachtet werden und wird auch auf andere Faktoren (siehe unter Mangelsymptome) als die PC und die PEPCK zurückgeführt (SCRUTTON et al. 1972, ROGNSTAD 1981, BALY et al. 1985a, MAGGINI et al. 1993, KIMURA et al. 1996).

### Glycosyltransferasen

Eine weitere Gruppe bedeutender manganabhängiger Enzyme sind die Glycosyltransferasen. Ihre Funktion liegt in der Biosynthese der Mucopolysaccharid-Protein-Komplexe (Proteoglykane) des Knorpels, wobei für jeden übertragenen Zuckerrest eine spezifische Glycosyltransferase fungiert. Störungen im

Skelettwachstum in Folge niedriger Glycosyltransferaseaktivitäten gehören zu den deutlichsten klinischen Mangan mangelsymptomen (LEACH 1971, 1988, HIDIROGLOU et al. 1979, RODEN 1980).

### **2.1.5 Klinische und subklinische Mangelsymptome unterschiedlicher Species**

Am stärksten wirkt sich ein alimentärer Manganmangel beim Geflügel, insbesondere bei den Küken aus. Durch die verminderte Aktivität der Glycosyltransferasen ist die Bildung von Proteoglycanen in der Wachstumsplatte der langen Röhrenknochen herabgesetzt und es entsteht das Krankheitsbild der nutritiven Chondrodystrophie oder Perosis (SETTLE et al. 1969, WISE et al. 1973). Durch die gestörte Proliferation des metaphysären Wachstumsknorpels kommt es zu einem verminderten Längenwachstum, und die verzögerte Ossifikation führt zu verminderter Stabilität. Dies führt zu Verkürzungen, Verdickungen und Verdrehungen der langen Röhrenknochen, Verdickungen des Sprunggelenks, verbunden mit einer Verlagerung oder einem vollständigen Abgleiten der Gastrocnemiussehne von den Gelenkrollen. Insbesondere in der intensiven Putenmast führt dies durch schnelle Lebendmassezunahmen bei unzureichender Skelettreife und durch Bewegungsmangel häufig zu schweren Gelenkschäden bis zum Tod der Tiere (McNATT et al. 1976, THOMAS and LOWTHER 1976, BOLZE et al. 1985). Bei Legehennen und Zuchtvögeln führt ein Manganmangel zudem zu Nachlassen der Legeleistung und zu verminderter Festigkeit der Eischalen (LEACH and GROSS 1983, BERGMANN 1992, RIDDELL 1992, 1997).

Mangan mangelsymptome beim Milchvieh können Wachstumsbeeinträchtigungen, Skelettanomalien und eine eingeschränkte Reproduktion sein. Auch das Zungenrollen wird mit einem Manganmangel in Verbindung gebracht. Neugeborene Kälber von Mangan mangeltieren weisen eine allgemeine Schwäche, verdrehte, schwache Beine, vergrößerte Gelenke, Steifheit und eine reduzierte Knochenstabilität auf. Bei der Kuh kommt es durch verspätete Brunst, reduzierte Fruchtbarkeit und Fehlgeburten zu verminderten Reproduktionsleistungen. Der Manganbedarf des Rindes ist im Wachstum niedriger als bei Fortpflanzung und Geburt (ANKE et al. 1973a, SANSOM 1973, HIDIROGLOU et al. 1990, GRAHAM 1991, KARATZIAS et al. 1995).

Die Mangan mangelsymptome beim Schaf sind vergleichbar mit denen des Rindes (ANKE et al. 1973a, 1973b, HIDIROGLOU et al. 1978).

Mangan mangelsymptome bei Ziegen sind Deformierungen der Beine, Wucherungen am Fußwurzelgelenk und damit einhergehend eine Unwilligkeit zu laufen, verminderte Reproduktionsleistung und Ataxie. Bei der ausgewachsenen Ziege wird der Mangangehalt der Haare im Vergleich zum Mangangehalt anderer Teile des Körpers als am besten geeigneter Indikator des Manganstatus betrachtet (ANKE et al. 1973c).

Beim Schwein werden folgende Symptome mit einem Manganmangel in Verbindung gebracht: Störungen im Skelettwachstum, verändertes Verhältnis von fetter zu fettfreier Körpermasse, Unregelmäßigkeit oder kompletter Ausfall der Brunst, gestörte Entwicklung des Säugeapparates und gestörte Laktation, Resorption von Föten, kleine schwache Ferkel mit Gleichgewichtsstörungen. Zu den Gleichgewichtsstörungen kommt es durch eine gestörte Entwicklung der Otolithe (calcifizierte Teile des Gleichgewichtsorgans im Innenohr), die Störungen des Brunstzyklus könnten auf die Funktion des Mangans in der Cholesterinbiosynthese zurückzuführen sein, da im Cholesterinmangel die Synthese von Steroidhormonen gestört sein kann (NEHER et al. 1956, LEIBHOLZ et al. 1962, KIRCHGESSNER et al. 1982, WEIGAND et al. 1986, RHEAUME and CHAVEZ 1989, 1991).

Bei Labortieren (Mäuse, Ratten, Meerschweinchen) werden die Mangan mangelsymptome mit der Entwicklung von oxidativen Schädigungen in unterschiedlichen Geweben durch möglicherweise erhöhte mitochondriale Aktivität bei erniedrigter MnSOD-Aktivität in Verbindung gebracht. Bei Ratte und Meerschweinchen führte perinataler Manganmangel zu Pankreasschädigungen, wodurch die Glucosetoleranz herabgesetzt sein kann. Auch zu einem späteren Zeitpunkt scheint eine oxidative Schädigung der  $\beta$ -Zellen durch verminderte MnSOD-Aktivität im Pankreas möglich, was zu verminderter Insulinproduktion und -ausschüttung führt (EVERSON and SHRADER 1968, BALY et al. 1984, 1985b, HURLEY et al. 1984, KEEN et al. 1999). ZIDENBERG-CHERR et al. (1983) wiesen im Manganmangel durch die einhergehende Aktivitätsabnahme der mitochondrialen MnSOD eine zunehmende Lipidperoxidation nach, woraus sie auf Schäden an der Mitochondrienmembran schlossen. Weiterhin fanden BRANNON et al. (1987) und WERNER et al. (1987) bei jungen Ratten im Manganmangel erhöhte Aktivitäten der Pankreasamylase. Bei frühabgesetzten Ratten konnten im Manganmangel auch leichte Abnahmen der Hämoglobinkonzentration und des Hämatokritwertes

festgestellt werden, welche aber noch nicht im anämischen Bereich lagen (HEISEKE und KIRCHGESSNER 1977).

Das Zink-Metalloenzym Alkalische Phosphatase (ALP) stellt ein Maß für die Intensität ablaufender Stoffwechselprozesse dar und zeigt auch einen deutlichen Einfluss des Lebensalters. So wird die ALP neben der Zink- und Eisenversorgung auch indirekt durch die Manganversorgung des Organismus beeinflusst. Im Manganmangel konnte bei Ratten eine verminderte Aktivität der ALP im Knochen bei gleichzeitig erhöhter ALP-Aktivität im Blut nachgewiesen werden, was auf die gestörte Entwicklung der Tiere oder auf eine verstärkte Mobilisierung des Zinks aus den Knochen zurückzuführen sein könnte (WACHTEL et al. 1943, HEISEKE und KIRCHGESSNER 1979, PAYNTER 1980).

### 2.1.6 Empfehlungen zur Manganversorgung unterschiedlicher Species

Die Empfehlungen zur Versorgung unterschiedlicher Tierspecies mit Mangan sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Empfehlungen zur Manganversorgung unterschiedlicher Species

Species	Empfehlung (mg/kg Diät mit 90 % TM)	Empfehlung (mg/kg Diät-TM)	Quelle
Geflügel	50 – 60	50 – 60	(NRC 1994, GfE 2000)
Rind		40 – 50	(GfE 1995)
wachsend	20		(NRC 2000)
Schwein, wachsend	2 – 4		(NRC 1998)
tragend, bzw. laktierend	20		
Schaf	20 – 40		(NRC 1985)
Ziege		60 – 80	(GfE 2003)
Ratte, Maus	10		(NRC 1995)
Meerschweinchen	40		(NRC 1995)

Bei den Zufuhrempfehlungen für Mangan beim Monogaster muss berücksichtigt werden, dass es durch die typische Futterzusammensetzung mit hohen Gehalten an Calcium, Phosphor und antinutritiven Inhaltsstoffen (z.B. Phytinsäure) zu einer verminderten Manganresorption kommt, was insbesondere für Geflügel und Schweine gilt. Daher werden die Bedarfsempfehlungen mit 2 – 4 mg Mangan / kg

Diät beim wachsenden Schwein (NRC 1998) als zu niedrig diskutiert (CHRISTIANSON et al. 1989, 1990, PALLAUF et al. 1992, KAUER et al. 2005).

Eine Supplementierung mit Mangan darf laut GEMEINSCHAFTSREGISTER DER FUTTERMITTELZUSATZSTOFFE GEMÄSS DER VERORDNUNG (EG) Nr. 1831/2003 über die in Tabelle 2 angegebenen, als Futterzusatzstoffe zugelassenen Verbindungen stattfinden. Der Mangangehalt in Alleinfuttermitteln darf bei Fischen 100 mg/kg und bei sonstigen Tierarten 150 mg/kg nicht überschreiten.

Tabelle 2: Als Futterzusatzstoffe zugelassene Manganverbindungen  
(GEMEINSCHAFTSREGISTER DER FUTTERMITTELZUSATZSTOFFE GEMÄSS DER VERORDNUNG (EG) Nr. 1831/2003)

Zusatzstoff	Chemische Bezeichnung
Mangan-(II)-carbonat	$\text{MnCO}_3$
Mangan-(II)-chlorid, Tetrahydrat	$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$
Mangan-(II)-hydrogenphosphat, Trihydrat	$\text{MnHPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$
Mangan-(II)-oxid	$\text{MnO}$
Mangan-(III)-oxid	$\text{Mn}_2\text{O}_3$
Mangan-(II)-sulfat, Tetrahydrat	$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$
Mangan-(II)-sulfat, Monohydrat	$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
Aminosäure-Manganchelate, -Hydrate	$\text{Mn(X)}_{1-3} \times n\text{H}_2\text{O}$ X = Aminosäureanion aus hydrolysiertem Sojaprotein, Molekulargewicht höchstens 1500
Trimangantetroxid	$\text{MnO} \times \text{Mn}_2\text{O}_3$

### 2.1.7 Toxizität

Bei hoher Konzentration kann Mangan toxisch wirken, wobei hier der Manganaufnahme über die Atemwege größere Bedeutung zukommt als der oralen Zufuhr.

Eine chronische Exposition über die Luftverunreinigung mit manganhaltigem Staub ( $> 5 \text{ mg/m}^3$ ), wie er in bestimmten Industriezweigen (Metallherstellung und -verarbeitung) vorkommt, kann beim Menschen zu Schädigungen des Zentralnervensystems führen. Insbesondere degenerieren dabei Ganglienzellen im Putamen, Nucleus caudatus, Globus pallidus und im Thalamus durch den Einfluss des Mangans auf das Dopamin-Neurotransmittersystem (BUTTERWORTH et al. 1995).

Beim Krankheitsbild des Manganismus, vergleichbar mit der Parkinson'schen Erkrankung, kommt es zu Störungen des Bewegungsapparates (unsicherer Gang),

einem auch in Ruhe erhöhten Muskeltonus, bis hin zu Zwangshaltungen der Gliedmaßen, Motilitätsstarre, grobschlägigem Tremor, mimischer Starre (Maskengesicht), Schluckstörungen, Speichelfluss und Sprachstörungen. Psychische Veränderungen, Zwangslachen und Zwangswainen können ebenfalls auftreten. Eine akute Einwirkung größerer Mengen an Mangan kann lokale Schädigungen der Schleimhaut und damit einhergehend örtliche Reizerscheinungen an den Atemwegen hervorrufen und zur Manganpneumonie (kruppöse Pneumonie) führen (MERKBLATT ZUR BK NR. 1105). ANTONINI et al. (2004) konnten in einer epidemiologischen Untersuchung bei Schweißern Bronchitis, Asthma, erhöhte Lungenkrebshäufigkeit und auch im Tierversuch Lungenschädigungen und Lungenentzündungen in Folge des Einwirkens von Schweiß-Rauch (kann u. a. Mangan, Eisen, Chrom und Nickel enthalten) in der Atemluft aufzeigen. WATANABE et al. 1981 wiesen in einer Massenstudie eine signifikante Häufung von Prostatakrebs bei den Einwohnern in der Umgebung der Manganminen in den Vororten von Kyoto nach. Auch eine niedrige chronische Manganexposition ( $1 \text{ mg/m}^3$ ) kann bereits psychologische und physiologische Störungen wie Übererregbarkeit, verzögerte Reaktionszeiten, Gewalttätigkeit, Psychosen, Koordinationsverlust und Demenz zur Folge haben. Eine gering erhöhte Mangankonzentration in der normalen Atemluft, bedingt durch die Verwendung von Mangan als Bleiersatz in Kraftstoffen, wird mit neurologischen Veränderungen wie z.B. Konzentrationsstörungen bei Kindern in Zusammenhang gebracht, wobei die Ursache-Wirkungs-Beziehung allerdings als nicht sehr eng beurteilt wird. Weiterhin werden Reproduktionsstörungen, Störungen im Immunsystem, Nephritis, Pankreatitis, Testes- und Leberschäden mit einer Manganintoxikation in Verbindung gebracht (BUTTERWORTH et al. 1995, FINLEY 2004).

Nach Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* kann Manganchlorid unter bestimmten Bedingungen clastogen wirken. Hohe Konzentrationen an Manganionen können Chromosomenbrüche und Mutationen auslösen (LIMA et al. 2008).

FINLEY et al. (2003) konnten nach oraler Manganaufnahme bei gesunden Frauen keine neurologischen Befunde feststellen. Bei Schweinen führte eine hohe alimentäre Manganzufuhr bei gleichzeitig niedriger Magnesiumversorgung vermehrt zum Herztod, wobei Myocardnekrosen und Veränderungen in Mitochondrien festgestellt wurden. Zudem führte eine orale Überversorgung mit Mangan häufig zu Wachstumsdepressionen, verminderter Futteraufnahme und zum Eisenmangel durch eine verminderte Eisenresorption (MILLER et al. 2004).

In einer cDNA-Array-Untersuchung des Gehirns von manganexponierten Mäusen konnten einige beeinflusste Gene gefunden werden, wobei hier besonders bemerkenswert war, dass auch die Expression des S100 $\beta$  calcium binding protein, welches in neurodegenerative Prozesse involviert ist, erhöht war (BAEK et al. 2004). HAMAI et al. (2006) wiesen bei Ratten unter Manganexposition per Northern Blot eine abfallende Expression bei verschiedenen inflammatorischen Genen nach.

## **2.2 Möglichkeiten und Grenzen der Microarraytechnologie**

cDNA-Microarrays stellen eine relativ neue, effiziente Technologie zur experimentellen Analyse des Expressionsverhaltens von Genen dar. Mit ihrer Hilfe lässt sich die Aktivität tausender Gene parallel untersuchen. Hierbei wird ausgenutzt, dass einsträngige Nucleinsäuren Hybridisierungsreaktionen eingehen, d.h. in einer heterogenen Mischung verschiedener DNA- oder RNA-Moleküle einen komplementären Partner finden und an diesen binden können. Neben der Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) (VELCELESCU et al. 1995) und den photolithographisch hergestellten Oligonucleotidarrays (LOCKHART et al. 1996) fand der Begriff cDNA-Microarray in einer Veröffentlichung von SCHENA et al. (1995) zum ersten Mal Erwähnung als hochkapazitives System zur gleichzeitigen Untersuchung der Expression vieler Gene. Außer zur Analyse der Genexpression wurden z.B. auch Arrays für die Genotypisierung sowie für Proteom-, Peptid- und Gewebsanalysen entwickelt, wobei sich der überwiegende Anteil der Publikationen zwischen 1995 und 2002 (ca. 80 %) mit der Genexpressionsanalyse befasste.

Neben kompletter cDNA können als Arrayelemente auf Nucleinsäure-Microarrays auch kürzere PCR-amplifizierte cDNA-Abschnitte (100 – 3000 Basenpaare) oder kurze Oligonucleotide (15 – 120 Basen) genutzt werden, wobei bei der Verwendung von cDNA durch deren Länge schärfere Signale und höhere Spezifitäten erreicht werden, aber auch die Gefahr einer Kreuz-Hybridisierung zunimmt (KANE et al. 2000, ROCKETT and DIX 2000, HUGHES et al. 2001, STEARS et al. 2003).

Die cDNA-Chips werden zumeist mit Hilfe von Spotting-Robotern hergestellt, die zu einzelnen Genen gehörige DNA-Stücke auf einer entsprechend präparierten Glas- oder Nylonoberfläche positionieren. So ist es möglich, dass mehrere tausend Gene auf einen Chip gespottet werden. Nach der Hybridisierung der Arrays mit radioaktiv bzw. fluoreszierend markierter cDNA, aus der mRNA einer Gewebeprobe revers transkribiert und amplifiziert, kann ermittelt werden, in welcher Größenordnung die

jeweilige mRNA der auf dem Chip befindlichen Gene in der Probe enthalten ist. Dies wird verwendet als Maß für die Expression dieser Gene unter den äußeren Bedingungen, welche auf die Probe eingewirkt haben. So kann diese Technik z.B. als Hilfsmittel für die Diagnose pharmakologischer, toxikologischer oder pathophysiologischer Effekte eingesetzt werden (BURGESS and HAZELTON 2000, CUNNINGHAM et al. 2000).

Die Messung der Expressionsintensitäten erfolgt im Falle der radioaktiven Markierung mittels eines Phosphorimagers und im Falle der Fluoreszenz-Markierung durch einen Laserscanner. Werden für mehrere Proben Hybridisierungsexperimente auf Microarrays mit gleicher Bestückung durchgeführt, so ergibt sich für jedes der Gene abhängig vom jeweiligen Gewebe eine Folge von charakteristischen Expressionswerten, die auch als Fingerabdruck (fingerprint) bzw. Expressionsprofil des jeweiligen Gens bezeichnet werden. Ziel des Vergleichs der Expressionsprofile vieler Gene eines Organismus sind Rückschlüsse auf die Einflussfaktoren auf die Expression und die Funktion dieser Gene (SCHENA 2003, MÜLLER und RÖDER 2004).

Die Qualität der Ergebnisse einer Microarrayuntersuchung ist abhängig von vielen Faktoren, vom Versuchsdesign über optimierte Analyseprotokolle, dem genauen und spezifischen Design der Arrayelemente, einem hochqualitativen Herstellungsprozess, einer sauberen Probenaufbereitung, einer präzisen Scanmethode bis hin zur sehr aufwendigen Aufbereitung der gewonnenen Rohdaten (CHURCHILL 2002, STEARS et al. 2003).

Auch wenn die Microarrayproduktion weitgehend automatisiert ist und dadurch fehlerhafte Chips die Ausnahme sein sollten, gibt es bei der Durchführung dieser analytischen Methode eine Vielzahl an möglichen individuellen Fehlerquellen, welche je nach Anzahl der Genspots unter Umständen 1000fache Auswirkungen haben und im Folgenden zu fehlerhaften Schlussfolgerungen führen können (KNIGHT 2001). Allerdings gibt es auch bei der Herstellung der Chips Fehlerquellen, z.B. bei der bakteriellen Vermehrung der cDNA für die Genspots, wobei die Clone z.B. durch Kontamination mit T1-Phagen nicht oder nicht nur die gewünschte Sequenz enthalten können (ROCKETT and DIX 2000). So fanden HALGREN et al. (2001) bei der gelelektrophoretischen Sequenzverifizierung eines kommerziell verfügbaren *IMAGE* Mouse cDNA Clone Set mit 1189 cDNAs nur bei 739 cDNAs (62,2 %) die ausschließlich korrekten cDNA-Sequenzen für die entsprechenden Gene. 300 der

Clone (25,1 %) enthielten ausschließlich falsche cDNA, 84 (7,1 %) enthielten einen Mix von korrekter und falscher cDNA und 10 (0,8 %) enthielten überhaupt keine lesbaren Sequenzen.

Daher scheint es dringend geboten, auf eine hohe Qualität der verwendeten cDNA-Banken zu achten (FÜLLE 2003, YING 2004), bzw. als cDNA-Microarrayelemente ausschließlich sequenzverifizierte cDNAs einzusetzen (MECHAM et al. 2004), wobei auch hier fehlerhafte cDNAs nicht gänzlich ausgeschlossen werden können. So berichteten Forscherteams der Vanderbilt University in Nashville, der Yale University in New Haven und des Women's Hospital in Boston an Nature von beunruhigenden Fehlerraten von bis zu 30 % in sequenzverifizierten Research Genetics Mouse cDNA Clone Sets. Die Firma Research Genetics räumte hingegen für Ihre cDNA Clone Sets eine Fehlerrate von unter 2 % ein (KNIGHT 2001).

Um den Fehler einer Kontaminierung bei der bakteriellen cDNA-Vermehrung zu vermeiden, eignet sich die Verwendung von PCR-amplifizierten, kürzeren cDNA-Fragmenten oder von per Photolithographie direkt auf der Arrayoberfläche synthetisierten Oligonucleotiden (LIPSHUTZ et al. 1999). Die geringere Spezifität dieser im Vergleich mit cDNAs relativ kurzen Oligonucleotide wird auf diesen Chips dadurch ausgeglichen, dass für jedes einzelne Gen 40 unterschiedliche Oligonucleotidsequenzen auf dem Chip vorhanden sind. Die Firma Affymetrix, welche sich auf die Herstellung von hochdichten Oligonucleotid-Arrays spezialisiert hat, packt z.B. bis zu 400 000 unterschiedliche Oligosequenzen auf ihre Genchips, welche dann etwa 10 000 Gene repräsentieren. Der Nachteil dieser Chips liegt allerdings in den höheren Kosten.

Letztendlich sind die Hersteller der Microarrays bzw. Clone Sets immer auf qualitativ hochwertige Informationen über die gewünschten Sequenzen angewiesen, so räumte Affymetrix ein, dass auf einer Charge ihres Mouse Array bis zu einem Drittel der Sequenzen falsch waren, wobei die Firma Informationen aus öffentlichen Sequenzdatenbanken genutzt hatte, deren Daten missverständlich waren und die dazu führten, dass der jeweils falsche DNA-Strang verwendet wurde (KNIGHT 2001).

Bei kritischer Betrachtung eignet sich die Microarraytechnologie zum Zeitpunkt dieser Untersuchung also zur Ermittlung relativer Signalstärken zwischen zu vergleichenden Proben, wobei eine absolute Quantifizierung und eine schlüssige Aussage ohne die nachfolgende Verifizierung der Ergebnisse einzelner Gene durch andere Methoden

nur schwer möglich scheint (ROCKETT and DIX 2000, SCHENA 2003). So fanden TANIGUCHI et al. (2000) zwar größtenteils Übereinstimmungen zwischen cDNA-Arrays und Northern Blots bei beeinflussten Genen, aber auch eine geringere Sensitivität, d.h. fehlende Signale, bzw. falsch positive Signale auf den Arrays.

Um sicherzustellen, dass publizierte Ergebnisse unterschiedlicher Microarrayuntersuchungen verglichen, verifiziert und interpretiert werden können, erarbeitete die Microarray Gene Expression Data (MGED) Society (BRAZMA et al. 2001) das Projekt MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment), laut welchem neben der Veröffentlichung der ermittelten Daten auch die folgenden sechs Abschnitte des Experiments in Publikationen genau beschrieben sein sollten:

- |                                    |                             |
|------------------------------------|-----------------------------|
| 1. Versuchsdesign                  | 4. Hybridisierung           |
| 2. Arraydesign und -eigenschaften  | 5. Messung, Quantifizierung |
| 3. Proben, Präparation, Markierung | 6. Normalisierung           |

Empfohlen wird zudem die Übermittlung aller ermittelter Array(roh)daten entsprechend dieser Checkliste an eine der öffentlichen Datenbanken, wie GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) bzw. ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>), um so die einfache Recherche der Auswirkungen auf die Genexpression für möglichst viele Gene zu ermöglichen, inklusive aller Informationen über Einflussfaktoren und Versuchsparameter (BARRETT et al. 2005, PARKINSON et al. 2005).

Trotz solcher Leitfäden weisen einige Veröffentlichungen auf die Problematik der Vergleichbarkeit von mit unterschiedlichen Microarraysystemen ermittelten Genexpressionsdifferenzen hin (KOTHAPALLI et al. 2002, KUO et al. 2002), was auch bei der Recherche in den o.g. Datenbanken teilweise deutlich wird.

## Fragestellung

Über den Einfluss eines Manganmangels auf die Genexpression beim Säugetier oder beim Menschen liegen in der Literatur bisher keine Microarray-Untersuchungen vor.

Ziel der vorliegenden Studie war daher, zu untersuchen, ob es möglich ist, alimentär herbeigeführte artspezifische Manganmangeleffekte bei der Labormaus anhand eines per cDNA-Microarray ermittelten Genexpressionsmusters zu erkennen bzw. nachzuweisen, bevor klinische Mangelsymptome auftreten. Gleichzeitig wurden eine Reihe biochemischer Parameter im Manganmangel überprüft. Um einen möglichen Einfluss des Mangans auf die Genexpression aufzuzeigen, wurde ein sechswöchiger Stoffwechselversuch mit Mäusen durchgeführt, welche nach den gängigen Zufuhrempfehlungen bzw. mit einer Manganmangeldiät gefüttert wurden. Anschließend wurde die aus den Lebern der Tiere präparierte RNA per cDNA-Microarrayanalyse auf Expressionsunterschiede zwischen Manganmangel- und adäquat ernährten Tieren untersucht. Einzelne Ergebnisse der Microarrayuntersuchung wurden daraufhin per Northern Blot und RT-PCR verifiziert.

Als biochemische Parameter für die Manganversorgung wurden die Mangankonzentrationen in Leber, Femur und Plasma und die Aktivitäten der manganabhängigen Enzyme Arginase und MnSOD in der Leber herangezogen. Da die Expression vieler Gene, z.B. der MnSOD, als redoxsensitiv beurteilt wird, wurden der totale antioxidative Status, die Thiobarbitursäure reaktiven Substanzen und die Metallothioneinkonzentration in der Leber bestimmt. Als weitere mögliche Beurteilungsparameter wurden Hämoglobin, Hämatokrit, Blutglucose und die Konzentrationen verschiedener Mengen- und Spurenelemente in Leber und Femur überprüft.

Im Vergleich mit den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse sollten so auch Rückschlüsse darauf gezogen werden können, ob durch Manganmangel beeinflusste Enzymaktivitäten prae- oder posttranskriptional begründet sind, bzw. welchen weiteren Einflussfaktoren diese Veränderungen unterliegen könnten.

## 3 Experimenteller Teil

### 3.1 Stoffwechselversuch

#### 3.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 3 x 9 männliche, wachsende Albinoratten (Wistar) mit einer initialen Lebendmasse von durchschnittlich 38 g eingesetzt. Die Tiere wurden von der Firma Harlan Winkelmann, Borcheln, bezogen. Diese niedrige initiale Lebendmasse war damit begründet, dass die Tiere vor Versuchsbeginn nur möglichst geringe Manganreservoirs anlegen sollten, um eine unnötig lange Versuchsdauer zur Herbeiführung eines Mangankmangels zu vermeiden. Der Mangankstatus der Tiere zu Versuchsbeginn wurde anhand einer zusätzlichen  $t_0$ -Gruppe überprüft.

#### 3.1.2 Versuchsdiet

Es wurde eine halbsynthetische Diet auf Basis von Maisstärke, Casein, Saccharose, Sojaöl und Zellulose nach den Vorgaben des NRC (1995) bzw. des AIN-93 (REEVES et al. 1993) erstellt.

Um in der Grundmischung einen möglichst niedrigen Mangankgehalt zu erreichen, wurden zuerst alle Einzelkomponenten inklusive der Mineralstoffe auf ihre Mangankkonzentration hin untersucht und nur jene Komponenten eingesetzt, welche den niedrigsten nativen Mangankgehalt, bzw. die geringsten Mangankverunreinigungen aufwiesen. Als Eiweißquelle wurde daher Casein eingesetzt, als Calciumquelle eignete sich ausschließlich  $\text{CaCO}_3$ , da  $\text{CaHPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  mit ca. 62 mg Mangank / kg verunreinigt war.

Wegen des geringen Anteils der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein in der Proteinkomponente Säurecasein wurde diese in Form des Disulfids L-Cystin ergänzt. Vitamine und Mineralstoffe wurden entsprechend den Empfehlungen zugelegt (Tabelle 3). Die angestrebten Mineralstoffgehalte der Diäten sind Tabelle 4 zu entnehmen.

#### Mischvorgang

Zur Erstellung der mangankarmen Basisdiet wurden Mineralstoffe (außer Mangank) und Vitamine jeweils 20 min mit einem Präzisionsmischer aus Edelstahl (Lödige, Paderborn) an Maisstärke angemischt und als Vormischungen der Grundmischung

mit den Hauptkomponenten zugegeben. Um eine möglichst homogene Verteilung der z. T. grobkristallin vorliegenden Mineralsalze und Vitamine zu garantieren, wurden diese vor dem Anmischen in Porzellanmörsern fein zerrieben.

Die Versuchsdiäten (jeweils 5000 g) der Gruppen II (+ Mn *pair fed*) und III (+ Mn *ad libitum*) wurden durch Mischen von 4500 g Grundmischung mit 500 g Zulagemischung (61,52 mg  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  p.a. pro kg Diät), ausgetauscht gegen die Maisstärkefraktion, über einen Mischzeitraum von 20 min hergestellt. Nach dem Mischvorgang wurden die Diäten bis zu ihrer Verfütterung unter Lichtabschluss bei 4°C gelagert.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Versuchsdiäten

Hauptkomponenten	g/kg
Maisstärke <sup>1</sup>	457
Casein <sup>2</sup>	200
Saccharose <sup>3</sup>	100
Sojaöl <sup>4</sup>	70
Cellulose <sup>5</sup>	50
L-Cystin <sup>6</sup>	3
Mineralstoffprämix <sup>7</sup>	100
Vitaminprämix <sup>8</sup>	20
$\Sigma$	1000

1 Maisstärke: Roquette, Roquette Frères, F-Lestrem

2 Casein: Nährcasein (Säurecasein) mesh 110, Meggle, Wasserburg

3 Saccharose: handelsüblicher Puderzucker, Pfeifer & Langen, Köln

4 Sojaöl: Soja 3-Plus, Karl Heidenreich, Mannheim

5 Cellulose: Arbocel BWW 40, Rettenmaier & Söhne, Ellwangen-Holzmühle

6 L-Cystin, Merck, Darmstadt

7 Mineralstoffzusatz (Angaben je kg Diät): 14,05 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  reinst; 13,75 g  $\text{CaCO}_3$  reinst; 6,08 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  reinst; 2,21 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  p.a.; 1,15 g NaCl reinst; 298,68 mg  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  p.a.; 87,91 mg  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  p.a.; 31,45 mg  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  p.a.; 9,61 mg  $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$  p.a.; 2,38 mg  $\text{CoSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  p.a.; 2,21 mg NaF p.a.; 0,83 mg  $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  p.a.; 0,52 mg KI p.a.; 0,50 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  p.a.; Maisstärke ad 100 g; Mineralstoffe wurden von Merck, Darmstadt, bezogen

8 Vitaminzusatz (Angaben je kg Diät): 4.500 IU A; 1.100 IU D3; 80 IU E; 0,9 mg Menadion; 30 mg C; 6 mg Thiamin; 7 mg Riboflavin; 7 mg Pyridoxin; 0,03 mg Cobalamin; 0,25 mg Biotin; 2,5 mg Folsäure; 35 mg Nicotinsäure; 20 mg Pantothersäure; 1100 mg Cholinchlorid; 100 mg *myo*-Inositol; 10 mg p-Aminobenzoesäure; Maisstärke ad 20 g; Vitamine wurden von Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, bezogen

Tabelle 4: Angestrebte Mineralstoffgehalte in den Diäten

Mengenelemente	(g/kg)	SZ (%)	Spurenelemente	(mg/kg)	SZ (%)
Calcium	5,5	10	Eisen	60	71
Phosphor	3,0	0	Mangan	20*	100
Magnesium	0,6	20	Zink	20	67
			Kupfer	8	60

\* nur Gruppen II (+ Mn p.f.) und III (+ Mn a.l.), zugesetzt als  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (61,52 mg /kg Diät)  
 SZ = Sicherheitszuschlag zu den Zufuhrempfehlungen des NRC 1995

### 3.1.3 Versuchsdurchführung

Der Versuchsplan ist in Tabelle 5 dargestellt. Die Tiere wurden während des 6wöchigen Versuchszeitraumes bei einer Raumtemperatur von 22°C, einer relativen Luftfeuchte von ca. 55 % sowie einem 12stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Haltung der Ratten erfolgte einzeln auf Edelstahlrosten in Stoffwechsellkäfigen aus Makrolon, welche eine kontrollierte Futteraufnahme und eine quantitative Kot- und Harnsammlung ermöglichen. Die Diätzuteilung erfolgte täglich ab 8:00 Uhr. Gruppe I (- Mn) und Gruppe III (+ Mn a.l.) erhielten ihre Diätportionen *ad libitum*. Um einen Einfluss der Lebendmasseentwicklung auf die Genexpression zu minimieren, erhielt Gruppe II (+ Mn p.f.) als zusätzliche Positivkontrolle ihre Ration Tier-zu-Tier *pair fed* zu Gruppe I (- Mn). Bidestilliertes Trinkwasser stand *ad libitum* über Kunststoffflaschen mit Edelstahlaufsatz zur Verfügung. Die Futteraufnahme wurde täglich und die Lebendmasse einmal wöchentlich ermittelt. Nach Abschluss der Versuchsphase wurden die genücherten Ratten nach CO<sub>2</sub>-Betäubung dekapitiert, entblutet und die zu analysierenden Organe und Gewebe entnommen.

Tabelle 5: Versuchsplan

Gruppe	Bezeichnung	n	Diät-Mangan	Diätzuteilung
I	- Mn	9	< 0,5 mg/kg	<i>ad libitum</i>
II	+ Mn p.f.	9	20,0 mg/kg	<i>pair fed</i> zu Gruppe I
III	+ Mn a.l.	9	20,0 mg/kg	<i>ad libitum</i>

### 3.1.4 Gewinnung und Aufbereitung des Analysenmaterials

Nach Dekapitation wurde das Blut in heparinisierten Kunststoffzentrifugenröhrchen aufgefangen und danach für 15 Minuten bei 16.000 g zentrifugiert. Das Plasma wurde bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

Nach ventraler Öffnung der entbluteten Ratten und Freilegung des Abdominalbereiches wurden Leber, Nieren, Nebennieren, Milz, Lunge, Testes sowie der rechte *Os femoris* entnommen, gewogen und unter Vakuum in PE-Beutel eingeschweißt. Das Probenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff bei -196°C schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Die Leber wurde vor dem Einfrieren mit RNase-freier, isotonischer NaCl-Lösung, versetzt mit Diethylpyrocarbonat (DEPC), gespült und in die einzelnen Leberlappen zerteilt. Für die RNA-Extraktion zur differenziellen Genexpressionsanalyse wurde je ein Stück des *lobus median* in ein autoklaviertes Eppendorfcup überführt und dann ebenfalls schockgefroren und bei -80°C eingelagert.

## 3.2 Analytische Methoden

### 3.2.1 Analyse der Diäten

#### Rohnährstoffgehalte und Bruttoenergie

Die Bestimmung der Trockenmasse sowie die Analyse der Rohnährstoffe (Rohprotein, Rohfett, Rohfaser, Rohasche) erfolgten nach den Vorschriften des VDLUFA-Methodenbuchs zur chemischen Untersuchung von Futtermitteln (NAUMANN und BASSLER 1997). Zur Rohfaser-Bestimmung wurde Aluminiumoxid anstelle von Asbest eingesetzt, die Extraktion des Gesamtfetts (Methode B nach HCl-Aufschluss) erfolgte mit n-Hexan. Die Stickstoffanalyse wurde mit Hilfe eines Kjel-Foss-Automaten (Kjel Foss 16 200, Foss Electric, Hamburg) durchgeführt. Die Bruttoenergie der Versuchsdiäten wurde unter Einsatz eines adiabatischen Bombenkalorimeters (IKA-Kalorimeter C400, Jahnke und Kunkel, Staufen) bestimmt.

#### Herstellung der Aschelösungen

Die Veraschung der Diätproben erfolgte nach dem Prinzip der Trockenveraschung. Hierbei wurde die organische Matrix thermisch zersetzt und vollständig mineralisiert. Der Ascherückstand wurde durch Säurezugabe in Lösung gebracht und anschließend quantitativ analysiert.

Alle zur Veraschung eingesetzten Glaswaren wurden vor der Verwendung mit 20 %iger  $\text{HNO}_3$  (Merck, p.a.) gereinigt und mehrfach mit bidestilliertem Wasser gespült. Die Quarzriegel wurden zur vollständigen Beseitigung von möglichen Kontaminationen über einen Zeitraum von 16 h bei  $750^\circ\text{C}$  im Muffelofen ausgeglüht.

Die Trockenveraschung erfolgte bei  $450^\circ\text{C}$  über einen Zeitraum von 18 h. Um thermische Verluste sowie ein Aufschäumen des Probenmaterials zu vermeiden, wurde der Muffelofen in 30minütigen Intervallen um jeweils  $50^\circ\text{C}$  auf eine Veraschungstemperatur von  $450^\circ\text{C}$  aufgeheizt.

Nach Abschluss der Veraschung wurden die Proben mit 3 M  $\text{HNO}_3$  (Merck, suprapur) versetzt, mit einem Uhrglas abgedeckt und für 10 min auf einem siedenden Wasserbad erhitzt. Das Volumen des Säurezusatzes (10 ml 3 M  $\text{HNO}_3$ ) wurde nach dem Volumen der herzustellenden Aschelösungen bemessen, die jeweils in einer 0,3 M Säurekonzentration vorliegen sollten. Nach dem Abkühlen wurden die Proben mit heißem Aqua bidest. durch aschefreie Rundfilter (Blauband, Schleicher & Schuell, Dassel) in einen Messkolben überführt. Unvollständig veraschte Proben wurden erneut bei  $450^\circ\text{C}$  über einen Zeitraum von 8 h nachverascht. Die Aschelösungen wurden bis zur Analyse in PE-Flaschen gelagert.

#### Bestimmung der Mineralstoffkonzentrationen in den Diäten

Die Mineralstoffkonzentrationen der Diäten wurden mittels ICP-AES (Unicam 701) analysiert. Die Bestimmung der Mangankonzentrationen in den Diäten erfolgte per Flammen-AAS (Perkin-Elmer 5100 PC).

### **3.2.2 Blutanalysen**

#### Hämoglobinbestimmung

Die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration im Vollblut erfolgte unter Verwendung eines Testsatzes (Merckotest Hämoglobin, Merck 3317, Darmstadt) entsprechend den Empfehlungen des "Internationalen Standardisierungsausschusses für Hämatologie" nach der Hämiglobincyanid-Methode (VAN KAMPEN and ZIJLSTRA 1961). Prinzip: Die im Vollblut enthaltenen Hämoglobin-Derivate mit Ausnahme des Verdoglobins werden durch Kaliumhexacyanoferrat (III) zu Hämiglobin reduziert und reagieren mit Kaliumcyanid zu Hämiglobincyanid. Diese Verbindung ist sehr stabil und kann im Spektralphotometer bei 546 nm gegen Wasser gemessen werden.

### Hämatokritbestimmung

Zur Bestimmung des Hämatokritwertes wurde das Vollblut unmittelbar nach der Blutentnahme in heparinisierten Hämatokrit-Kapillaren aufgezogen und in einer Hämatokrit-Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen) 10 min zentrifugiert. Der Anteil der korpuskulären Teilchen am gesamten Blutvolumen wurde mit Hilfe einer Ableseschablone ermittelt.

### Blutglucosebestimmung

Die Glucosekonzentration im Blut wurde mittels eines Blutzuckermessgerätes (Accutrend Sensor, Boehringer Mannheim) ermittelt.

## **3.2.3 Analyse der Organ- und Gewebeproben**

### Herstellung der Aschelösungen

Die Herstellung der Aschelösungen erfolgte nach dem Prinzip der Nassveraschung. Die Organ- und Gewebeproben wurden mit 5 ml 65 %iger HNO<sub>3</sub> (Merck, suprapur) versetzt und anschließend unter Rückflusskühlung in einer Aufschlussapparatur (Gerhardt SMA-20, Bonn) bei 140°C gekocht. Hierbei wird die organische Matrix oxidativ abgebaut und das Untersuchungsmaterial vollständig mineralisiert. Die Veraschungsrückstände wurden mit heißem Aqua bidest. über aschefreie Rundfilter in 25 ml Messkolben überführt. Die Aschelösungen wurden bis zur Analyse in PE-Flaschen gelagert.

### Bestimmung der Mineralstoffkonzentrationen in Organen, Geweben und Blutplasma

Die Mineralstoffkonzentrationen der Organe und Gewebe wurden mittels ICP-AES (Unicam 701) bestimmt. Zur Analyse der Mn-Konzentrationen wurde die Graphitrohr-AAS (Perkin-Elmer 5100 PC) eingesetzt.

### 3.2.4 Differenzielle Genexpressionsanalyse mittels cDNA Microarray

Die differenzielle Genexpressionsanalyse mittels Microarray wurde für diese Untersuchung bei der Firma Artus - Gesellschaft für molekularbiologische Diagnostik und Entwicklung mbH, Hamburg, durchgeführt.

Es wurden folgende cDNA-Microarrays der Firma Clontech Laboratories Inc. eingesetzt:

- Atlas Rat 1.2 Array (Katalog Nr. 7854-1)
- Atlas Rat 1.2 Array II (Katalog Nr. 7856-1)
- Atlas Rat Toxicology 1.2 Array (Katalog Nr. 7860-1-1)

Diese sequenzverifizierten Nylonmembran-Microarrays enthielten jeweils 1176 Gene mit 10 ng cDNA pro Spot. Zudem waren zur Vergleichsüberprüfung der Hybridisierung pro Array 9 Housekeeping Gene (Gene für die Aufrechterhaltung der basalen Zellfunktionen) und 3 Negativkontrollen vorhanden. Abb. 2 zeigt eine schematische Darstellung der Anordnung der Genspots auf den Chips. Die aufgespotteten PCR-amplifizierten cDNA-Fragmente hatten eine maximale Länge von 200-600 Basenpaaren, um etwaige Homologien zu anderen Genen und damit die Möglichkeit von Kreuz-Hybridisierungen zu minimieren.

Etwa 800 Gene kamen parallel auf je zwei dieser Arrays vor, somit wurden insgesamt etwa 10 % des gesamten Rattengenoms untersucht.

Die komplette Untersuchung wurde entsprechend dem Protokoll Atlas cDNA Expression Arrays User Manual PT3140-1 des Herstellers durchgeführt.

Zur Analyse wurden RNase-frei gelagerte Leberproben vom *lobus median* von je drei Tieren mit übereinstimmender Futteraufnahme und Lebendmasse aus Gruppe I (- Mn, Tiere 2, 4 und 7) und aus Gruppe III (+ Mn a.l., Tiere 20, 23 und 25) eingesetzt, um einen Einfluss dieser Parameter auf die Genexpression ausschließen zu können. Aus diesen Proben wurde die RNA präpariert und gruppenweise gepoolt, da aus Kostengründen nur eine Analyse pro Gruppe möglich war. Die RNA wurde anschließend revers transkribiert und die entstandene cDNA mit <sup>32</sup>P-dATP radioaktiv markiert. Der verwendete cDNA-Primermix war speziell auf den jeweiligen Chip abgestimmt, so wurde nur die mRNA der auf dem Chip enthaltenen Gene amplifiziert, wodurch die Spezifität erhöht und die Möglichkeit einer Kreuz-Hybridisierung vermindert wurde.



### 3.2.5 Wiederholung der Differenziellen Genexpressionsanalyse

Aufgrund des unterschiedlichen Hybridisierungsverhaltens der drei verschiedenen Arrays bei parallel vorkommenden Genen und der mangelhaften Qualität der Phosporimages wurde nach Reklamation der Auftragsanalyse eine Wiederholung der Genexpressionsanalyse durchgeführt.

Wie oben wurden Leberproben von je drei Tieren mit übereinstimmender Futteraufnahme und Lebendmasse eingesetzt, diesmal allerdings wegen Materialmangels andere Tiere aus Gruppe I (– Mn, Tiere 3, 5 und 8) und aus Gruppe II (+ Mn p.f., Tiere 14, 17 und 18). Zur Wiederholungsuntersuchung konnte aus Kostengründen mit dem Atlas Rat Toxicology 1.2 Array nur noch ein Chip eingesetzt werden.

Im Rahmen dieser Wiederholungsuntersuchung wurden zum Vergleich auch die Autoradiogramme des Atlas Rat Toxicology 1.2 Array aus der ersten Untersuchung neu ausgewertet.

### 3.2.6 Verifizierung der differenziellen Genexpressionsanalyse - Northern Blot der MnSOD-mRNA

#### Isolierung der Gesamt-RNA

Als Methode wurde die saure Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion nach CHOMCZYNSKI und SACCHI (1987) ausgewählt.

Auch hier wurde zur RNA-Gewinnung je ein Teil des RNase-frei gelagerten *lobus median* verwandt. Diese Lebergewebeproben wurden in RNase-hemmendem Guanidinthiocyanat-Puffer homogenisiert. Da zelluläre Nucleinsäuren als Nucleinsäure-Protein-Komplexe vorliegen, wurden nach der Zellyse die Proteine und andere organische Bestandteile mittels Phenollösung und Chloroform ausgefällt und abzentrifugiert. Danach erfolgte die Ausfällung der in der wässrigen Guanidinthiocyanatphase enthaltenen RNA mit Isopropanol, woraufhin die RNA als Pellet abzentrifugiert wurde. Anschließend folgte ein Waschvorgang des RNA-Pellets mit Ethanol (70 %) und zur weiteren Aufreinigung und Konzentrierung das Lösen in Homogenisierungspuffer und erneute Ausfällen mit Isopropanol. Das RNA-Pellet wurde daraufhin noch 3 Mal mit Ethanol (70 %) zum Lösen eventuell noch vorhandener DNA gewaschen, und schließlich in sterilem Wasser (H<sub>2</sub>O-DEPC) gelöst. Nach Denaturierung im 70°C heißen Wasserbad und anschließender

Abschreckung in Eiswasser erfolgte die photometrische Kontrolle der RNA-Konzentration bei 260 nm und der RNA-Reinheit bei 260/280 nm. Der Quotient der Extinktionen bei 260 und 280 nm sollte zwischen 1,6 und 1,8 liegen, um Protein- und Phenolverunreinigungen in der RNA-Lösung ausschließen zu können. Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde die RNA-Konzentration auf 4 µg/µl eingestellt.

#### Denaturierende RNA-Auftrennung per Agarose-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese ist die Wanderung von Teilchen im elektrischen Feld, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit abhängt von der Stärke des elektrischen Feldes, der Molekülgröße und -ladung des Analyten sowie der Porengröße des aus vernetzten Molekülen bestehenden Trärgels. Dieses Prinzip wird genutzt, um die charakteristische Position der jeweiligen Zielsequenz (hier mRNA der MnSOD) darzustellen. Hier wurden 1,5 %ige Agarose-Gele mit 5 % Formaldehydanteil verwendet und je Probe wurden genau 15 µg RNA eingesetzt. Zuerst erfolgte eine Denaturierung der RNA-Proben mit Formaldehyd/Formamid im heißen Wasserbad zur Verhinderung von inter- und intramolekularen Wechselwirkungen, die später die Hybridisierung beeinflussen könnten. Nach der Denaturierung wurde Ladepuffer mit Glycerin und Bromphenolblau zu den Ansätzen gegeben, durch dessen hohe Dichte (Glycerin) das Absinken der Proben in den Geltaschen erfolgt und die Lauffront der RNA im Gel farblich markiert (Bromphenolblau) wird. Außerdem erfolgte zur Färbung der RNA noch die Zugabe von Ethidiumbromid zu den einzelnen Proben. Nach Einlegen des Gels in die mit TAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA) gefüllte Flachbett-Elektrophoreseapparatur wurden die gut durchgemischten Probenansätze in die Geltaschen pipettiert und eine Spannung von ca. 12 V/cm Gel angelegt, bis die Bromphenolblau-Lauffront etwa 80 % der Gellänge durchlaufen hatte. Anschließend erfolgte die Aufnahme des Gels unter UV-Licht (Multimage<sup>TM</sup> Light Cabinet, Alpha Innotec Corp., Computerprogramm Chemilmager 4400), wobei die Helligkeitsintensität der RNA-Menge proportional ist.

#### RNA-Transfer auf Nylonfilter

Die RNA wurde nach der Elektrophorese aus dem Gel auf einen Nylonfilter (Zeta Probe Blotting Membranes, BioRad) übertragen. Dieser Transfer erfolgte mittels eines hochkonzentrierten Transferpuffers (NaCl, NaAc), welcher durch die Saugwirkung von beschwerten Papierhandtüchern und speziellem Blotting-Papier durch das Gel und die Nylonmembrane diffundiert, wobei die Nukleinsäuren aus dem Gel gelöst und auf die Membrane übertragen werden, so dass ein "RNA-Abdruck"

des Gels entsteht. Darauf folgend wurde der Filter vorsichtig gewaschen und die RNA auf der Membrane per UV-Crosslink fixiert. Anschließend wurde die RNA auf der Membrane mit Methyleneblau angefärbt, um den Transfer zu überprüfen (WILKINSON et al. 1991).

#### Hybridisierung mittels einer $^{32}\text{P}$ -markierten cDNA-Oligosonde

Bei der Hybridisierung werden radioaktiv markierte cDNA-Sonden an die komplementäre Zielsequenz (hier die MnSOD-mRNA), welche auf der Nylonmembran fixiert ist, gebunden. Die Hybridisierung gliedert sich in zwei Abschnitte, eine 2stündige Prähybridisierungsphase, in welcher nicht zu untersuchende RNA-Sequenzen unspezifisch mit fragmentierter Fischspermien-DNA gebunden werden und eine 16stündige Hybridisierungsphase, in welcher die im Konzentrationsüberschuss zugegebene hochspezifische radioaktive Sonde an die Zielsequenz bindet. Als Sonde für die MnSOD-mRNA wurde eine 33mer-cDNA-Oligosonde mit der nachfolgenden Sequenz verwendet:

5' -  $^{32}\text{P}$  - ctt gct gtg gtg cag ctg cat gat ctg cgc gtt - 3'

(nach GALEOTTI et al. 1989)

Die Hybridisierung fand in einem mit einem Rotor ausgestatteten Trockenschrank statt, wobei die eingerollten Nylonmembranen mit dem jeweiligen Hybridisierungspuffer in verschließbaren Greinerröhrchen in diesen Rotor eingespannt wurden. Die Hybridisierungslösungen enthielten einen 50 %igen Formamid-Anteil, somit konnte mit 42°C eine relativ niedrige Inkubationstemperatur gewählt werden.

Zur Auswertung wurden die Membranen nach der Hybridisierung gewaschen, getrocknet, in PE-Folie eingeschweißt und zur Belichtung für mehrere Stunden auf Imager Plates aufgelegt. Die Verteilung der radioaktiven Bereiche (Bindungsstellen der  $^{32}\text{P}$ -markierten MnSOD-mRNA-Sonde) auf den Imager Plates wurde anschließend im Phosphorimager (Fujix BAS 1000, Fuji) detektiert und in digitale Schwarzweißbilder umgewandelt, wobei dunkle Stellen erhöhte Radioaktivität anzeigen. Die Intensitäten der radioaktiven Strahlung auf den Blots wurden anschließend per Densitometrie (Computerprogramm TINA 2.09) quantifiziert.

### 3.2.7 Verifizierung der differentiellen Genexpressionsanalyse - RT-PCR der MnSOD-mRNA

Für die RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) wurde die wie bereits beschrieben isolierte Leber-RNA der selben Tiere, welche auch in der zweiten Microarrayuntersuchung eingesetzt wurden (Gruppe I – Mn, Tiere 3, 5 und 8; Gruppe II + Mn p.f., Tiere 14, 17 und 18) mit DEPC-behandeltem Wasser auf die Konzentration 2 µg/µl eingestellt. Je 5 µg dieser RNA wurden mit dem cDNA Synthese Kit (RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit #K1621 von Fermentas GmbH) revers transkribiert, wobei hier der Ansatz mit Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primern gewählt wurde. Die cDNA, die mit diesem System synthetisiert wird, kann direkt zur PCR-Amplifizierung genutzt werden.

Für die Amplifizierung eines 361 bp Fragments der codierenden Sequenz des MnSOD-Gens (*rattus norvegicus*, X56600) wurden folgende sequenzspezifische Primerpaare verwendet:

Rat-MnSOD-fw 5' –gac aaa cct gag ccc taa ggg- 3'

Rat-MnSOD-rev 5' –ctt ctt gca aac tat g- 3'

Als interne Kontrolle wurde gleichzeitig als Housekeeping Gen ein 303 bp Fragment der codierenden Sequenz des GAPDH-Gens (*rattus norvegicus*, M17701) amplifiziert. Dazu wurden folgende sequenzspezifische Primerpaare verwendet:

GAPDH-fw 5' –acg gga agc tca ctg gca tg- 3'

GAPDH-rev 5' –cca cca ccc tgt tgc tgt ag- 3'

Die Amplifizierung wurde mit 2 x PCR-Puffer (2 x PCR Master Mix #0171 von Fermentas GmbH) durchgeführt. Vorwärts- und Rückwärtsprimer für beide Genprodukte wurden in 500 nM Konzentration zugesetzt und das Gesamtvolumen mit sterilem Wasser auf 25 µl aufgefüllt. Die weiteren PCR-Bedingungen waren: initiale Denaturierung 120 sec bei 95°C, danach 25, 27 bzw. 29 Amplifikationszyklen mit je 30 sec bei 95°C (Denaturierung), je 35 sec bei 52°C (Annealing), je 45 sec bei 72°C (Extension) und einer finalen Elongation über 7 min bei 72°C.

Je 6 µl der Amplifikationsprodukte wurden elektrophoretisch in einem 1,5 %igen Agarosegel mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid aufgetrennt und visualisiert. Als Molekulargewichtsmarker von 3000 bis 100 bp wurde im Gel zusätzlich Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (#SM0321 von Fermentas GmbH) verwendet. Im Anschluss erfolgte die Aufnahme des Gels unter UV-Licht (MultiImage™ Light

Cabinet, Alpha Innotec Corp., Computerprogramm Chemilmager 4400). Die Quantifizierung erfolgte mittels Densitometrie (Computerprogramm Tina 2.09g).

### **3.2.8 Verifizierung der differentiellen Genexpressionsanalyse - RT-PCR der MT1-mRNA**

Die RT-PCR der MT1-mRNA wurde entsprechend der RT-PCR der MnSOD-mRNA durchgeführt. Zur Amplifizierung eines 186 bp Fragments der codierenden Sequenz des MT1-Gens (*rattus norvegicus*, J00750) wurden folgende sequenzspezifische Primerpaare verwendet:

Rat-MT1-fw 5' –gaa ctg caa atg cac ctc ct- 3'

Rat-MT1-rev 5' –act tgt ccg agg cac ctt t- 3'

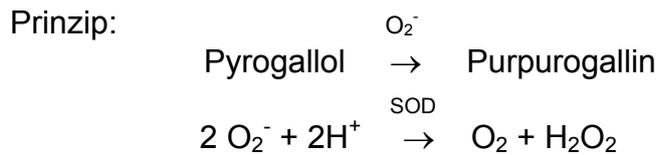
Die weiteren PCR-Bedingungen waren: initiale Denaturierung 120 sec bei 95°C, danach 17, 19 bzw. 21 Amplifikationszyklen mit je 45 sec bei 95°C (Denaturierung), je 40 sec bei 54°C (Annealing), je 50 sec bei 72°C (Extension) und einer finalen Elongation über 7 min bei 72°C.

### **3.2.9 Bestimmung der mitochondrialen, manganabhängigen Superoxiddismutase (MnSOD)**

Die Messung der katalytischen Aktivität von Superoxiddismutasen stellt sich als schwierig dar, da als Substrat der SOD freie, instabile Radikale fungieren. Daher sind die gängigen Methoden zur Aktivitätsbestimmung der SOD in Leberhomogenaten indirekten Typs. Zum Teil basieren diese auf zwei Komponenten, einem Superoxidgenerator und einem Superoxiddetektor. Voraussetzung für den Generator ist eine kontrollierte Radikalproduktion, und der Detektor reagiert mit den erzeugten Radikalen, bzw. in Anwesenheit von SOD wird diese Reaktion kompetitiv gehemmt. Hier wurde die Aktivität der MnSOD mittels verschiedener Methoden überprüft.

#### Methode nach MARKLUND and MARKLUND (1974)

Die Methode beruht auf der Autooxidation des Polyphenols Pyrogallol (1,2,3-Trihydroxybenzol) in wässriger, leicht alkalischer Lösung unter Bildung des gelb gefärbten Oxidationsproduktes Purpurogallin, dessen Konzentrationsanstieg photometrisch bei 420 nm und 25°C gemessen wird. Dieser Oxidationsprozess kann durch aktive Superoxiddismutase kompetitiv gehemmt werden, wobei diese Hemmung der SOD-Aktivität proportional ist.



Die 50 %ige Inhibierung der Autooxidation von Pyrogallol gegenüber dem 100 %-Wert wird als 1 Einheit (U) der Aktivität der Superoxiddismutase definiert.

Anhand dieser Definition und der eingesetzten Volumina und Verdünnungen ergibt sich für die Berechnung der SOD-Aktivität folgende Formel:

$$(U / ml) = \frac{(\Delta E / \text{min}[100\%] - \Delta E / \text{min}[\text{Pr}]) * V_{\text{ges.}} * V}{0,5 * \Delta E / \text{min}[100\%] * v * d}$$

$V_{\text{ges.}}$  = Gesamtvolumen in der Küvette (3,0 mL)

$V$  = Probenverdünnung

$v$  = Volumen der Probe im Test (0,05 mL)

$d$  = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

Die neben der MnSOD im Gesamtzellhomogenat vorhandene Cu/Zn-SOD wurde in diesem Ansatz durch Zugabe von KCN inhibiert.

#### Native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) nach BEAUCHAMP and FRIDOVICH (1971) und LAEMMLI (1970)

Bei dieser semiquantitativen Methode wurden in einem ersten Schritt die Proteine im Leberzellhomogenat mittels nicht denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dazu wurden die Homogenate in Konzentrationen entsprechend jeweils 40 µg bzw. 80 µg Protein in 12 %ige Polyacrylamidgele eingebracht. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde die Cu/Zn-SOD im Gel in einem 2mM KCN-Bad über 30 min deaktiviert. Da eine nicht-enzymatische Radikalerzeugung für die Aktivitätsbestimmung der SOD in Rohhomogenaten von Vorteil ist, erfolgt die  $\text{O}_2^-$ -Radikalbildung hier photochemisch mit Riboflavin als photosensitiver Substanz. Als Indikatorreaktion für die gebildeten Superoxidradikale wird die Reduktion von Nitrobluetetrazolium (NBT) zu einem blau gefärbten Diformazan genutzt (Abb. 3). Hierzu wurde das Gel nacheinander für je 30 min bei Dunkelheit in NBT-Lösung (0,25 mg/ml) und Riboflavinlösung (0,2 mg/ml) inkubiert und danach mit Wasser abgespült.

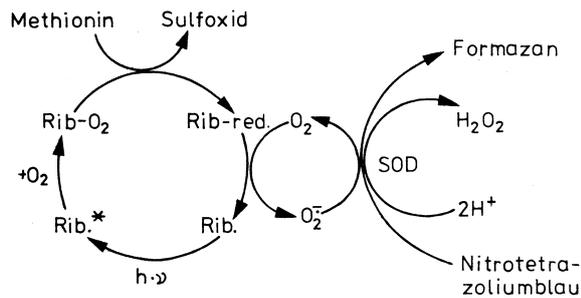


Abb. 3: Reaktionsschema der photochemischen Bestimmung der SOD-Aktivität

Da die aktive MnSOD diese NBT-Reduktion kompetitiv hemmt, werden die MnSOD-Banden nach kurzer Belichtungszeit als entfärbte Stellen im ansonsten dunkelblau gefärbten Gel sichtbar und können densitometrisch (Computerprogramm Tina 2.09g) ausgewertet werden.

#### Methode nach CRAPO et al. (1978)

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Reduktion von Ferricytochrom C durch Superoxidradikale, wobei Xanthin und Xanthinoxidase als Superoxidradikalquelle fungieren. Nach Inaktivierung der Cu/Zn-SOD durch KCN wurde die kompetitive Hemmung der Cytochrom C-Reduktion durch die MnSOD photometrisch bei 550 nm und 37°C gemessen. Die Messung kann auch bei 418 nm erfolgen, allerdings reagiert Cytochrom C mit Cyanid langsam zu einem Komplex, welcher die Absorption bei 418 nm beeinflussen kann. Die Reaktion von Superoxidradikalen mit Cytochrom C wird durch diese Komplexbildung nicht beeinflusst. Eine Einheit der MnSOD-Aktivität ist hier definiert als die Menge SOD, welche die Reduktionsrate des Cytochrom C um 50 % inhibiert.

Anhand dieser Definition und der eingesetzten Probenvolumina und Verdünnungen ergibt sich für die Berechnung der SOD-Aktivität folgende Formel:

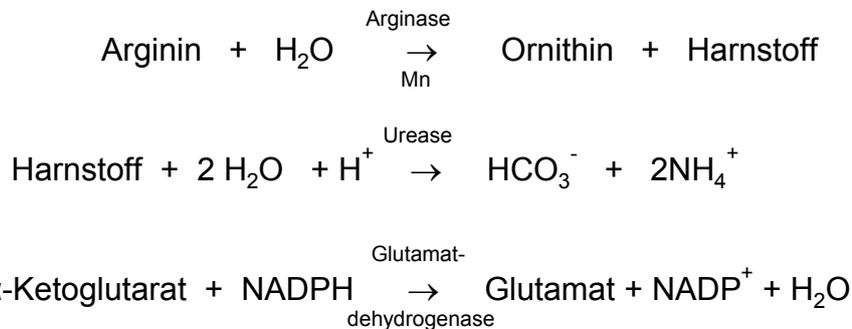
$$(U/ml) = \frac{(\Delta E / \text{min}[100\%]) - \Delta E / \text{min}[\text{Pr}]}{0,5 * \Delta E / \text{min}[100\%] * 0,01}$$

### **3.2.10 Arginasebestimmung**

Zur Bestimmung der Arginase wurde die enzymgekoppelte spektrophotometrische Methode nach ÖZER (1985) herangezogen. Hierbei wird Arginin durch die mit Manganchlorid aktivierte Arginase in Ornithin und Harnstoff aufgespalten. Der Harnstoff wird im zweiten Schritt durch Urease weiter abgebaut. Das dabei entstandene Ammoniumion reagiert im dritten Schritt mit α-Ketoglutarat zu Glutamat,

wobei NADPH zu  $\text{NADP}^+$  oxidiert wird. Die Abnahme an NADPH kann photometrisch bei 340 nm gegen den Blindwert gemessen werden. Die Standardisierung der Methode erfolgte anhand einer Eichkurve mit L-Arginase (L-Arginase from bovine liver, Fluka 10995).

Prinzip:



Die während der Reaktion zusätzlich auftretende Autoxidation von NADPH und eine mögliche argininolytische Aktivität der Urease führen (auch in Abwesenheit von Arginase) zu einer gleichmäßigen, sehr geringen Absorptionsabnahme, die vernachlässigt werden kann.

### 3.2.11 Bestimmung des totalen antioxidativen Status (TAOS)

Da die Genexpression z.B. der MnSOD insbesondere redoxsensitiven Einflussfaktoren unterliegt, wurde der Totale Antioxidative Status (TAOS) als ein Indikator für die antioxidative Kapazität erfasst. Die TAOS-Methode wurde von MILLER et al. (1993) entwickelt, um die antioxidative Kapazität im Blutplasma zu erfassen. Diese setzt sich zusammen aus den verschiedenen Proteinfractionen und anderen antioxidativ wirksamen Substanzen (Albumin, Transferrin, Caeruloplasmin, Proteinthiole, Harnsäure, Bilirubin, Carotinoide, Tocopherole, Ascorbinsäure). Die Methode wird des Weiteren eingesetzt bei lebensmittelchemischen Untersuchungen zur antioxidativen Kapazität von Getränken. In dieser Untersuchung wurde die Methode entsprechend der Originalvorschrift für Blutplasma (MILLER et al. 1993) mit verdünnten Leberhomogenaten getestet, wobei mit 200facher Verdünnung bei 37°C vergleichbare Reaktionskinetiken wie bei unverdünnten Plasmaproben gefunden werden konnten.

Das Prinzip der Methode beruht auf der Aktivierung von Metmyoglobin durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ , wobei das entstandene Ferrylmyoglobinradikal ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate)) oxidiert wird. Das so entstandene ABTS-

Radikalkation kann photometrisch bei drei verschiedenen charakteristischen Wellenlängen (650, 734 und 815 nm) gegen den Blindwert gemessen werden.

Prinzip:



Das Maß der kompetitiven Hemmung der Bildung dieses ABTS-Radikalkations durch die Antioxidantien in der Probenmatrix kann zur Standardisierung mit der Hemmung durch Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-Carboxylsäure), einem wasserlöslichen  $\alpha$ -Tocopherol-Analogon, verglichen werden, woraus sich anhand einer Trolox-Eichkurve eine Ergebnisdarstellung in mM TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) ergibt. Zudem ist eine Ergebnisdarstellung in prozentualer kompetitiver Hemmung der Radikalbildung im Vergleich zum Blindwert möglich (RICE-EVANS and MILLER 1994).

In der vorliegenden Untersuchung wurde eine Endpunktmessung bei 734 nm nach jeweils 2, 3 und 4 min vorgenommen, wobei die Werte nach 4 min teilweise außerhalb der Trolox-Eichkurve lagen.

### 3.2.12 Bestimmung der Thiobarbitursäure reaktiven Substanzen (TBA-RS)

Als ein Parameter des oxidativen Stresses wurden als Indikator der Lipidperoxidation die Thiobarbitursäure reaktiven Substanzen (TBA-RS) in den Leberhomogenaten bestimmt (GÜNTHER et al. 1994). Der Thiobarbitursäuretest dient zum Nachweis sekundärer Abbauprodukte ungesättigter Fettsäuren wie Aldehyde und Ketone, welche mit 2-Thiobarbitursäure zu fluoreszierendem Trimethin-Farbstoff reagieren.

Hierfür wurde zunächst das Protein in den Leberhomogenaten mittels Trichloressigsäure ausgefällt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mit TBA und Butylhydroxytoluol (BHT) versetzt, luftdicht verschlossen und gut geschüttelt. Nach 15minütiger Inkubation im siedenden Wasserbad und anschließender Abkühlung auf Eis erfolgte die Extraktion des entstandenen Farbstoffs mit Butanol. In der durch Zentrifugation separierten Butanolphase wurde dann der Trimethin-Farbstoff fluorometrisch gemessen (Extinktion 532 nm, Emission

553 nm). Die Berechnung der TBA-RS-Konzentration in nmol/g erfolgte anhand einer Tetraethoxypropan-Standarddeichkurve (TEP).

### 3.2.13 Metallothioneinbestimmung

Als weiterer Parameter des oxidativen Stresses und aufgrund der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse wurde die Konzentration des Metallothioneins (MT) in den Leberhomogenaten bestimmt. Als Methode wurde der Cadmium-Bindungsassay nach EATON and TOAL (1982) herangezogen. Das Prinzip der Methode beruht auf der höheren Bindungsaffinität des Cadmiums zum MT im Vergleich mit anderen zweiwertigen Schwermetallionen. Diese werden während der Inkubation mit Cd-Lösung quantitativ aus ihren Bindungsstellen verdrängt.

Im ersten Schritt wurden die Leberhomogenate zentrifugiert, der klare Überstand mit radioaktivem  $^{109}\text{Cd}$  inkubiert und anschließend das überschüssige Cd mit Hämoglobin gebunden und nach Hitzedenaturierung abzentrifugiert. Im Überstand wurde die radioaktive Markierung des MT im  $\gamma$ -Counter (MINAXI Auto Gamma 5000 Series, Packard) gemessen und daraus die MT-Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$$\mu\text{g MT/ml} = (\text{Cts}_{(P)} - \text{Cts}_{(BW)}) * (10,68/\text{Cts}_{(T)}) * V$$

$\text{Cts}_{(P)}$  = Counts pro Minute in der Probe

$\text{Cts}_{(BW)}$  = Counts pro Minute im Blindwert

$\text{Cts}_{(T)}$  = Counts pro Minute der Totalaktivität

V = Verdünnung der Probe

Faktor 10,68 =  $(0,3 \mu\text{g Cd/Probe}) / (0,1124 \mu\text{g/nmol Cd}) / 0,25 \text{ ml Probenvolumen}$

Die Umrechnung von MT-gebundenem Cd (nmol/ml) in MT ( $\mu\text{g/ml}$ ) erfolgte unter der Annahme, dass trotz der sieben möglichen Bindungsstellen pro mol MT durchschnittlich 6 mol Cd gebunden werden und das Molekulargewicht von MT ca. 6000 g/mol beträgt. Somit entspricht 1 nmol Cd/ml 1  $\mu\text{g MT/ml}$  (ONOSAKA and CHERIAN 1982). Der MT-Gehalt in der Leber wurde in  $\mu\text{g MT/g Protein}$  angegeben.

### 3.2.14 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentrationen in den für die verschiedenen Enzymaktivitätsmessungen und die MT-Bestimmung hergestellten Leberhomogenaten wurden entsprechend der Methode nach BRADFORD (1976) bestimmt. Das Prinzip der Methode beruht darauf,

dass Coomassie-Brilliant-Blue mit basischen und aromatischen Aminosäuren einen Farbkomplex bildet, welcher photometrisch bei 595 nm gegen den Blindwert gemessen wird. Die Standardisierung erfolgte mittels einer Albumin-Eichkurve.

### **3.3 Statistische Auswertung und Ergebnisdarstellung**

Die deskriptive Aufbereitung und graphische Darstellung des Datenmaterials wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel 2000 durchgeführt. Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte mittels SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) für Windows (Version 11.5) und umfasste die Prüfung auf Normalverteilung (KOLMOGOROV-SMIRNOW- und SHAPIRO-WILK-Test) und Varianzhomogenität (LEVENE-Test) sowie die einfaktorielle Varianzanalyse mit anschließendem Signifikanztest nach TUKEY. Das Signifikanzniveau betrug 5 % ( $p < 0,05$ ). Bei nicht gegebener Varianzhomogenität (LEVENE-Test  $p < 0,05$ ) wurde die Signifikanz von Mittelwertunterschieden mit dem Test nach GAMES-HOWELL überprüft. Bei nicht gegebener Normalverteilung wurden die Mittelwertvergleiche nach logarithmischer Transformation durchgeführt.

Die tabellarische Ergebnisdarstellung der biochemischen Parameter MnSOD, Arginase, TAOS, TBA-RS und MT erfolgte zum einen in den vollständigen Versuchsgruppen ( $n = 9$ ) und zum anderen nur mit den Proben, welche für die beiden Genexpressionsanalysen gepoolt wurden ( $n = 3$ ). Für die Ergebnisse dieser Proben und der densitometrischen Auswertung der RT-PCR wurde nach Test auf Normalverteilung (KOLMOGOROV-SMIRNOW) der t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt.

Die in den Tabellen aufgeführten Ergebnisse stellen Gruppenmittelwerte ( $M$ )  $\pm$  Standardabweichungen der Einzelwerte ( $SD$ ) dar. Signifikante Mittelwertunterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind in den Ergebnistabellen durch unterschiedliche Hochbuchstaben gekennzeichnet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Rohnährstoffkonzentrationen und Bruttoenergie der Versuchsdäten

Die analytisch ermittelten Gehalte an Rohnährstoffen sowie die Bruttoenergie der Versuchsdäten sind in Tabelle 5 aufgeführt. Mangel- und Kontrolldiät wiesen innerhalb üblicher Schwankungsbreiten vergleichbare Bruttoenergie-, Rohfett-, Stärke-, Zucker-, Rohprotein-, Trockenmasse- und Rohfasergehalte auf.

Tabelle 5: Analytisch ermittelte Gehalte an Rohnährstoffen (%) und Bruttoenergie (kJ/g) der Versuchsdäten bezogen auf die Frischmasse

	Diät für Gruppe I (- Mn)	Diät für Gruppe II und III (+ Mn)
Energie (kJ/g FM)	18,02 ± 0,02	18,17 ± 0,09
Rohfett (% FM)	7,51 ± 0,02	7,51 ± 0,12
Stärke (% FM)	43,43 ± 0,01	44,45 ± 0,00
Zucker (% FM)	8,96 ± 0,14	8,84 ± 0,07
Rohprotein (% FM)	17,65 ± 0,05	17,60 ± 0,06
Trockenmasse (%)	91,23 ± 0,01	91,35 ± 0,06
Rohasche (% FM)	3,56 ± 0,01	3,75 ± 0,01
Rohfaser (% FM)	8,56 ± 0,18	8,58 ± 0,21

### 4.2 Mineralstoffkonzentrationen der Versuchsdäten

Wie in Tabelle 6 zu sehen, waren die Konzentrationen der Mengenelemente Calcium, Magnesium und Phosphor sowie der Spurenelemente Eisen, Kupfer und Zink in Mangel- und Kontrolldiäten innerhalb der Analysenschwankungen übereinstimmend. Die Eisenkonzentrationen waren jedoch um etwa 30 % niedriger als erwartet. Durch die über den Empfehlungen liegende Eisenzulage im Mineralstoffprämix entsprachen die analysierten Eisenkonzentrationen dennoch den Vorgaben des NRC 1995 von 35 mg/kg.

Die Mangankonzentration in der Manganmangeldiät I (- Mn) lag mit  $0,35 \pm 0,01$  mg/kg FM erwartet niedrig, während die Mangankonzentration in Diät II bzw. III (+ Mn) mit  $18,8 \pm 0,74$  mg/kg FM wie geplant über den Mindestempfehlungen von NRC und AIN-93 lag.

Tabelle 6: Analytisch ermittelte Mineralstoffgehalte der Versuchsdiäten, bezogen auf die Anfangsmasse

	Diät für Gruppe I (- Mn)	Diät für Gruppe II und III (+ Mn)
Ca (g/kg FM)	5,62 ± 0,10	5,64 ± 0,10
Mg (g/kg FM)	0,61 ± 0,05	0,61 ± 0,03
P (g/kg FM)	4,54 ± 0,11	4,62 ± 0,10
Fe (mg/kg FM)	40,96 ± 4,51	33,16 ± 2,70
Cu (mg/kg FM)	5,94 ± 0,42	7,27 ± 0,57
Zn (mg/kg FM)	32,51 ± 4,04	32,97 ± 4,99
Mn (mg/kg FM)	0,35 ± 0,01	18,84 ± 0,74

### 4.3 Versuchsverlauf

Während des 6wöchigen Versuchszeitraumes traten keine Tierverluste auf. Einzelne Tiere in Gruppe II (+ Mn *pair fed* zu Gruppe I) lagen in den Versuchswochen 4 und 5 in ihrer Futteraufnahme unter den Tier-zu-Tier *pair fed*-Mengen, woraufhin in Versuchswoche 5 auf eine gruppenweise *pair fed*-Diätzuteilung umgestellt wurde.

Auch in der Manganmangelgruppe I (- Mn) traten über den gesamten Versuchsverlauf keine gesundheitlichen Störungen, Verhaltensbeeinträchtigungen oder sichtbare Mangelsymptome auf.

### 4.4 Zootechnische Parameter

Die Futteraufnahme und die Futterverwertung sind in Tabelle 7 dargestellt. In den ersten fünf Versuchswochen waren zwischen den Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede bei der Futteraufnahme festzustellen. Nur in Woche 6 lag die Futteraufnahme in Gruppe I (- Mn) signifikant niedriger als in Gruppe III (+ Mn a.l.). Die in der sechsten Versuchswoche niedrigere Gesamt-Futteraufnahme in Gruppe II (+ Mn p.f.) gegenüber Gruppe III (+ Mn a.l.) war darauf zurückzuführen, dass in der *pair fed*-Gruppe in Woche 6 die Futteraufnahme nur über sechs Tage ermittelt wurde. Von Woche 5 zu Woche 6 war eine signifikante Erhöhung der Futteraufnahme in Gruppe III zu beobachten, möglicherweise beeinflusst durch die ab Ende von Woche 5 für alle Gruppen eingesetzten größeren Futterzugänge in den Stoffwechselkäfigen.

Tabelle 7: Futteraufnahme (g) pro Versuchswoche und Futtermittelverwertung (FV g Futter/g Zunahme) der Ratten über den 6wöchigen Versuchszeitraum

Gruppe		Futteraufnahme (g) pro Versuchswoche						gesamt	FV (g/g)
		1	2	3	4	5	6		
I (- Mn)	M	58,5	90,7	97,9	105,9	101,9	106,2 <sup>a</sup>	561,0	2,69
	SD	14,2	7,2	7,4	12,1	6,3	13,5	44,3	0,14
II (+ Mn p.f.)	M	55,1	90,7	97,5	98,6	97,5	97,7*	537,0*	2,53
	SD	16,0	7,2	7,1	9,6	6,4	8,4	28,7	0,11
III (+ Mn a.l.)	M	61,5	92,0	105,1	106,3	93,8	122,5 <sup>b</sup>	596,2	2,64
	SD	18,5	16,1	11,4	5,1	11,0	12,4	28,2	0,15

Unterschiedliche Buchstaben markieren signifikante Gruppenunterschiede  $p < 0,05$  (Tukey); in Gruppe III (+ Mn a.l.): signifikanter Unterschied zwischen Woche 5 und Woche 6  
\* in Gruppe II (+ Mn p.f.) FA in Woche 6 nur über 6 Tage

Bei der Lebendmasseentwicklung sowie den täglichen Zunahmen (Tabelle 8) wurden keinerlei signifikante Gruppenunterschiede festgestellt. Tendenziell war auch hier vor allem in Gruppe III (+ Mn a.l.) ein möglicher Einfluss der ab Ende von Versuchswoche 5 eingesetzten größeren Futternäpfe zu erkennen.

Tabelle 8: Lebendmasse (g) und tägliche Zunahme (g/d) der Ratten über den 6wöchigen Versuchszeitraum

Gruppe		Lebendmasse (g)							tägl. Zun. (g/d)
		d0	d7	d14	d21	d28	d35	d42	
I (- Mn)	M	38,8	77,7	123,5	161,3	199,6	226,7	248,1	4,98
	SD	2,7	12,0	12,3	15,5	15,4	15,9	22,7	0,57
II (+ Mn p.f.)	M	38,3	68,2	115,4	153,2	191,3	216,2	250,4	5,05
	SD	2,7	12,8	11,3	10,4	9,6	7,2	8,6	0,21
III (+ Mn a.l.)	M	37,9	74,3	121,5	163,6	199,7	221,5	264,5	5,40
	SD	2,5	23,0	27,7	27,3	26,1	21,5	16,8	0,39

#### 4.5 Blutparameter

Der Hämatokritwert, der Hämoglobingehalt und die Glucosekonzentration im Vollblut sind in Tabelle 9 dargestellt. Sowohl Hämatokritwert als auch Blutglucosekonzentration wiesen keine signifikanten Gruppendifferenzen auf. Der

Hämoglobingehalt war jedoch in der Manganmangelgruppe I gegenüber den adäquat mit Mangan versorgten Gruppen II (+ Mn p.f.) und III (+ Mn a.l.) signifikant erniedrigt.

Tabelle 9: Hämatokrit (%), Hämoglobin (g/dL) und Blutglucose (mg/dL) der Ratten nach 6 Versuchswochen

Gruppe	HK (%)	Hb (g/dL)	Glucose (mg/dL)
I (- Mn)	44,7 ± 1,8	13,8 <sup>a</sup> ± 0,7	83,6 ± 12,8
II (+ Mn p.f.)	46,9 ± 2,3	14,7 <sup>b</sup> ± 0,6	78,7 ± 12,4
III (+ Mn a.l.)	46,4 ± 2,0	14,8 <sup>b</sup> ± 0,8	73,4 ± 13,3

Unterschiedliche Buchstaben markieren signifikante Gruppenunterschiede  $p < 0,05$  (Tukey)

#### 4.6 Mangankonzentrationen in Leber, Femur und Plasma

Die Mangankonzentrationen im Lebergewebe, im Femur und im Blutplasma waren, wie in Tabelle 10 zu sehen, erwartungsgemäß in der Manganmangelgruppe I gegenüber den Gruppen II (+ Mn p.f.) und III (+ Mn a.l.) höchstsignifikant ( $p < 0,001$ ) erniedrigt, wobei die Mangankonzentrationen in den Lebern der Kontrollgruppen etwa um den Faktor 10 höher lagen als in der Mangelgruppe. In den Lebern der  $t_0$ -Gruppe wurden vergleichbare Mangankonzentrationen gefunden wie bei den adäquat mit Mangan versorgten Tieren zu Versuchsende.

Tabelle 10: Mangankonzentrationen in Leber (mg/kg FM), Femur ( $\mu\text{g/kg FM}$ ) und Plasma ( $\mu\text{g/l}$ ) der Ratten nach 6 Versuchswochen und im Vergleich dazu in der Leber der  $t_0$ -Gruppe zu Versuchsbeginn

Gruppe	Leber-Mn (mg/kg FM)	Femur-Mn ( $\mu\text{g/kg FM}$ )	Plasma-Mn ( $\mu\text{g/l}$ )
I (- Mn)	0,19 <sup>A§</sup> ± 0,04	61,7 <sup>A</sup> ± 8,9	1,32 <sup>A#</sup> ± 0,50
II (+ Mn p.f.)	1,94 <sup>B§</sup> ± 0,22	255,2 <sup>B</sup> ± 20,1	6,23 <sup>B#</sup> ± 0,90
III (+ Mn a.l.)	1,82 <sup>B§</sup> ± 0,13	242,1 <sup>B</sup> ± 17,1	5,88 <sup>B#</sup> ± 1,60
$t_0$	1,92 ± 0,17		

Unterschiedliche Buchstaben markieren signifikante Gruppenunterschiede: Großbuchstaben  $p < 0,001$  (Tukey außer §)

§ Games-Howell (wegen fehlender Varianzhomogenität)

# nach In-Transformation

#### 4.7 Elementkonzentrationen in Leber und Femur

Die Konzentrationen der Spurenelemente Eisen, Zink und Kupfer im Lebergewebe (Tabelle 11) und die Konzentrationen der Mengenelemente Calcium, Magnesium und Phosphor sowie der Spurenelemente Eisen und Zink im Femur (Tabelle 12) wiesen keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf.

Tabelle 11: Mineralstoffkonzentrationen im Lebergewebe der Ratten nach 6 Versuchswochen

Gruppe	Leber-Fe (mg/kg FM)	Leber-Zn (mg/kg FM)	Leber-Cu (mg/kg FM)
I (- Mn)	110,0 ± 19,9	32,21 ± 2,19	5,08 ± 0,49
II (+ Mn p.f.)	97,1 ± 29,0	30,31 ± 1,79	4,78 ± 0,37
III (+ Mn a.I.)	110,0 ± 40,1	31,06 ± 3,46	5,16 ± 1,05

Tabelle 12: Mineralstoffkonzentrationen im Femur der Ratten nach 6 Versuchswochen

Gruppe	Femur-Ca (g/kg)	Femur-Mg (g/kg)	Femur-P (g/kg)	Femur-Fe (mg/kg)	Femur-Zn (mg/kg)
I (- Mn)	87,86 ± 8,76	1,66 ± 0,13	44,81 ± 3,76	41,13 ± 1,75	105,1 ± 10,46
II (+ Mn p.f.)	89,21 ± 5,72	1,63 ± 0,12	44,23 ± 2,91	41,32 ± 3,37	103,2 ± 8,67
III (+ Mn a.I.)	85,06 ± 9,73	1,65 ± 0,14	42,77 ± 3,95	42,34 ± 5,21	95,6 ± 7,62

#### 4.8 Differenzielle Genexpressionsanalyse mit cDNA-Microarrays

Nach der Phosphorimagerauswertung der Genchips wurde aufgrund der Signalstärke des jeweiligen Arrayhintergrundes und der Normalisierung anhand der Housekeeping-Gene ein Faktor von  $> 2,5 : 1$  für signifikante Expressionsunterschiede zwischen zwei Versuchsgruppen definiert. Auf den drei Arrays konnten bei 28 Genen (Atlas Rat 1.2 Array 6 Gene; Atlas Rat 1.2 Array II 14 Gene; Atlas Rat Toxicology 1.2 8 Gene) unterschiedlicher Klassifizierungen Expressionsunterschiede von Faktor 2,5 bis 5,3 zwischen den RNA-Pools der ausgewählten Versuchsgruppen I (- Mn) und III (+ Mn a.I.) festgestellt werden. Im

Manganmangel waren die Expressionen von 11 Genen vermindert und von 17 Genen erhöht. Beeinflusst waren Transkriptionsproteine, ribosomale Proteine, Proteine des Aminosäuremetabolismus, Translationsfaktoren und extrazelluläre Kommunikationsproteine (Tabelle 13 a, b und c). Bei den auf den Genchips enthaltenen manganhaltigen oder manganaktivierten Enzymen bzw. Enzymgruppen (Arginase I und II, MnSOD, PEPCK, Pyruvatcarboxylase, Glutaminsynthetase, Leber-Catalase, Glycosyltransferasen) konnten allerdings keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden.

Tabelle 13: Einfluss eines Manganmangels auf die Genexpression in der Rattenleber nach 6 Versuchswochen (Signifikanzfaktor > 2,5) (I = Gruppe I – Mn; III = Gruppe III + Mn a.l.)

a) Auswertung des Atlas Rat 1.2 Array

<b>Gen-, Protein-Name / -Klassifikation</b>	<b>Koordinaten</b>	<b>Genbank Bez.</b>	<b>Faktor I : III</b>	<b>vorhandene Parallelen</b>
eukaryotic translation initiation factor 2 alpha subunit (EIF2-alpha) / translation factors	C12g	J02646	+3,5	
40S ribosomal protein S3A (RPS3A) / ribosomal proteins	C12b	M84716	+3,1	
40S ribosomal protein S17 (RPS17) / ribosomal proteins	C12a	K02933	+2,9	
40S ribosomal protein S12 (RPS12) / ribosomal proteins	C11e	M18547	+2,7	
carbonic anhydrase III (CA3); carbonate dehydratase III / metabolism enzymes	C10d	M22413	+2,5	nicht bestätigt
gastric inhibitory polypeptide precursor (GIP) / other extracellular communication proteins	E06e	L08831	-3,3	nicht bestätigt

Vorzeichen bei Faktor: + = Gruppe I (- Mn) > Gruppe III (+ Mn a.l.); - = Gruppe I (- Mn) < Gruppe III (+ Mn a.l.)

## b) Auswertung des Atlas Rat 1.2 Array II

<b>Gen-, Protein-Name / -Klassifikation</b>	<b>Koordinaten</b>	<b>Genbank Bez.</b>	<b>Faktor I : III</b>	<b>vorhandene Parallelen</b>
alpha initiation factor / transcription proteins	A02h	X65948	+3,5	bestätigt
40S ribosomal protein S10 (RPS10) / ribosomal proteins	D03k	X13549	+3,3	
GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein / other metabolism enzymes	D01b	U53710	+3,2	
stress-inducible chaperone mt-GrpE#1 / chaperones & heat shock proteins	D01g	U62940	+3,2	
antigen CD37 / cell surface antigens	A01h	X53517	+3,0	
hepatic product spot 14 / functionally unclassified proteins	F08h	K01934	+3,0	
sperm membrane protein (YWK-II), 3' end / cell-cell adhesion receptors	A12h	M31322	+2,9	
protein phosphatase inhibitor-1 protein / complex carbohydrate metabolism	C06b	J05592	-2,5	
cysteine dioxygenase / amino acid metabolism	C10b	D83481	-2,8	
kan-1 protein / amino acid metabolism	C11a	D43964	-2,8	
glutamate oxaloacetic transaminase 1 (GOT1) / amino acid metabolism	C10c	J04171	-3,4	nicht bestätigt
cytoplasmic beta-actin (ACTB) / housekeeping genes; cytoskeleton & motility proteins	G43	V01217	-3,4	nicht bestätigt
polymeric immunoglobulin receptor / endocytosis proteins; other trafficking & targeting proteins	C02g	X15741	-3,5	
sprague/dawley PHAS-I protein / other proteins involved in translation	D05b	U05014	-5,3	

Vorzeichen bei Faktor: + = Gruppe I (- Mn) > Gruppe III (+ Mn a.l.); - = Gruppe I (- Mn) < Gruppe III (+ Mn a.l.)

## c) Auswertung des Atlas Rat Toxicology 1.2 Array

<b>Gen-, Protein-Name / -Klassifikation</b>	<b>Koordinaten</b>	<b>Genbank Bez.</b>	<b>Faktor I : III</b>	<b>vorhandene Parallelen</b>
metallothionein 1 (MT1) / other stress response proteins	F14c	J00750	+3,8	
ribosomal protein S9 / ribosomal proteins	C14g	X66370	+3,1	
alpha initiation factor / transcription protein	A03h	X65948	+2,9	bestätigt
liver cytochrome c oxidase polypeptide VIc2 (COX6C2) / other post-translational modification proteins	C13i	M27466	+2,7	tendenziell bestätigt
pancreatic secretory trypsin inhibitor I (PSTI-I; PSTI-II); caltrin; calcium transport inhibitor / protease inhibitors	F07a	M27882	+2,7	nicht bestätigt
long chain acyl-CoA synthetase 2 (LACS2; FAACL2) / simple carbohydrate metabolism	C01n	D90109	-2,5	tendenziell bestätigt
brain fatty acid binding protein (B-FABP; FABP7; BLBP) / other trafficking & targeting proteins	B14h	U02096	-2,8	nicht bestätigt
G-alpha-12 guanine nucleotide-binding protein alpha 12 subunit (GNA12) / G proteins	E14b	D85760	-2,9	nicht bestätigt

Vorzeichen bei Faktor: + = Gruppe I (- Mn) > Gruppe III (+ Mn a.I.); - = Gruppe I (- Mn) < Gruppe III (+ Mn a.I.)

Zur Berechnung der Expressionsdifferenz kamen nur Gene, deren Signale die doppelte Intensität des durchschnittlichen Hintergrundsignals hatten. Auf den Korrelationsanalysediagrammen (scatter plots) und Phosphorimages (Abbildungen 11 a, b, c, Kapitel 5.4) ist zu erkennen, dass die Intensitäten vieler Gene im Bereich des jeweiligen Array-Hintergrundes lagen, also entweder abgeschaltet waren oder nur geringe Aktivität aufwiesen. Auch für das Gen der MnSOD (Koordinate C11j auf dem Atlas Rat Toxicology 1.2 Array) wurde in dieser Untersuchung keine Expressionsdifferenz berechnet, da die Intensitäten gering unterhalb der doppelten Hintergrundintensität des Array lagen. Insgesamt wurden so etwa 950 bis 1000 Genspots je Array nicht kalkuliert, von diesen konnten jeweils etwa 10 % der Signale nicht ausgewertet werden, da sie durch hohe Intensitäten benachbarter Spots beeinflusst bzw. überlagert wurden. Einige auf einem Chip festgestellte Expressionsunterschiede konnten teilweise durch Parallelen auf einem jeweils anderen Array nicht oder nur tendenziell bestätigt werden. Auch bei einzelnen

Housekeeping Genen wurden teilweise starke Abweichungen zwischen Parallelen auf verschiedenen Arrays festgestellt. Zudem zeigte sich ein starkes Hybridisierungssignal bei einer Negativkontrolle.

#### **4.9 Wiederholung der Differenziellen Genexpressionsanalyse**

Bei der Wiederholung der Genexpressionsanalyse mit dem Atlas Rat Toxicology 1.2 Array konnte aufgrund geringerer Expressionsunterschiede der Housekeeping Gene zwischen den Versuchsgruppen ein Faktor von  $> 2 : 1$  für signifikante Expressionsunterschiede definiert werden, welcher dann auch für eine Neuauswertung der Phosphorimages des Atlas Rat Toxicology 1.2 Array der ersten Untersuchung herangezogen wurde. Die Wiederholungsuntersuchung zeigte im Falle der auf dem Chip vorhandenen Manganmetalloenzyme ebenfalls keine signifikanten Genexpressionsunterschiede zwischen den RNA-Pools der ausgewählten Versuchsgruppen I (- Mn) und II (+ Mn p.f.), was auch bei der Neuauswertung der Phosphorimages der ersten Untersuchung nochmals bestätigt wurde. In der Wiederholungsuntersuchung waren 7 Gene (3 Gene mit um Faktor 2,2 bis 2,4 verminderter Expression und 4 Gene mit um Faktor 2,1 bis 2,9 erhöhter Expression) und in der Neuauswertung der ersten Untersuchung 15 Gene (7 Gene mit um Faktor 2,0 bis 2,9 verminderter Expression und 8 Gene mit um Faktor 2,0 bis 3,8 erhöhter Expression) unterschiedlicher Klassifizierungen im Manganmangel signifikant beeinflusst (Tabellen 14 und 15).

Die Korrelationsanalyse und die Phosphorimages der Arrays (Abb. 12, Kapitel 5.4) zeigen, dass die Hybridisierungssignale sehr vieler Genspots (ca. 900) wiederum im Bereich des doppelten Arrayhintergrundes lagen. Eine signifikante Expressionsdifferenz zwischen den Versuchsgruppen konnte in der Wiederholungsuntersuchung nur für ein Gen der ersten Untersuchung bestätigt werden, nämlich für die im Manganmangel um Faktor 2,93 bzw. 3,78 erhöhte Expression von Metallothionein 1 (Genbankbezeichnung J00750). Alle weiteren Gene, bei denen eine Beeinflussung gefunden wurde, konnten im Vergleich der beiden Untersuchungen nicht bestätigt werden. Die Intensität der MnSOD-Spots war hier für beide Versuchsgruppen höher als der doppelte Hintergrund, ein signifikanter Expressionsunterschied lag allerdings nicht vor. Übereinstimmend in beiden Untersuchungen sind demnach die Gene, deren Intensitäten ausgewertet werden

konnten und bei welchen keine Expressionsunterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt wurden.

Tabelle 14: Einfluss eines Manganmangels auf die Genexpression in der Rattenleber nach 6 Versuchswochen (Faktor > 2) (Wiederholungsuntersuchung mit dem Atlas Rat Toxicology 1.2 Array) (I = Gruppe I – Mn; II = Gruppe II + Mn p.f.)

<b>Gen-, Protein-Name</b>	<b>Koordinaten</b>	<b>Genbank Bezeichnung</b>	<b>Faktor I : II</b>	<b>Vgl. erste Unters.</b>
metallothionein 1 (MT1)	F14c	J00750	+2,93	<b>+3,78</b>
alpha-1-antiproteinase; alpha-1-proteinase inhibitor; alpha-1 antitrypsin	F06g	M32247	+2,86	n.s.
cytochrome P450 2E1 (CYP2E1); P450-J; P450RLM6	B04g	J02627	+2,19	n.s.
mitogen-activated protein kinase 3 (MAP kinase 3; MAPK3; PRKM3); p55-MAPK; extracellular signal-regulated kinase 3 (ERK3)	E09l	M64301	+2,08	n.s.
cytochrome P450 17 (CYP17); P450C17; CYPXVII; steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase	C05g	M21208	-2,24	n.s.
Suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2)	F04a	AF075382	-2,39	n.s.
carbonic anhydrase III (CA3); carbonate dehydratase III	C11d	M22413	-2,39	n.s.

Vorzeichen bei Faktor: + = Gruppe I (- Mn) > Gruppe II (+ Mn p.f.); - = Gruppe I (- Mn) < Gruppe II (+ Mn p.f.)

n.s. = nicht signifikant in der ersten Untersuchung

Tabelle 15: Einfluss eines Manganmangels auf die Genexpression in der Rattenleber nach 6 Versuchswochen (Faktor > 2) (Neuauswertung des Atlas Rat Toxicology 1.2 Array der ersten Untersuchung) (I = Gruppe I – Mn; III = Gruppe III + Mn a.I.)

Gen-, Protein-Name	Koordinaten	Genbank Bezeichnung	Faktor I : III	Vgl. Wdh.
guanine nucleotide-binding protein alpha 12 subunit (GNA12)	E14b	D85760	-2,89	n.s.
brain fatty acid-binding protein (B-FABP); FABP7; brain lipid-binding protein (BLBP)	B14h	U02096	-2,78	n.s.
long chain acyl-CoA synthetase 2 (LACS2); liver long chain fatty acid-CoA ligase (FACL2)	C01n	D90109; J05439; M55642	-2,46	n.s.
UDP-glucuronosyltransferase (UGT1.1)	C01h	U20551	-2,13	n.s.
cytochrome P-450 4A1	C05k	X07259	-2,09	n.s.
sterol 12-alpha hydroxylase	C01g	AB018596	-2,04	n.s.
clusterin (CLU); testosterone-repressed prostate message 2 (TRPM2); apolipoprotein J (APOJ); sulfated glycoprotein 2 (SGP2); dimeric acid glycoprotein (DAG)	D01l	M64723	-2,00	n.s.
V(D)J recombination activating protein 1 (RAG1)	F12m	AJ006070	+2,05	n.s.
T-cell cyclophilin	C12g	M19533	+2,08	n.s.
ribosomal protein L13A	C14d	X68282	+2,31	n.s.
cytochrome c oxidase polypeptide Vic2 (COX6C2)	C13i	M27466	+2,66	n.s.
pancreatic secretory trypsin inhibitor I (PSTI-I); cholecystokinin-releasing peptide; monitor peptide + pancreatic secretory trypsin inhibitor II (PSTI-II); caltrin; calcium transport inhibitor	F07a	M27882; M27883	+2,72	n.s.
alpha initiation factor	A03h	X65948	+2,90	n.s.
ribosomal protein S9	C14g	X66370	+3,08	n.s.
metallothionein 1 (MT1)	F14c	J00750	+3,78	<b>+2,93</b>

Vorzeichen bei Faktor: + = Gruppe I (- Mn) > Gruppe III (+ Mn a.I.); - = Gruppe I (- Mn) < Gruppe III (+ Mn a.I.)

n.s. = nicht signifikant in der ersten Untersuchung

#### 4.10 Verifizierung der differentiellen Genexpressionsanalyse - Northern Blot der MnSOD-mRNA

Wie auf dem mit Methylblau angefärbten RNA-Blot in Abbildung 4 zu sehen, wurde die RNA bei der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und erfolgreich auf die Nylonmembran übertragen. Die anschließende Hybridisierung mit der radioaktiv markierten 33mer-cDNA-Oligosonde lieferte allerdings in der Phosphorimagerauswertung nach mehreren Versuchen mit unterschiedlichen Hybridisierungszeiten, Puffer- und Sondenkonzentrationen keine densitometrisch quantifizierbaren Ergebnisse, es konnte also weder auf den Northern Blots der Mangelgruppe noch auf jenen der Kontrollgruppen eine MnSOD-mRNA-Bande nachgewiesen werden.

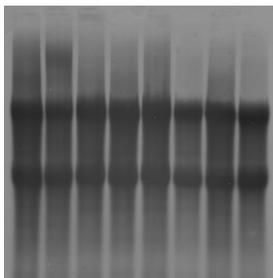


Abb. 4: Mit Methylblau angefärbter RNA-Blot

#### 4.11 Verifizierung der differentiellen Genexpressionsanalyse - RT-PCR der MnSOD-mRNA

Die densitometrische Quantifizierung der MnSOD-mRNA-RT-PCR für die in der 2. Microarrayuntersuchung eingesetzten Proben ergab keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Manganmangeltieren (Gruppe I – Mn) und den adäquat mit Mangan versorgten Tieren (Gruppe II + Mn p.f.), wobei die Expression der Mangelgruppe nach 25 PCR-Zyklen tendenziell ( $p = 0,089$ ) niedriger lag. Die auf die GAPDH-Banden (303 bp) bezogene relative optische Dichte der MnSOD-Banden (361 bp) wies mit zunehmender Zyklenzahl einen deutlichen Anstieg auf (Tabelle 16 und Abb. 5).

Tabelle 16: RT-PCR-Quantifizierung der MnSOD-mRNA (relative optische Dichte/mm<sup>2</sup> bezogen auf GAPDH) in der Rattenleber

Gruppe	relative optische Dichte/mm <sup>2</sup> nach		
	25 PCR-Zyklen	27 PCR-Zyklen	29 PCR-Zyklen
I (- Mn)	197,8 ± 49,2	296,3 ± 30,1	444,8 ± 94,5
II (+ Mn p.f.)	292,3 ± 54,3	315,3 ± 36,6	476,1 ± 49,9

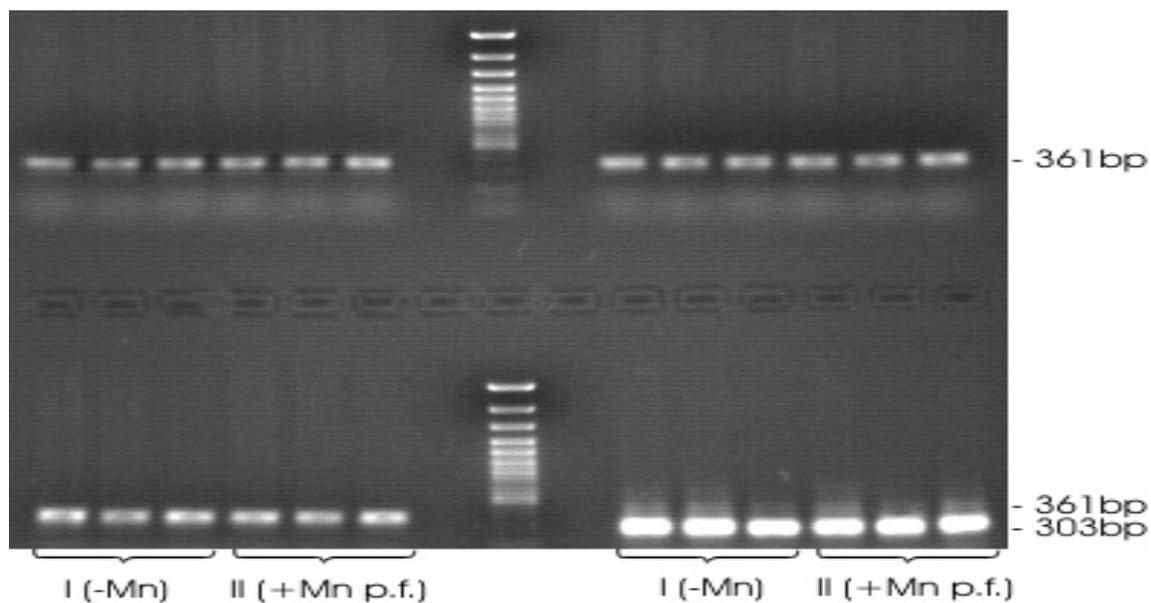


Abb. 5: RT-PCR Gelscan der MnSOD-mRNA-Expression (361 bp) nach 25 (oben links), 27 (oben rechts) und 29 PCR-Zyklen (unten links) sowie der GAPDH-m-RNA-Expression (303 bp) nach 29 PCR-Zyklen (unten rechts)

#### 4.12 Verifizierung der differentiellen Genexpressionsanalyse - RT-PCR der MT1-mRNA

Die densitometrische Quantifizierung der MT1-mRNA-RT-PCR für die in der 2. Microarrayuntersuchung eingesetzten Proben ergab nach 19 PCR-Zyklen eine etwa um Faktor 2 signifikant erhöhte Expression bei den Manganmangeltieren (Gruppe I – Mn) im Vergleich zu den adäquat mit Mangan versorgten Tieren (Gruppe II + Mn p.f.). Nach 17 Zyklen lag die optische Dichte der Banden zu nahe an der Nachweisgrenze und nach 21 Zyklen waren die Standardabweichungen der Einzelwerte zu hoch, was nur auf eine Tendenz ( $p = 0,084$ ) zur erhöhten Expression in der Mangelgruppe schließen ließ. Die auf die GAPDH-Banden (303 bp) bezogene relative optische Dichte der MT1-Banden (186 bp) zeigte mit zunehmender Zyklenzahl einen deutlichen Anstieg (Tabelle 17 und Abb. 6).

Tabelle 17: RT-PCR-Quantifizierung der MT1-mRNA (relative optische Dichte/mm<sup>2</sup> bezogen auf GAPDH) in der Rattenleber

Gruppe	relative optische Dichte/mm <sup>2</sup> nach		
	17 PCR-Zyklen	19 PCR-Zyklen	21 PCR-Zyklen
I (- Mn)	138,5 ± 37,7	223,7 <sup>a</sup> ± 38,7	467,2 ± 126,8
II (+ Mn p.f.)	111,7 ± 23,6	116,5 <sup>b</sup> ± 52,9	287,8 ± 49,3

Unterschiedliche Buchstaben markieren signifikante Gruppenunterschiede: Kleinbuchstaben p < 0,05 (t-Test)

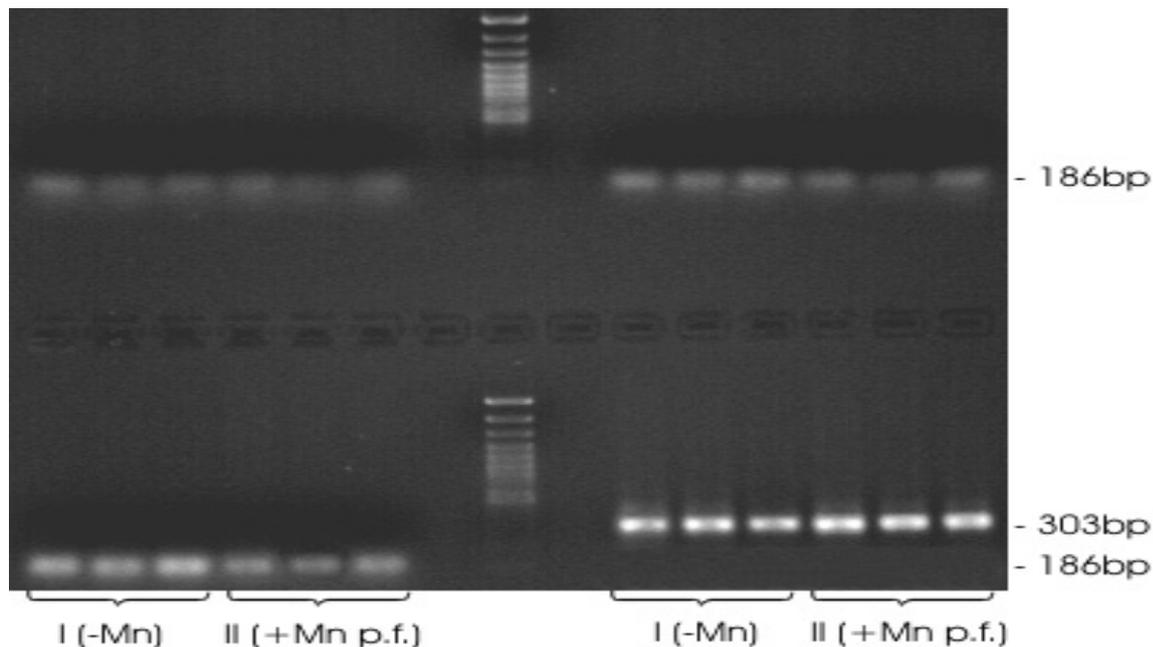


Abb. 6: RT-PCR Gelscan der MT1-mRNA-Expression (186 bp) nach 17 (oben links), 19 (oben rechts) und 21 Zyklen (unten links) sowie der GAPDH-mRNA-Expression (303 bp) nach 21 Zyklen (unten rechts)

#### 4.13 Bestimmung der mitochondrialen, manganabhängigen Superoxiddismutase (MnSOD)

##### Methode nach MARKLUND and MARKLUND (1974)

Die Aktivität der MnSOD war sowohl bezogen auf die Leberfrischmasse als auch auf das Leberprotein in Gruppe I (- Mn) signifikant niedriger (Faktor ca. 1,3) als in den adäquat mit Mangan versorgten Gruppen II und III (Tabelle 18). Bezogen auf Protein unterschied sich die Aktivität in Gruppe II hochsignifikant (p < 0,01) von Gruppe I. Bezogen auf die Leber-Frischmasse war der Unterschied zwischen Gruppe III und Gruppe I hochsignifikant. Bei den für die Genexpressionsanalyse herangezogenen

Proben konnten aufgrund der hohen Standardabweichungen bei kleiner Gruppengröße keine Signifikanzen festgestellt werden.

Tabelle 18: MnSOD-Aktivität in der Rattenleber bestimmt mit der Methode nach MARKLUND and MARKLUND (1974)

a) vollständige Versuchsgruppen

Gruppe	MnSOD (U/mg Protein)	MnSOD (U/mg Leber FM)
I (- Mn)	2,00 <sup>a</sup> ± 0,44	0,40 <sup>a</sup> ± 0,08
II (+ Mn p.f.)	2,70 <sup>B</sup> ± 0,34	0,50 <sup>b</sup> ± 0,07
III (+ Mn a.l.)	2,49 <sup>b</sup> ± 0,43	0,52 <sup>B</sup> ± 0,07

Unterschiedliche Buchstaben markieren signifikante Gruppenunterschiede: Großbuchstaben  $p < 0,01$ , Kleinbuchstaben  $p < 0,05$  (Tukey)

b) Proben entsprechend der Genexpressionsanalysen

1. Untersuchung Gruppe	MnSOD (U/mg Protein)	MnSOD (U/mg Leber FM)
I (- Mn)	2,24 ± 0,36	0,43 ± 0,07
III (+ Mn a.l.)	2,46 ± 0,67	0,53 ± 0,12

2. Untersuchung Gruppe		
I (- Mn)	1,81 ± 0,58	0,40 ± 0,11
II (+ Mn p.f.)	2,70 ± 0,49	0,47 ± 0,04

Native Polyacrylamidgelelektrophorese nach BEAUCHAMP and FRIDOVICH (1971) und LAEMMLI (1970)

Die densitometrische Auswertung der MnSOD-Banden in den NBT-gefärbten Gelen nach nativer Polyacrylamidgelelektrophorese der Leberhomogenate ergab weder bei 40 µg noch bei 80 µg in das Gel eingebrachter Proteinmenge signifikante Gruppenunterschiede, wobei die Standardabweichungen teilweise bei über 30 % der Gruppenmittelwerte lagen (Tabelle 19 und Abb. 7). Die Verdoppelung der in das Gel eingebrachten Proteinmenge von 40 µg auf 80 µg führte in der densitometrischen Auswertung nicht zu einer Verdoppelung der optischen Dichte der MnSOD-Banden, was auf eine Sättigung im Gel schließen lässt.

Tabelle 19: Densitometrische Auswertung der MnSOD-PAGE mit jeweils 40 µg bzw. 80 µg Protein (relative optische Dichte/mm<sup>2</sup>)

a) vollständige Versuchsgruppen

Gruppe	40 µg Leberprotein (OD/mm <sup>2</sup> )	80 µg Leberprotein (OD/mm <sup>2</sup> )
I (- Mn)	10296 ± 2786	14155 ± 3568
II (+ Mn p.f.)	10740 ± 3510	13631 ± 3426
III (+ Mn a.l.)	9496 ± 4360	12980 ± 5300

b) Proben entsprechend der Genexpressionsanalysen

1. Untersuchung Gruppe	40 µg Leberprotein (OD/mm <sup>2</sup> )	80 µg Leberprotein (OD/mm <sup>2</sup> )
I (- Mn)	10987 ± 3993	15014 ± 4141
III (+ Mn a.l.)	8609 ± 3476	12122 ± 3812

2. Untersuchung Gruppe	40 µg Leberprotein (OD/mm <sup>2</sup> )	80 µg Leberprotein (OD/mm <sup>2</sup> )
I (- Mn)	10680 ± 2465	14396 ± 4849
II (+ Mn p.f.)	10425 ± 3662	13982 ± 3603

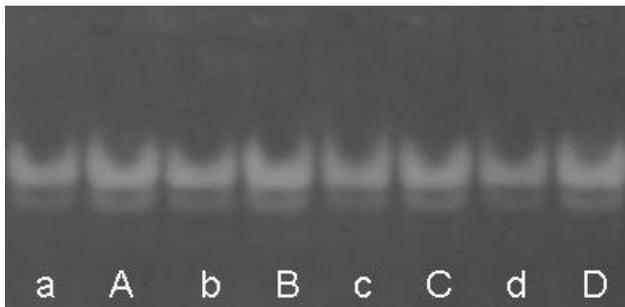


Abb. 7: Beispiel eines NBT-gefärbten Gels nach nativer PAGE der Leberhomogenate (B, D = Gruppe I – Mn; A, C = Gruppe II + Mn p.f.; Kleinbuchstaben = 40 µg Protein, Großbuchstaben = 80 µg Protein)

Methode nach CRAPO et al. (1978)

Die Cytochrom c-Methode zur Bestimmung der MnSOD-Aktivität ergab in Gruppe I (- Mn) sowohl bezogen auf die Leberfrischmasse als auch auf das Leberprotein signifikant niedrigere Werte als in den adäquat mit Mangan versorgten Gruppen II und III (Faktor > 1,5). Bezogen auf Protein unterschied sich die Aktivität in Gruppe II hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) von Gruppe I, und bezogen auf die Leber-Frischmasse waren die Aktivitäten in der Mangelgruppe im Vergleich zu Gruppe II und III

hochsignifikant erniedrigt. Bei den für die Genexpressionsanalyse in der Wiederholungsuntersuchung verwendeten Proben konnte ebenfalls eine hochsignifikante Aktivitätserniedrigung in Gruppe I festgestellt werden. Bei den Proben der ersten Microarrayuntersuchung konnten diese Gruppendifferenzen aufgrund hoher Standardabweichungen bei kleiner Gruppengröße nur tendenziell (bezogen auf Leber-FM  $p = 0,053$ ; bezogen auf Protein  $p = 0,082$ ) bestätigt werden (Tabelle 20).

Tabelle 20: MnSOD-Aktivität in der Rattenleber bestimmt durch die Methode nach CRAPO et al. (1978)

a) vollständige Versuchsgruppen

Gruppe	MnSOD (U/mg Protein)	MnSOD (U/mg Leber FM)
I (- Mn)	4,37 <sup>a</sup> ± 1,31	0,88 <sup>A§</sup> ± 0,18
II (+ Mn p.f.)	7,25 <sup>B</sup> ± 1,58	1,32 <sup>B§</sup> ± 0,23
III (+ Mn a.l.)	6,53 <sup>b</sup> ± 1,52	1,37 <sup>B§</sup> ± 0,36

Unterschiedliche Buchstaben markieren signifikante Gruppenunterschiede: Großbuchstaben  $p < 0,01$ , Kleinbuchstaben  $p < 0,05$  (Tukey)

§ Games-Howell (wegen fehlender Varianzhomogenität)

b) Proben entsprechend der Genexpressionsanalysen

1. Untersuchung Gruppe	MnSOD (U/mg Protein)	MnSOD (U/mg Leber FM)
I (- Mn)	4,73 ± 0,02	0,90 ± 0,01
III (+ Mn a.l.)	7,19 ± 1,06	1,52 ± 0,21

2. Untersuchung  
Gruppe

I (- Mn)	3,49 <sup>A</sup> ± 0,90	0,77 <sup>A</sup> ± 0,13
II (+ Mn p.f.)	9,12 <sup>B</sup> ± 0,64	1,59 <sup>B</sup> ± 0,07

Unterschiedliche Buchstaben markieren signifikante Gruppenunterschiede: Großbuchstaben  $p < 0,01$ , (t-Test)

#### 4.14 Arginasebestimmung

Bei der Bestimmung der Arginaseaktivität durch die Methode nach ÖZER (1985) ergaben sich keinerlei signifikante Gruppenunterschiede. Für die Proben der ersten Genexpressionsanalyse konnte bezogen auf die Leber-Frischmasse eine tendenziell erhöhte Arginaseaktivität ( $p = 0,071$ ) in Gruppe III (+ Mn a.l.) gegenüber Gruppe I (- Mn) festgestellt werden (Tabelle 21).

Tabelle 21: Arginasebestimmung in der Rattenleber durch die Methode nach ÖZER (1985)

##### a) vollständige Versuchsgruppen

Gruppe	Arginase (U/mg Protein)	Arginase (U/mg Leber FM)
I (- Mn)	16,63 ± 1,66	2,14 ± 0,33
II (+ Mn p.f.)	18,29 ± 2,69	2,37 ± 0,25
III (+ Mn a.l.)	18,30 ± 1,88	2,39 ± 0,23

##### b) Proben entsprechend der Genexpressionsanalysen

1. Untersuchung Gruppe	Arginase (U/mg Protein)	Arginase (U/mg Leber FM)
I (- Mn)	16,41 ± 1,08	2,02 ± 0,04
III (+ Mn a.l.)	18,57 ± 2,79	2,45 ± 0,30

2. Untersuchung Gruppe	Arginase (U/mg Protein)	Arginase (U/mg Leber FM)
I (- Mn)	16,46 ± 1,78	2,18 ± 0,51
II (+ Mn p.f.)	18,30 ± 4,40	2,43 ± 0,27

#### 4.15 Bestimmung des totalen antioxidativen Status (TAOS)

Der totale antioxidative Status nach MILLER et al. (1993) wies bei den Endpunktmessungen nach 2 und 3 min keine signifikanten Gruppendifferenzen auf (Tabelle 22). Auch bei den zur Microarrayuntersuchung eingesetzten Proben ergaben sich keine statistisch gesicherten Unterschiede.

Tabelle 22: Totaler antioxidativer Status nach MILLER et al. (1993) der Rattenleber in mM TEAC (Trolox Equivalent Antioxidative Capacity) und in prozentualer kompetitiver Hemmung der Radikalbildung im Vergleich zum Blindwert nach 2 min bzw. 3 min Inkubation

##### a) vollständige Versuchsgruppen

Gruppe	TAOS 2 min (mM TEAC)	TAOS 3 min (mM TEAC)	TAOS 2 min (% Hemmung)	TAOS 3 min (% Hemmung)
I (- Mn)	192 ± 27	368 ± 47	21,0 ± 2,4	27,5 ± 2,7
II (+ Mn p.f.)	218 ± 24	409 ± 40	21,7 ± 1,5	28,3 ± 1,7
III (+ Mn a.l.)	207 ± 33	391 ± 61	19,0 ± 3,9	25,1 ± 4,6

##### b) Proben entsprechend der Genexpressionsanalysen

1. Untersuchung Gruppe	TAOS 2 min (mM TEAC)	TAOS 3 min (mM TEAC)	TAOS 2 min (% Hemmung)	TAOS 3 min (% Hemmung)
I (- Mn)	176 ± 35	338 ± 64	20,9 ± 1,9	27,1 ± 2,4
III (+ Mn a.l.)	230 ± 26	428 ± 49	21,4 ± 4,4	28,0 ± 4,4

2. Untersuchung Gruppe	TAOS 2 min (mM TEAC)	TAOS 3 min (mM TEAC)	TAOS 2 min (% Hemmung)	TAOS 3 min (% Hemmung)
I (- Mn)	195 ± 25	376 ± 38	22,7 ± 3,0	29,1 ± 2,7
II (+ Mn p.f.)	198 ± 7	376 ± 0	21,9 ± 1,2	28,8 ± 1,6

#### 4.16 Bestimmung der Thiobarbitursäure reaktiven Substanzen (TBA-RS)

Die Bestimmung der Thiobarbitursäure reaktiven Substanzen als Maß der Lipidperoxidation in den Rattenlebern nach GÜNTHER et al. (1994) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Tabelle 23). Auch dieses Ergebnis weist somit bezüglich des oxidativen Stresses bzw. der Aktivität antioxidativer Schutzmechanismen in Hinsicht auf die Lipidperoxidation nicht auf durch Manganmangel hervorgerufene Gruppendifferenzen hin.

Tabelle 23: TBA-RS (nmol/g Leber FM) in der Rattenleber bestimmt durch die Methode nach GÜNTHER et al. (1994)

##### a) vollständige Versuchsgruppen

Gruppe	TBA-RS (nmol/g Leber FM)
I (- Mn)	73,6 ± 18,6
II (+ Mn p.f.)	68,5 ± 23,9
III (+ Mn a.l.)	75,4 ± 19,9

##### b) Proben entsprechend der Genexpressionsanalysen

1. Untersuchung Gruppe	TBA-RS (nmol/g Leber FM)
I (- Mn)	87,7 ± 5,7
III (+ Mn a.l.)	71,6 ± 22,2

2. Untersuchung Gruppe	TBA-RS (nmol/g Leber FM)
I (- Mn)	72,0 ± 13,3
II (+ Mn p.f.)	55,2 ± 13,3

#### 4.17 Metallothioneinbestimmung

Nachdem beide Genexpressionsanalysen für Metallothionein 1 eine deutlich höhere mRNA-Expression in der Manganmangelgruppe gegenüber den Kontrollgruppen aufzeigten, konnte dieses Ergebnis auch bei der Bestimmung des Gesamt-MT bestätigt werden. Die mittels Cadmium-Bindungsassay nach EATON and TOAL (1982) ermittelten Metallothioneinkonzentrationen in den Leberhomogenaten waren in der Mangelgruppe I gegenüber Gruppe III signifikant und gegenüber Gruppe II hochsignifikant erhöht. Für die Proben der ersten Microarrayuntersuchung konnte dies ebenfalls bestätigt werden. Die Proben der Wiederholungsuntersuchung wiesen in Gruppe I aufgrund hoher Standardabweichungen bei kleiner Gruppengröße nur eine tendenziell ( $p = 0,088$ ) erhöhte MT-Konzentration bezogen auf die Leberfrischmasse auf (Tabelle 24).

Tabelle 24: Metallothioneinkonzentration ( $\mu\text{g/g}$  Protein bzw.  $\mu\text{g/g}$  Leber FM) in der Rattenleber bestimmt durch die Methode nach EATON and TOAL (1982)

##### a) vollständige Versuchsgruppen

Gruppe	MT ( $\mu\text{g/g}$ Protein)	MT ( $\mu\text{g/g}$ Leber FM)
I (- Mn)	246,9 <sup>a</sup> $\pm$ 85,7	31,0 <sup>a</sup> $\pm$ 8,6
II (+ Mn p.f.)	130,0 <sup>B</sup> $\pm$ 22,7	17,0 <sup>B</sup> $\pm$ 3,2
III (+ Mn a.l.)	146,3 <sup>b</sup> $\pm$ 63,4	19,5 <sup>b</sup> $\pm$ 9,4

Unterschiedliche Buchstaben markieren signifikante Gruppenunterschiede: Großbuchstaben  $p < 0,01$ , Kleinbuchstaben  $p < 0,05$  (Games Howell wegen fehlender Varianzhomogenität)

##### b) Proben entsprechend der Genexpressionsanalysen

1. Untersuchung Gruppe	MT ( $\mu\text{g/g}$ Protein)	MT ( $\mu\text{g/g}$ Leber FM)
I (- Mn)	247,3 <sup>a</sup> $\pm$ 50,8	30,7 <sup>a</sup> $\pm$ 7,3
III (+ Mn a.l.)	96,2 <sup>b</sup> $\pm$ 27,5	12,7 <sup>b</sup> $\pm$ 3,4

##### 2. Untersuchung Gruppe

I (- Mn)	253,8 $\pm$ 133,6	31,7 $\pm$ 11,7
II (+ Mn p.f.)	117,0 $\pm$ 31,0	15,7 $\pm$ 3,8

Unterschiedliche Buchstaben markieren signifikante Gruppenunterschiede: Kleinbuchstaben  $p < 0,05$  (t-Test)

## 5 Diskussion

### 5.1 Versuchsdiät

Aufgrund der ausgewählten, auf niedrigen Mangangehalt hin überprüften Einzelkomponenten wurde in der Mangeldiät I (- Mn) ein mit  $0,35 \pm 0,01$  mg Mangan / kg FM erwartungsgemäß sehr niedriger Wert erreicht. Bei einer ebenfalls auf Maisstärke und Casein basierenden halbsynthetischen Diätmischung für einen Manganmangelversuch mit Ratten analysierten PRZYBILLA and PALLAUF (1991) in der Manganmangeldiät einen Mangangehalt von 0,5 mg/kg.

Diät II (+ Mn) enthielt  $18,84 \pm 0,74$  mg Mangan / kg FM und lag somit deutlich über den Mindestempfehlungen des NRC (1995) von 10 mg/kg. Auch die analysierten Gehalte der weiteren Mengen- und Spurenelemente lagen durch die jeweiligen Sicherheitszuschläge bei der Diätmischung auf Höhe bzw. leicht oberhalb der Empfehlungen.

### 5.2 Einfluss des Mangans auf zootechnische Parameter und Blutparameter

Während und nach Ablauf des 6wöchigen Versuchszeitraumes waren bezüglich der zootechnischen Parameter keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu erkennen. Äußerlich waren in der Mangelgruppe keine Manganmangelsymptome zu beobachten.

Der Mangangehalt der Diäten hatte keinen erkennbaren Einfluss auf Futtermittelverwertung und Lebendmasseentwicklung (vgl. Abb. 8). Somit konnte ein möglicher Einfluss dieser Faktoren auf Gruppenunterschiede bei der Genexpression minimiert werden.

Wie in Abb. 9 zu sehen, konnten bezüglich der Blutparameter weder bei der Blutglucose noch beim Hämatokritwert Gruppenunterschiede festgestellt werden. Der Hämoglobingehalt war in der Manganmangelgruppe leicht erniedrigt, lag mit  $13,8 \pm 0,7$  g/dl allerdings noch nicht im anämischen Bereich. Ähnliche Beobachtungen machten HAKHAMIAN (1973), bzw. HEISEKE und KIRCHGESSNER (1977) bei frühabgesetzten Ratten im Manganmangel. PRZYBILLA and PALLAUF (1991) fanden bei einem vergleichbaren Versuchsdesign keine Unterschiede bei diesen Blutparametern.

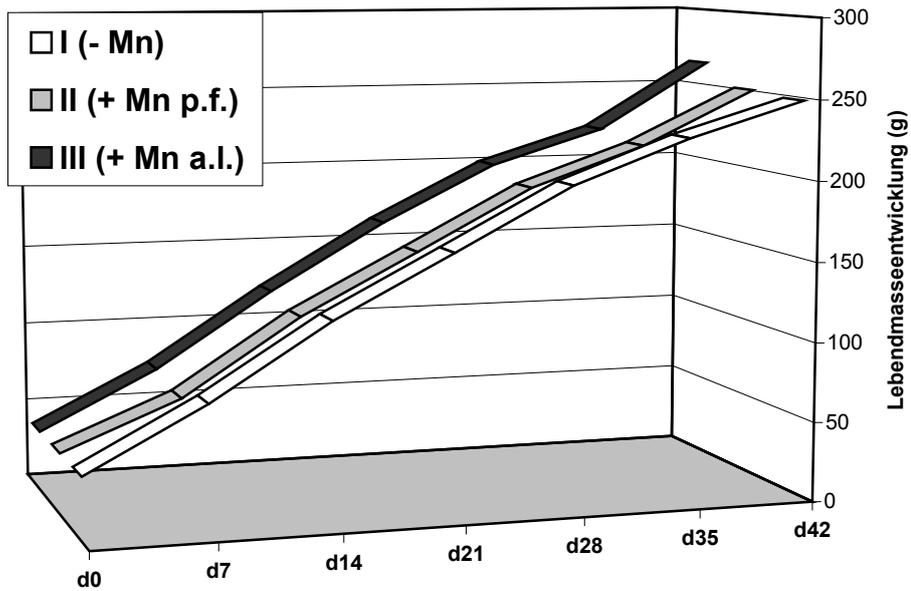


Abb. 8: Lebendmasseentwicklung (g) der wachsenden Ratten über den 6wöchigen Versuchszeitraum

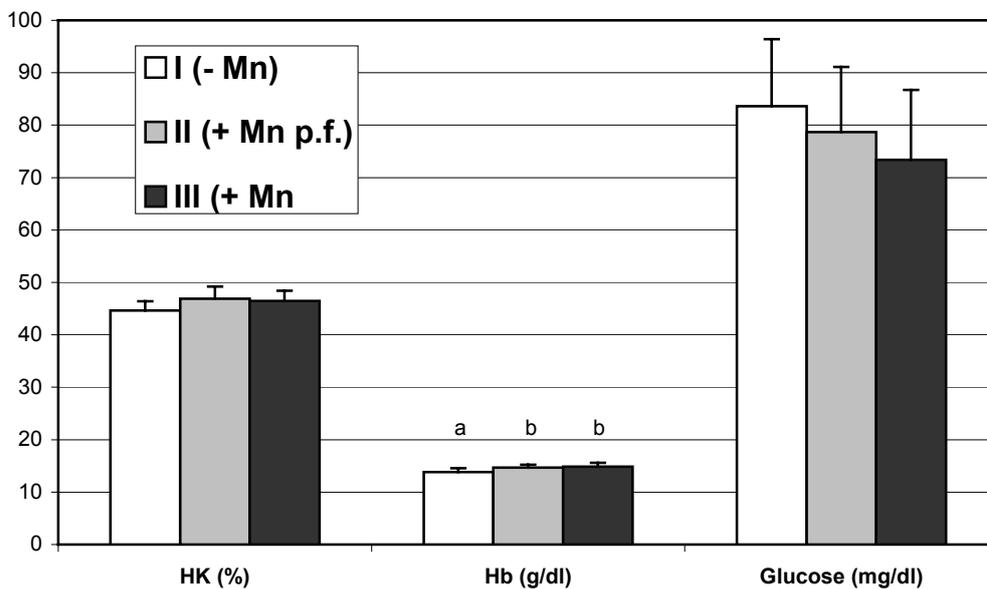


Abb. 9: Hämatokrit (%), Hämoglobin (g/dl) und Blutglucose (mg/dl) der Ratten nach 6 Versuchswochen (unterschiedliche Kleinbuchstaben markieren signifikante Gruppenunterschiede:  $p < 0,05$ )

### 5.3 Mangan- und weitere Elementkonzentrationen im Gewebe

Die Mangangehalte in Leber, Femur und Plasma waren in der Mangelgruppe hochsignifikant erniedrigt (Abb. 10), ein Einfluss auf die anderen analysierten Mineralstoffe (Fe, Zn, Cu, Ca, Mg) war hingegen nicht zu erkennen. Die Lebermangankonzentrationen in der  $t_0$ -Gruppe entsprachen den Werten der Kontrollgruppen, d.h. zu Versuchbeginn waren die Ratten ausreichend mit Mangan versorgt, und die suboptimale Manganversorgung in der Mangelgruppe führte über den 6wöchigen Versuchszeitraum zu einer höchstsignifikanten Abnahme der Mangankonzentrationen in den Lebern. Auch PRZYBILLA and PALLAUF (1991) fanden bei wachsenden Ratten nach 4 Versuchswochen bei der Verabreichung von Manganmangeldiäten im Vergleich mit adäquat versorgten Kontrolltieren um 80 % niedrigere Mangangehalte in den Lebern. In einer Studie zum Einfluss der Mangansupplementierung bei totaler parenteraler Ernährung (TPN), also bei der Umgehung der intestinalen Absorption, auf den Manganstatus bei der Ratte stellten MALECKI et al. (1995) fest, dass die Lebermangangehalte sowohl bei hoher als auch bei niedriger Mn-Supplementierung niedriger waren als bei normal gefütterten Kontrolltieren, aber in den peripheren Geweben Tibia, Milz und Pankreas der Mn-supplementierten Gruppe die höchsten Mangangehalte gefunden wurden.

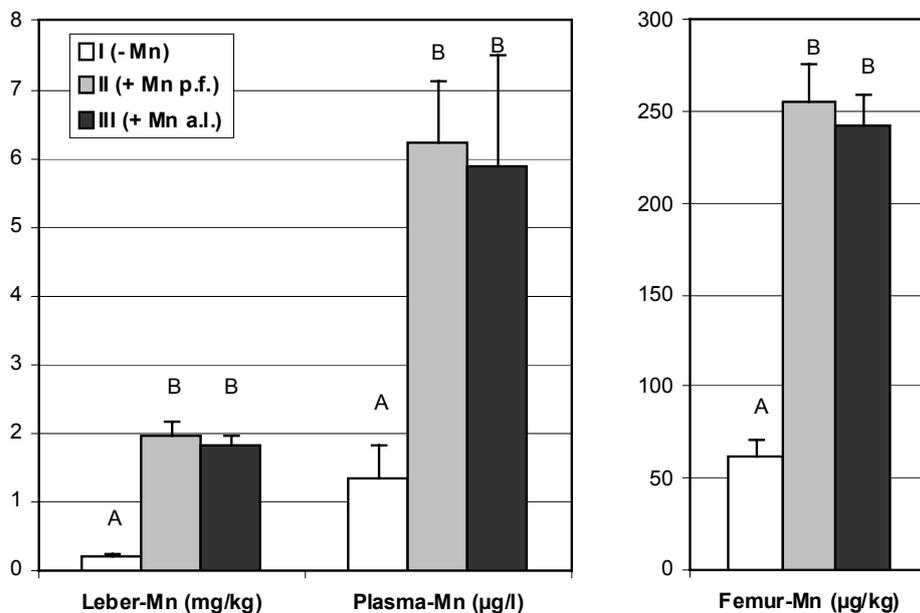


Abb. 10: Mangankonzentrationen in Leber (mg/kg), Plasma (µg/l) und Femur (µg/kg) der Ratten nach 6 Versuchswochen (unterschiedliche Großbuchstaben markieren hochsignifikante Gruppenunterschiede:  $p < 0,001$ )

#### 5.4 Differenzielle Genexpressionsanalyse mittels Microarrays

Die in dieser Untersuchung bei der Microarray-Analyse angewandte radioaktive Markierung scheint gegenüber der Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen gewisse Nachteile zu haben. Durch die nicht-lineare Strahlung kam es bei der Auswertung im Phosphorimager zu ungleichmäßigen Backgrounds und zu einer Überlagerung von sehr starken Genspots, was die densitometrische Auswertung nebeneinander platzierter Genspots teilweise unmöglich machte. In Anbetracht dessen scheint mit der zunehmenden Miniaturisierung der Chips die Fluoreszenzdetektion besser geeignet als die Radioisotopendetektion (SCHENA 2003).

Bei Betrachtung der Phosphorimages der ersten Untersuchung (Abb. 11 a-c, S. 67 ff.) im Vergleich mit denen der Wiederholungsuntersuchung (Abb. 12, S. 70) lag die Vermutung nahe, dass die Hybridisierungszeiten bzw. die Belichtungszeiten im Phosphorimager zu lang gewählt, oder bei der Hybridisierung zu hohe cDNA-Konzentrationen eingesetzt wurden. Zudem erschien auf dem Atlas Rat 1.2 Array II der Gruppe III (+ Mn a.l.) (Abb. 11 b unten rechts) ein starkes Hybridisierungssignal bei der Negativkontrolle auf Position 36 (untere Reihe, vgl. Abb. 2, S. 27). Die graphische Auswertung der Daten in Form von Korrelationsanalysen (scatter plots) zeigt, dass die Intensitäten vieler Genspots im Grenzbereich des definierten, jeweiligen Arrayhintergrundes lagen (Abb. 11 a-c, 12), dass also oftmals keine Unterscheidung möglich war, ob die Gene komplett ausgeschaltet oder nur gering beeinflusst waren. Eine weitere Problematik der Microarrayuntersuchung stellte sich in der Quantifizierung und Signifikanz der Expressionsunterschiede dar. Die in dieser Untersuchung definierten Signifikanzfaktoren von 2,5 (bzw. 2,0 in der Wiederholungsuntersuchung) lagen im Verhältnis z.B. zu den Gruppenunterschieden in der Enzymaktivität der MnSOD (Faktor ca. 1,4) relativ hoch. Wie auf den scatter plots zu sehen, lagen die Expressionsunterschiede einer Vielzahl an Genen nur wenig unterhalb dieser Signifikanzgrenzen.

Aus diesen Gründen wurde die erste Microarray-Untersuchung beanstandet und für einen der drei Chips nochmals durchgeführt. Dies brachte jedoch ein weiteres Problem mit sich, da nicht mehr ausreichend Probenmaterial vorhanden war und daher ein Probenpool von anderen Tieren der gleichen Gruppen in der Wiederholungsuntersuchung eingesetzt werden musste. Da auch hier darauf geachtet wurde, dass Proben von Tieren mit übereinstimmender

Lebendmasseentwicklung im Vergleich zu den in der ersten Untersuchung gewählten Tieren gepoolt wurden, wurde diese mögliche Fehlerquelle minimiert.

Das Poolen von Proben an sich, aus Gründen der Kostenreduzierung, stellte hier allerdings eine weitere mögliche Fehlerquelle dar, da z.B. ein physiologischer Ausreißer die gesamte Analyse eines Probenpools verfälschen könnte. Um statistisch gesicherte Daten zu bekommen, wären einzelne Microarrayanalysen mit mehreren Parallelen für jedes Tier wünschenswert gewesen. Als Gründe zum Poolen von Proben für Microarrayexperimente werden in der Literatur neben den geringeren Kosten durch eine niedrigere Zahl an benötigten Arrays auch die Steigerung der Materialmenge bei nicht ausreichender RNA-Ausbeute, das Erreichen gleichbleibender Versuchsbedingungen oder die bewusste Reduzierung der individuellen Variabilität genannt (CHURCHILL 2002, GOLD et al. 2004). Bei Vergleichstests von einzelnen und gepoolten RNA-Proben fanden MARY-HUARD et al. (2007) abweichende Ergebnisse. Zum einen führte das Poolen zur Beeinflussung einzelner Gene, zum anderen schien es die Effizienz der Markierung und der Hybridisierung herabzusetzen.

In der vorliegenden Untersuchung konnte bei den drei verwendeten Atlas Rat Arrays auf eine Vielzahl parallel vorkommender Gene für einen Vergleich von Expressionsdifferenzen zurückgegriffen werden. Die Vergleichbarkeit der gewonnenen Daten der drei verschiedenen Chips wurde allerdings durch das nachträglich durch den Hersteller eingeräumte unterschiedliche Hybridisierungsverhalten der drei Arrays eingeschränkt, was sich auch durch die unterschiedlichen Signalstärken einzelner Housekeeping Gene auf den unterschiedlichen Chips trotz gleicher Hybridisierungsbedingungen zeigte.

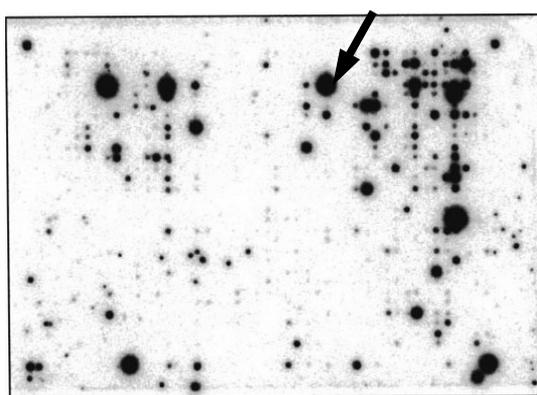
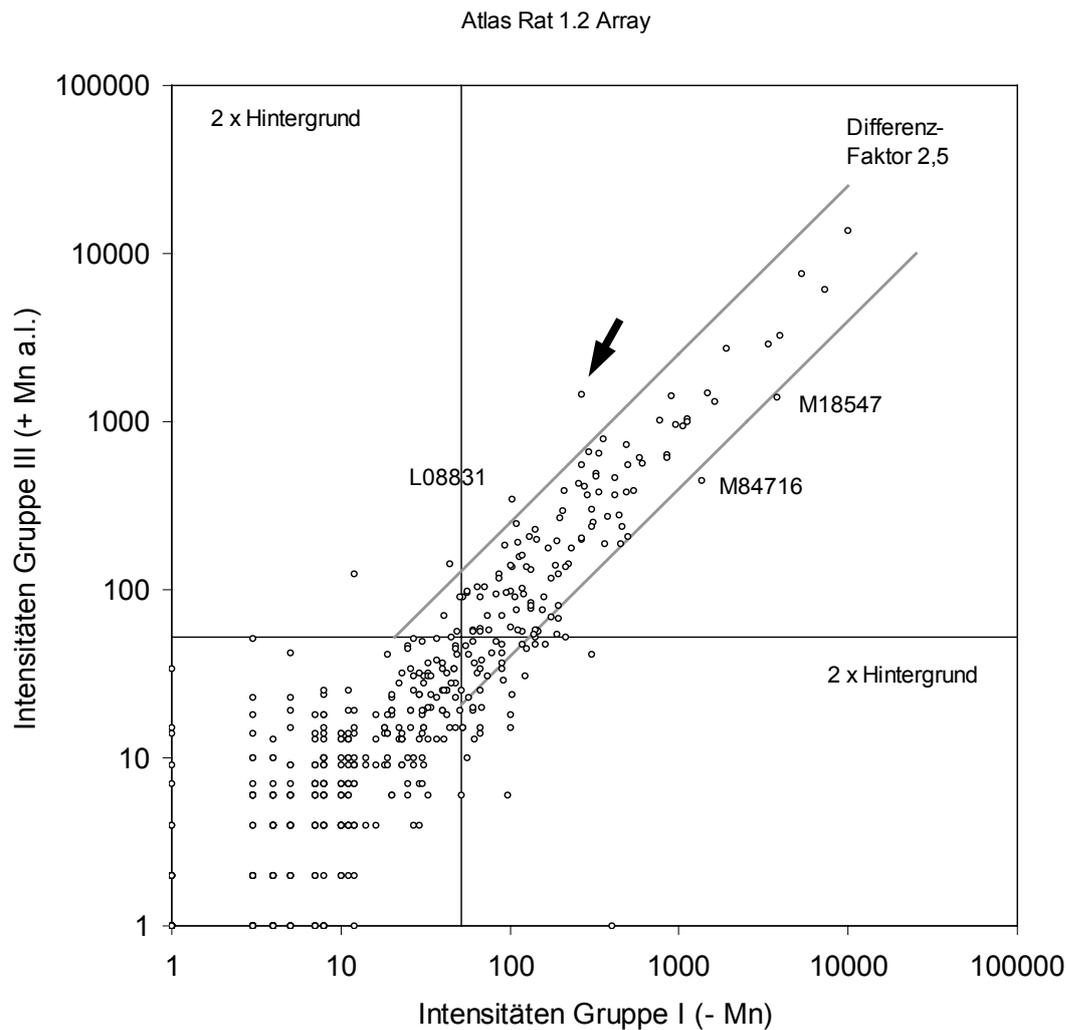
Auch YANG und SPEED (2002) berichteten von einer hohen Varianz in der Dimension der Expressionsunterschiede einzelner Gene bei cDNA-Arrays und regten daher die Durchführung mehrerer Wiederholungen an, um statistisch gesicherte Aussagen zu erhalten. TOMDIECK et al. (2003) führten die Genexpressionsanalyse für insgesamt ca. 2500 Gene daher parallel auf cDNA- und auf Oligonucleotid-Arrays durch und verifizierten zusätzlich 24 Gene per Northern Blot, wobei die Expressionsunterschiede im Northern Blot in den meisten Fällen höher ausfielen als auf den Arrays. Zudem war die Sensitivität der Arrays im Gegensatz zum Northern Blot für einige für das Versuchsdesign relevante Gene nicht hoch genug, und

weiterhin wurden einige falsch positive Signale auf den Arrays gefunden, eventuell Folge von Kreuz-Hybridisierungen.

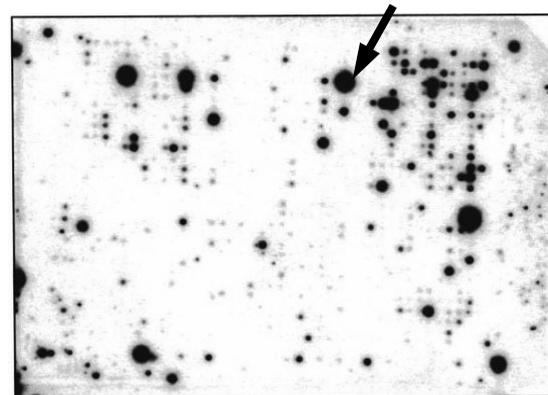
MARY-HUARD et al. (2004) wiesen auf Microarrays einen statistisch signifikanten sogenannten spotting effect nach, d.h. es traten systematische Fehler bei der gespotteten DNA-Menge und der Schärfe der Spots auf. So waren die Signale ganzer Spotreihen erhöht, bzw. nahm die Signalstärke über den ganzen Chip von einer Seite zur anderen ab. Daher sollte besonders darauf geachtet werden, dass durch systematische Normalisierungsprozeduren nur der Arrayfehler korrigiert, nicht aber biologische Effekte auf die Genexpression verfälscht werden. YUE et al. (2001) zeigten bei Vergleichsuntersuchungen der Genexpression mit insgesamt 70 cDNA-Arrays zweier unterschiedlicher Hersteller bei der Verwendung identischer Proben, einen Variationskoeffizienten von etwa 12 %, wobei hier die Hauptfehlerquellen bei der Hybridisierung und in der Gensequenz der Arrayelemente gefunden wurden. Beim Vergleich dieser Arrays nach Hybridisierung mit unterschiedlichen Gewebeproben und daraus resultierenden unterschiedlichen Genexpressionen, stieg der Variationskoeffizient auf bis zu 25 %, wobei die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit zunehmender Expressionsdifferenz abnahm. Die minimale Nachweisgrenze einer Genexpressionsänderung lag hier allerdings im Vergleich mit der vorliegenden Untersuchung mit Faktor 1,4 wesentlich niedriger. TAN et al. (2003) fanden beim Vergleich von Oligonucleotid-Arrays und cDNA-Arrays deutliche Abweichungen. PETERSEN et al. (2005) verglichen ebenfalls Oligonucleotid- und cDNA-Arrays und fanden Übereinstimmungen in der Tendenz der Genexpressionsänderung aber Abweichungen bei der Höhe der Expressionsunterschiede. Diese Untersuchungen verdeutlichen die Problematik der Vergleichbarkeit von mit unterschiedlichen Arrays, bzw. Arraysystemen ermittelten Genexpressionsdaten (MARSHALL 2004).

Nach kritischer Betrachtung dieser Methode bestätigt sich die besondere Bedeutung der statistisch gesicherten Aufbereitung, Modellierung, Prüfung und Interpretation der anfallenden umfangreichen Datenmengen, welche neben der Gewinnung der Rohdaten einen wesentlichen Teil dieser Hochdurchsatztechnologie darstellen. Da alle in der Microarrayanalytik eingesetzten Komponenten und Faktoren einen relativ starken Einfluss auf das Ergebnis haben, liegt eine Grundvoraussetzung für eine zukünftige Nutzung dieser Technologie als stand-alone-System zur zuverlässigen Quantifizierung von Genexpressionsdifferenzen in der Entwicklung von

Bioinformatiksystemen, die all diese Faktoren vom Versuchsdesign über die Qualität der Chips bis hin zur Datenaufbereitung berücksichtigen (IACOBAS et al. 2002, SCHEENA 2003, STEARS et al. 2003).

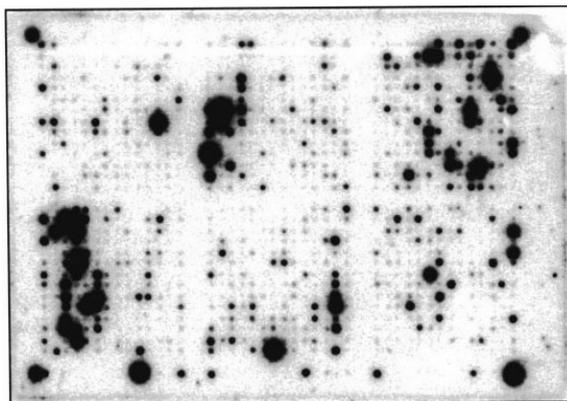
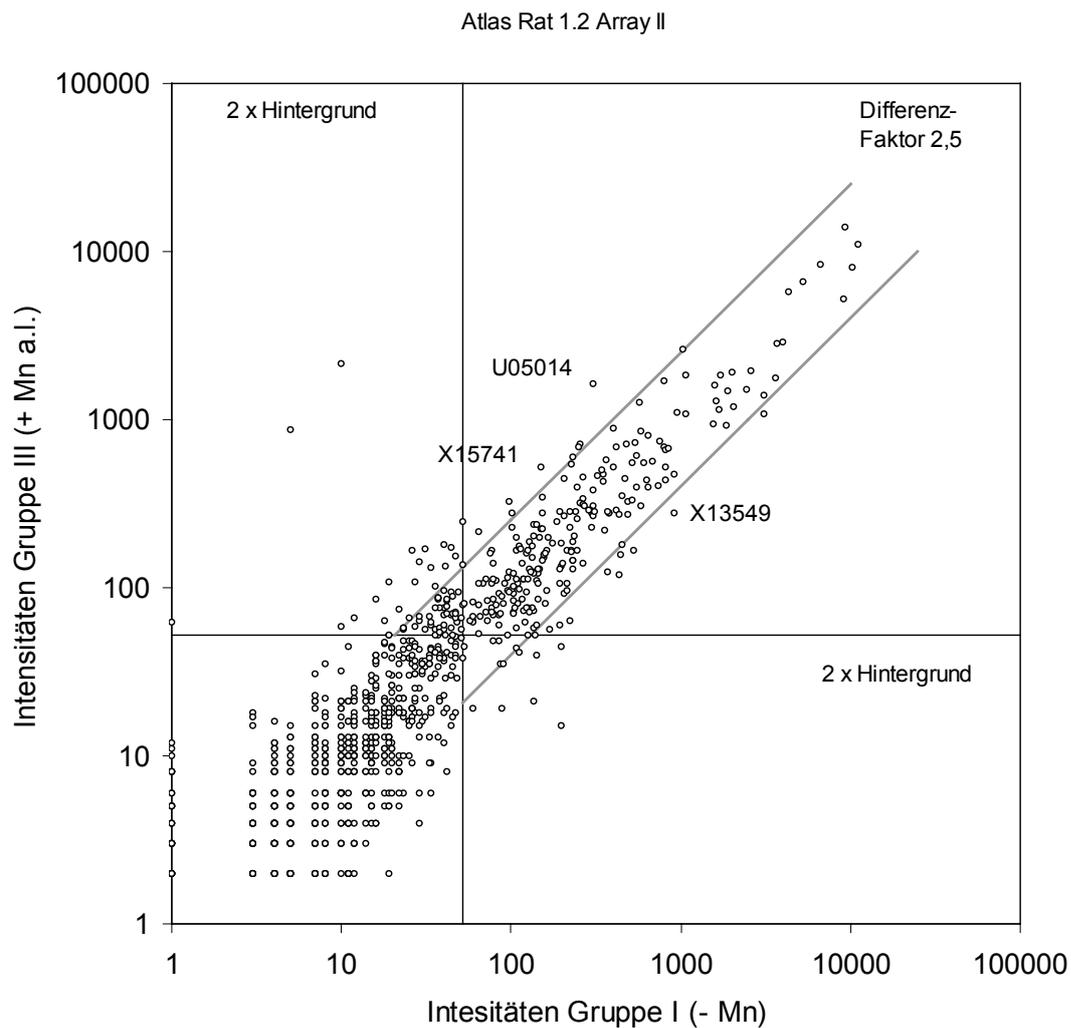


Gruppe I (- Mn)

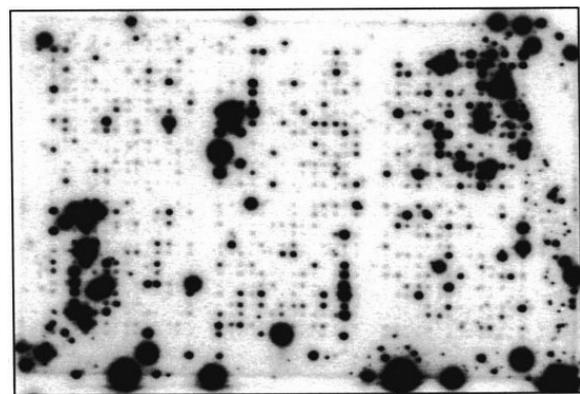


Gruppe III (+ Mn a.i.)

Abb. 11 a: Korrelationsanalyse der Intensitäten mit Beispielen von signifikant beeinflussten Genen (L08831 = gastric inhibitory polypeptide precursor; M18547 = 40S ribosomal protein S12; M84716 = 40S ribosomal protein S3A, vgl. Tabelle 13a) und Phosphorimages des Atlas Rat 1.2 Array (erste Untersuchung) der RNA-Pools aus Gruppe I (- Mn) und Gruppe III (+ Mn a.i.). Die Pfeile zeigen ein Beispiel nicht berechneter Intensitäten für einen Genspot durch die hohe Intensität eines benachbarten Genspots

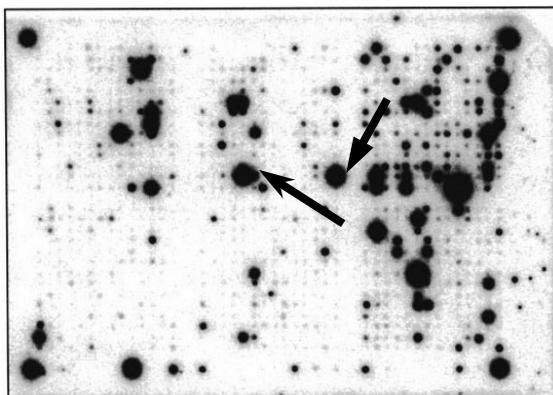
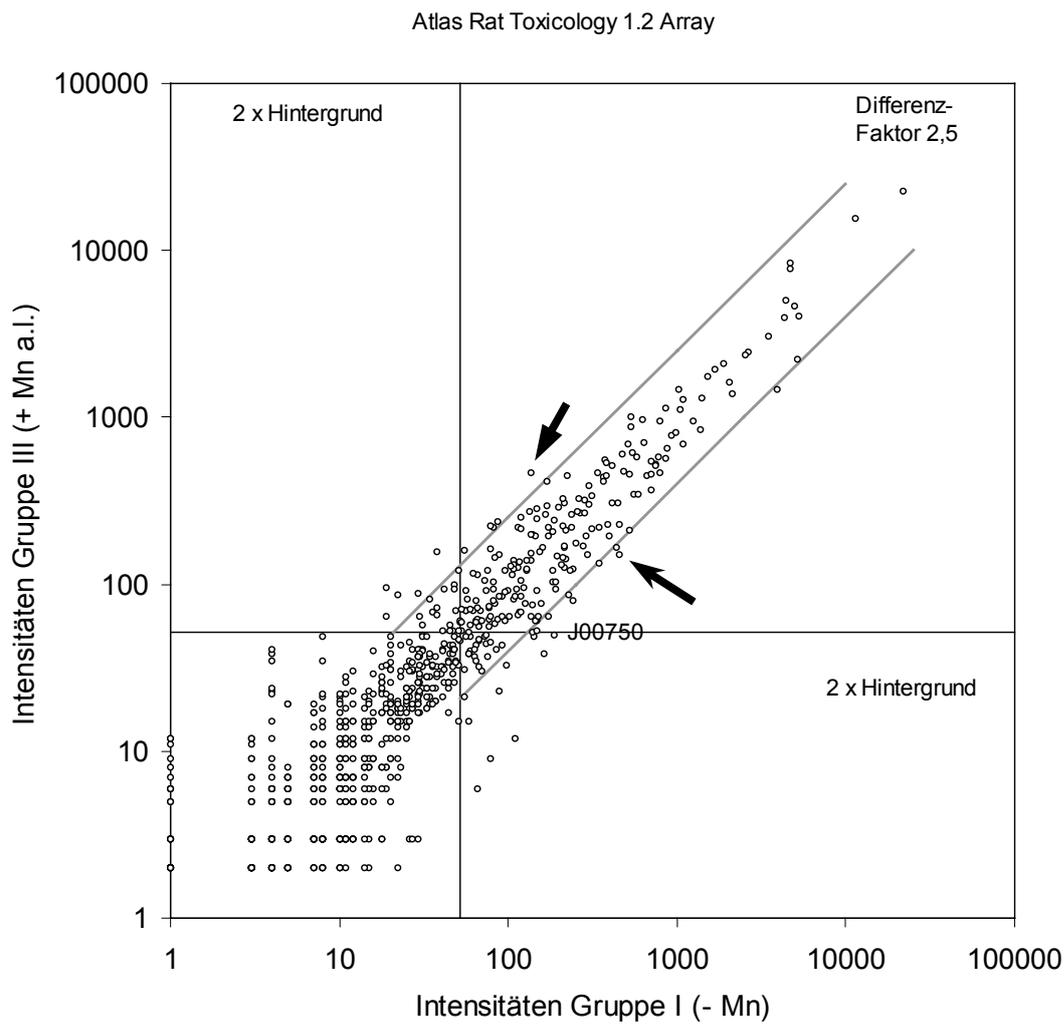


Gruppe I (- Mn)

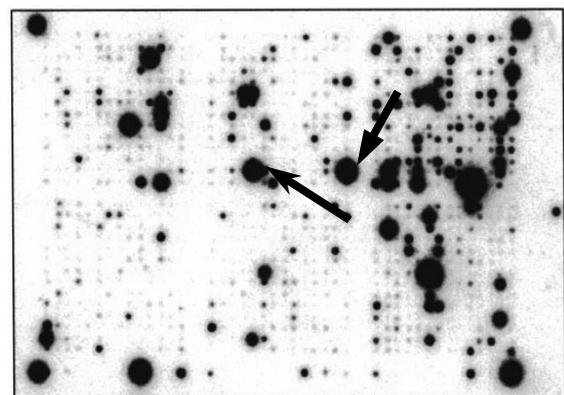


Gruppe III (+ Mn a.i.)

Abb. 11 b: Korrelationsanalyse der Intensitäten mit Beispielen von signifikant beeinflussten Genen (U05014 = sprague/dawley PHAS-I protein; X15741 = polymeric immunoglobulin receptor; X13549 = 40S ribosomal protein S10, vgl. Tabelle 13b) und Phosphorimages des Atlas Rat 1.2 Array II (erste Untersuchung) der RNA-Pools aus Gruppe I (- Mn) und Gruppe III (+ Mn a.i.)



Gruppe I (- Mn)



Gruppe III (+ Mn a.l.)

Abb. 11 c: Korrelationsanalyse der Intensitäten und Phosphorimages des Atlas Rat Toxicology 1.2 Array (erste Untersuchung) der RNA-Pools aus Gruppe I (- Mn) und Gruppe III (+ Mn a.l.). Die Pfeile zeigen zwei Beispiele nicht berechneter Intensitäten für Genspots durch die hohe Intensität eines jeweils benachbarten Genspots (J00750 = metallothionein 1, vgl. Tabelle 13c)

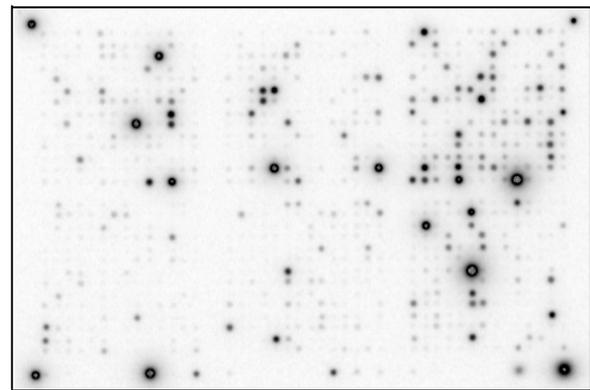
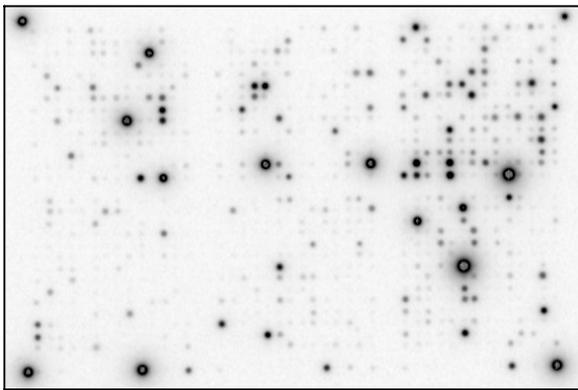
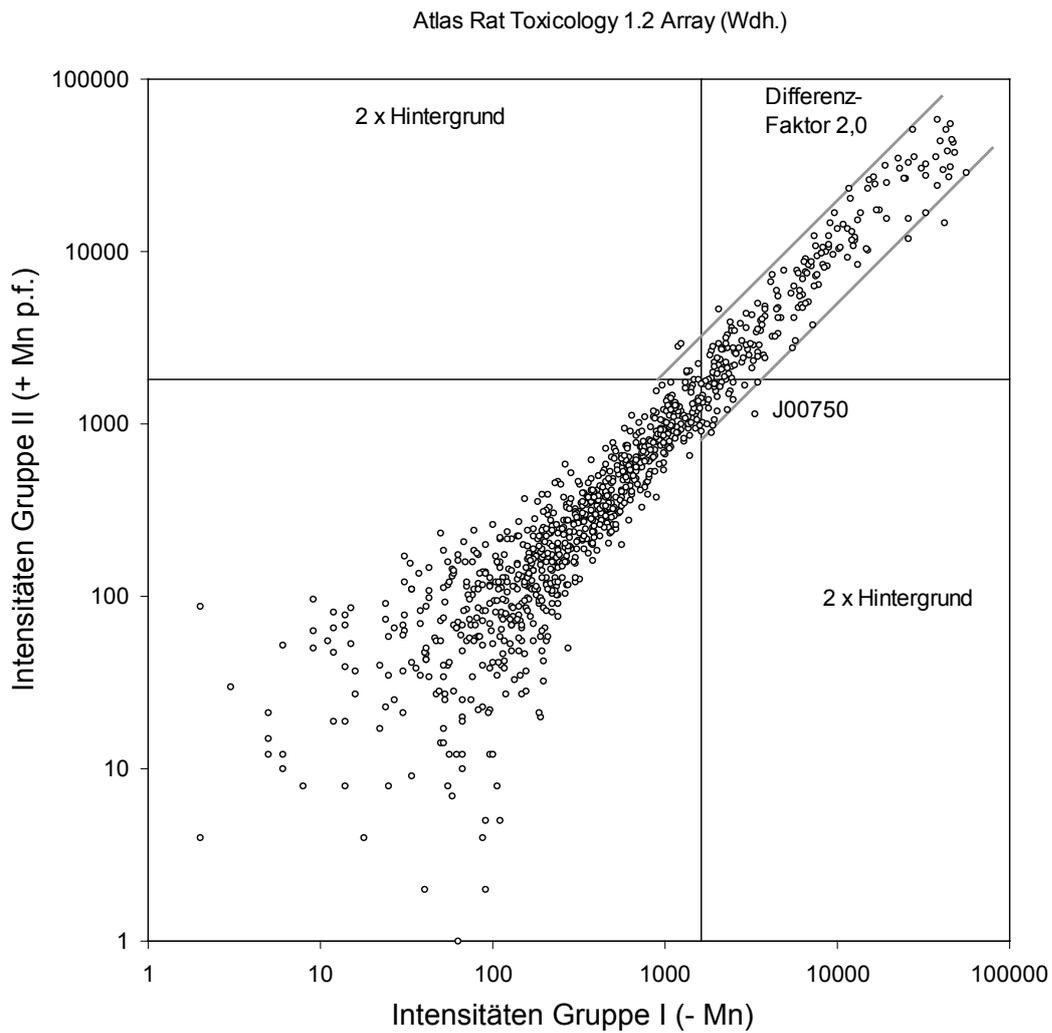


Abb. 12: Korrelationsanalyse der Intensitäten und Phosphorimages des Atlas Rat Toxicology 1.2 Array (Wiederholungsuntersuchung) der RNA-Pools aus Gruppe I (- Mn) und Gruppe II (+ Mn p.f.) (J00750 = metallothionein 1, vgl. Tabelle 14)

## 5.5 Einfluss des Mangans auf die Genexpression

Nahrungsinhaltsstoffe können die Genexpression direkt und/oder indirekt durch ihre Metabolite bzw. die durch diese induzierten Stoffwechselbedingungen beeinflussen. Daher bieten sich die Technologien der hochkapazitiven Genexpressionsanalyse neben pharmakologischen und toxikologischen auch für ernährungsphysiologische Fragestellungen an (DANIEL 2002), wobei sich hier der Begriff der Nutrigenomics etabliert hat (RIMBACH and DEPASCUAL-TERESA 2005). So wiesen beispielsweise LEE et al. (1999, 2000) im Skelettmuskel bzw. im Gehirn von Mäusen nach, dass durch energetische Restriktion die meisten Effekte der Alterung auf die Genexpression komplett oder teilweise inhibiert werden konnten. Die Genexpressionsmuster der energiereduzierten Tiere wiesen dabei auf Steigerungen bei Proteinumsatz, -synthese, Glukoneogenese, Pentosephosphatweg, Fettsäuresynthese und Nucleotid-Prekursoren, sowie auf verringerte makromolekulare Schäden hin.

Derart deutliche Effekte waren in der vorliegenden Untersuchung im Fall einer suboptimalen Versorgung mit dem Spurenelement Mangan nicht zu erwarten. Obwohl die Mangankonzentration in den Lebern der Mangelgruppe gegenüber den Kontrollgruppen um ca. 90 % reduziert war, hatte dies hinsichtlich der auf den Arrays vorhandenen manganabhängigen Enzyme keine Auswirkungen auf eine Genexpressionsänderung in den Leberhomogenaten um mehr als Faktor 2,0.

### MnSOD

Für das Gen der MnSOD konnte dieses Ergebnis der Microarray-Untersuchung auch durch die densitometrische Quantifizierung der RT-PCR und per Northern Blot verifiziert werden. Die RT-PCR zeigte für die MnSOD-mRNA bei unterschiedlichen Zyklenzahlen keine Expressionsunterschiede, wobei densitometrisch auswertbare Banden erst bei relativ hohen Zyklenzahlen auftraten. Beim Northern Blot konnte in keiner Versuchsgruppe eine MnSOD-mRNA-Bande nachgewiesen werden, was auf ein in beiden Gruppen nur sehr gering aktives oder komplett inaktives MnSOD-Gen zu Versuchsende schließen lässt. Da in der Mangelgruppe die Enzymaktivität der MnSOD erniedrigt war, hätte durch die verminderte mitochondriale Radikalentgiftung ein Einfluss auf die redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren und damit u. a. eine gesteigerte Expression der MnSOD erwartet werden können, d.h. ein indirekter Einfluss des Mangans über die MnSOD bzw. ROS auf die Genexpression wäre wahrscheinlich. BORELLO et al. (1992 a) fanden in den Lebern von Mäusen und

wachsenden Ratten im Manganmangel eine prätranskriptionale down-Regulation der MnSOD und konstatierten, dass entweder das Mangan selbst oder reaktive Sauerstoffspezies als Second Messenger auf die MnSOD-Transkription wirken. In einer weiteren Untersuchung (BORELLO et al. 1992 b) fanden sie enge Korrelationen zwischen der Enzymaktivität der MnSOD, dem MnSOD-mRNA-Level und der Mangankonzentration im Vergleich von Hepatomen (niedrig) mit gesundem Lebergewebe (hoch). In Thymus, Lunge und besonders im Herz wurden dagegen bei relativ niedrigen Mangankonzentrationen hohe MnSOD-Aktivitäten und hohe MnSOD-mRNA-Level gemessen, woraus eher auf einen Einfluss von ROS als auf einen direkten Einfluss des Mangans auf die MnSOD-Expression geschlossen wurde. LUO et al. (2004) konnten in einer Bioverfügbarkeitsstudie für unterschiedliche Manganverbindungen bei Broilern zeigen, dass die mRNA-Level für die MnSOD im Herz sowohl durch die Manganquelle als auch durch die Manganmenge signifikant beeinflusst wurden und postulierten, dass die MnSOD-mRNA im Herz eine höhere Sensitivität als Bioverfügbarkeitsparameter für Manganverbindungen aufweise als der Mangangehalt oder die MnSOD-Aktivität. CHEN et al. (2006) zeigten in LPS/IFN- $\gamma$  aktivierten Gliazellen, dass im oxidativen Stress die DNA-Bindungsaffinität der proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 durch Mangan noch weiter gesteigert werden konnte. Als Erklärung hierfür fanden sie eine manganstimulierte Degradation von I $\kappa$ B- $\alpha$ , an welches NF- $\kappa$ B in der unstimulierten Zelle gebunden ist und das somit frei und aktiv wird.

Da in der vorliegenden Untersuchung per Microarray und RT-PCR keine Änderungen in der MnSOD-Genexpression festgestellt werden konnten, aber bei der Enzymaktivität der MnSOD signifikante Differenzen gefunden wurden, könnte hieraus auf einen rein posttranskriptionalen Effekt des Mangans auf die Aktivität der MnSOD geschlossen werden. Die Annahme einer fehlenden Korrelation zwischen der Genexpression und der Enzymaktivität der MnSOD konnte hier allerdings nicht eindeutig bestätigt werden, da die Aussagekraft der Genexpressionsanalysen im Bereich des Ausmaßes der Aktivitätsänderung der MnSOD nicht ausreichend war, denn die Aktivitäten der MnSOD zwischen der Mangelgruppe und den Kontrollen unterschieden sich zwar signifikant, allerdings nur etwa um den Faktor 1,4. Signifikante Abweichungen in diesem Bereich waren mit der angewandten Microarraymethode zur Genexpressionsanalyse nicht nachweisbar, da hier ein Signifikanzfaktor von 2 angenommen wurde. Die Verifizierung mittels der

semiquantitativen RT-PCR bestätigte das Ergebnis der Microarrayuntersuchung, wobei sich die Quantifizierung einer unter Faktor 2 liegenden Genexpressionsänderung auch hier aufgrund der hohen Standardabweichungen bei der densitometrischen Auswertung der Gelscans als problematisch darstellte.

### Metallothionein

Bei Betrachtung beider Microarrayuntersuchungen im Vergleich konnte von den ca. 2000 untersuchten Genen als einziges in der Manganmangelgruppe beeinflusstes Gen das Metallothionein 1 (MT1) gefunden werden. Diese deutliche Zunahme der MT1-mRNA-Expression in der Mangelgruppe konnte auch durch die densitometrische Quantifizierung der RT-PCR bestätigt werden. Auch durch die Bestimmung des Gesamt-Metallothioneins per Cadmium-Bindungsassay konnte dieser Effekt belegt werden (Abb. 14, S. 79, rechte Seite).

Die Synthese des Zink regulierenden, Schwermetalle bindenden und protektiv gegen toxische Metalle und Prooxidantien wirkenden Metallothioneins kann durch eine Vielzahl von Agenzien induziert werden. Dies können u. a. Metalle (Cd, Zn, Cu, Hg, Au, Co, Ni, As, Pb, Bi, Fe, Cr, Mn), Hormone, Cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6), Wachstumsfaktoren, Medikamente, Lösungsmittel, aber auch oxidativer bzw. physikalischer Stress sein, wobei die Metalle Cadmium und Zink die effektivsten Induktoren darstellen. Interessant ist hierbei, dass auch Metalle, welche nicht an MT binden, wie z.B. Mangan, eine gesteigerte MT-Synthese hervorrufen können (SCHROEDER and COUSINS 1990, SATO et al. 1995, MOFFATT and DENIZEAU 1997, ANDREWS 2000), wobei die Leber bei der Induzierung durch Metalle das am stärksten reagierende Organ zu sein scheint (WAALKES and KLAASSEN 1985). Die Regulation der Expression der vier bekannten Metallothioneingene unterliegt mehreren Mechanismen. Die Transkription von MT1 und MT2 erhöht sich besonders schnell und deutlich durch Zink und Cadmium sowie durch prooxidative und inflammatorische Agenzien über verschiedene Signaltransduktionskaskaden. Hierbei interagieren metallresponsive Elemente (MRE) in den Promotoren der Metallothioneingene mit dem MRE-bindenden Transkriptionsfaktor-1 (MTF-1), welcher hauptsächlich auf Zink aber auch auf oxidativen Stress reagiert. Der für Metallionen und Oxidanzien sensitive Transkriptionsfaktor USF1 (upstream stimulatory factor 1) spielt bei der MT1-Transkription ebenfalls eine Rolle (ANDREWS 2000).

In der Literatur wurden bisher nur Effekte erhöhter Manganexposition auf MT beschrieben, der direkte Einfluss eines Manganmangels hingegen nicht. BRACKEN and KLAASSEN (1987) konnten eine Mangan induzierte MT-Zunahme *in vivo* bei kultivierten Ratten-Hepatocyten *in vitro* nicht bestätigen und schlossen daraus auf einen indirekten Einfluss des Mangans auf Metallothionein. In Untersuchungen zu neurotoxischen Effekten einer Manganexposition (ERIKSON and ASCHNER 2002, ERIKSON et al. 2002, WEBER et al. 2002) wurden MT-mRNA-Abnahmen in kultivierten Ratten-Astrocyten unter Manganexposition gefunden, möglicherweise als Folge eines veränderten Metallmetabolismus. In diesen Untersuchungen zeigte sich auch ein Zusammenhang hoher Manganexposition mit zunehmendem oxidativen Stress, welcher eher eine Erhöhung der MT-mRNA erwarten ließe. BURGER et al. (2000) wiesen in den Lebern von Waschbären nur tendenzielle, nicht signifikante Korrelationen zwischen der Höhe der Manganbelastung und der MT-Konzentration nach. KOBAYASHI et al. (2007) fanden bei Mäusen eine dosisabhängige Zunahme des Leber-MT durch Manganchlorid in Folge einer durch Mangan erhöhten IL-6-Produktion. Bei IL-6-null-Mäusen wurde Leber-MT nicht durch Mangan induziert, woraus geschlossen wurde, dass die manganabhängige MT-Induzierung ausschließlich auf indirektem Weg über die IL-6-Stimulierung erfolgt. KONDOH et al. (2001) postulierten, dass Metallothionein eine bedeutende Rolle beim Schutz vor mitochondrialem oxidativen Stress spielt und auf manche Oxidanzien sogar stärker reagiert als die MnSOD, wobei die Induzierung sowohl der MT- als auch der MnSOD-Transkription über IL-6 und TNF- $\alpha$  vermittelt werden kann (SATO et al. 1995).

Im Bezug auf die vorliegende Untersuchung könnte hieraus anhand der Ergebnisse für den totalen antioxidativen Status (keine Gruppenunterschiede), die Thiobarbitursäure reaktiven Substanzen (keine Gruppenunterschiede), die MnSOD-Aktivität (im Mn-Mangel erniedrigt) und die MT-Konzentration (im Mn-Mangel erhöht) geschlossen werden, dass eine durch die niedrigere MnSOD-Aktivität erhöhte oxidative Belastung im Mitochondrium durch erhöhte MT-Level kompensiert wurde.

#### Weitere beeinflusste Gene

Die bei dieser Untersuchung festgestellten beeinflussten Gene von ribosomalen Proteinen, Transkriptions- und Translationsfaktoren (eukaryotic translation initiation factor 2 alpha subunit / translation factors, 40S ribosomal protein S3A, 40S ribosomal protein S17, 40S ribosomal protein S12/ ribosomal proteins, 40S ribosomal protein S10 / ribosomal proteins, ribosomal protein S9 / ribosomal proteins, alpha initiation

factor / transcription proteine, sprague/dawley PHAS-I protein / other proteins involved in translation, liver cytochrome c oxidase polypeptide Vlc2 / other post-translational modification proteins) konnten nur teilweise durch Parallelen auf den Arrays der ersten Untersuchung bestätigt werden, im Vergleich der ersten Genexpressionsanalyse mit der Wiederholungsuntersuchung, bei welcher RNA-Pools anderer Tiere aus den selben Versuchsgruppen eingesetzt wurden, gab es bei diesen Genen keine Übereinstimmungen. Das Vorhandensein einiger Übereinstimmungen bei parallel vorkommenden Genen in der ersten Untersuchung und die mit Ausnahme von MT1 fehlende Reproduzierbarkeit im Vergleich mit der Wiederholungsuntersuchung ließ bezüglich der gefundenen Genexpressionsunterschiede darauf schließen, dass hier andere Einflussfaktoren auf die Genexpression den Einfluss einer suboptimalen alimentären Manganversorgung überlagert haben, dass also individuelle, auch gruppeninterne Effekte größer waren als die durch das Versuchsdesign hervorgerufenen Effekte. Diese Einflussfaktoren könnten trotz der standardisierten Versuchsbedingungen experimenteller Art sein, also z.B. erhöhter Stress oder eine kurz vor Versuchsende verminderte oder erhöhte Futteraufnahme eines einzelnen Tieres. Ein weiterer möglicher Effekt könnte sich in der Inhomogenität, also dem Vorhandensein unterschiedlicher Zelltypen, des zur Untersuchung herangezogenen Lebergewebes darstellen. Auch KNIGHT (2001) postulierte, dass ein bedeutendes Problem der Ergebnisinterpretation von Microarraydaten darin liegt, ob die gefundenen Genexpressionsdifferenzen wirklich dem Einfluss unterliegen, der durch die entsprechenden Variablen im Versuchsdesign hervorgerufen werden sollte.

## **5.6 Einfluss des Mangans auf Enzymaktivitäten und Parameter des oxidativen Stresses**

### MnSOD

Beide photometrischen Methoden zur Quantifizierung der MnSOD-Aktivität in den Leberhomogenaten zeigten signifikant niedrigere Werte in der Manganmangelgruppe im Vergleich mit den Kontrollgruppen (Abb. 13, S. 77, linke Seite). ZIDENBERG-CHERR et al. (1983) fanden bei wachsenden Ratten von Geburt bis Tag 60 eine dreifache Zunahme der MnSOD-Aktivität im Manganmangel, bei den adäquat versorgten Kontrolltieren wurde dagegen eine Aktivitätszunahme um das sechsfache festgestellt. KAUER (2006) stellte beim Ferkel in Herz, Muskel und Niere eine

signifikante Abhängigkeit der MnSOD-Aktivität von der Manganversorgung fest, in Leber und Lunge dagegen blieb die MnSOD-Aktivität unbeeinflusst. Die Beziehung der MnSOD-Aktivität zur Genexpression der MnSOD wurde in Kapitel 5.5 diskutiert.

### Arginase

Die angewandte Methode zur Aktivitätsbestimmung der Arginase nach ÖZER (1984) beruht auf einer Aktivierung des Enzyms mit Manganchlorid. So wird nicht erfasst, ob im Manganmangel eine geringere native Aktivität der Arginase vorliegt, sondern es wird das vorhandene Enzymprotein quantifiziert. Daher eignet sich diese Methode auch, um etwaige Rückschlüsse auf Transkription und Translation der Arginase zu ziehen.

Bezüglich der Arginaseaktivität ergaben sich keine signifikanten Gruppenunterschiede zwischen Manganmangel und Kontrolle (Abb. 13 rechte Seite), nur in den zur ersten Genexpressionsanalyse eingesetzten Proben deutete sich eine tendenziell niedrigere Aktivität in der Mangelgruppe an. Dies bestätigte auch die Ergebnisse der Microarrayuntersuchung, bei der ebenfalls keine signifikanten Expressionsunterschiede für die Leberarginase gefunden wurden, und machte eine weitere Verifizierung mittels RT-PCR entbehrlich. PRZYBILLA and PALLAUF (1991) wiesen dagegen bei wachsenden Ratten eine signifikant erniedrigte Arginaseaktivität im Manganmangel nach, wobei ebenfalls eine Methode mit Aktivierung der Arginase durch Mangan angewandt wurde. Auch KIRCHGESSNER und HEISEKE (1978) fanden nach einer 6wöchigen Versuchsphase bei wachsenden Ratten deutliche Korrelationen zwischen Manganversorgung und Arginaseaktivität und schlossen daraus, dass die Arginaseaktivität ein möglicher Parameter sei, um zwischen suboptimaler und optimaler Manganversorgung zu differenzieren. KAUER (2006) untersuchte beim Ferkel sowohl die native Aktivität der Arginase als auch die Aktivität nach Aktivierung mit Mangan und fand nur bei der nativen Aktivität eine signifikante Abnahme im Manganmangel.

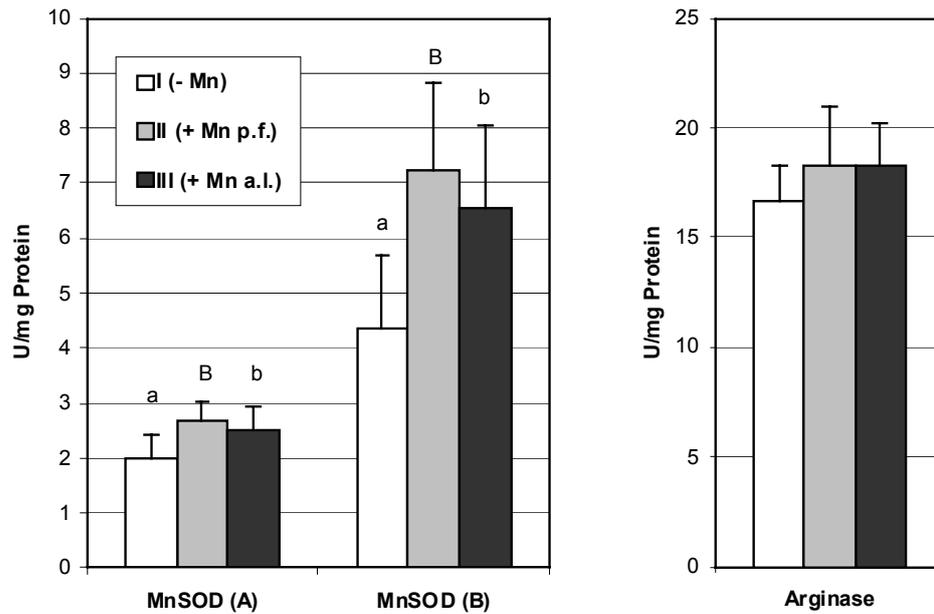


Abb. 13: Aktivität der MnSOD (A = Methode nach MARKLUND and MARKLUND 1974; B = Methode nach CRAPO et al. 1978) und der Arginase in den Leberhomogenaten der Ratten nach 6 Versuchswochen bezogen auf den Proteingehalt (unterschiedliche Buchstaben markieren signifikante Gruppenunterschiede: Großbuchstaben  $p < 0,01$ , Kleinbuchstaben  $p < 0,05$ )

### TAOS

Im Leberhomogenat befinden sich neben den antioxidativ wirksamen Enzymen auch antioxidative Substanzen nicht-enzymatischer Natur, welche bei der hier angewandten indirekten SOD-Analytik mit Radikaldetektor teilweise miterfasst werden. Um den Umfang eines Effekts dieser Substanzen einschätzen zu können, wurde der totale antioxidative Status nach MILLER et al. (1993) in den Leberhomogenaten untersucht. Hierbei konnten keine Unterschiede zwischen den Proben der Mangel- und Kontrollgruppen aufgezeigt werden (Abb. 14 linke Seite), was auf eine Equilibrierung der mitochondrialen SOD-Aktivitätsunterschiede durch andere antioxidativ wirksame Enzyme oder Substanzen über Zellkompartimentsgrenzen hinweg hinweist. Allerdings scheint es problematisch, anhand dieser Methode einen Bezug zur MnSOD-Aktivität bzw. zur Superoxidradikalentgiftung herzustellen, da hier die kompetitive Hemmung der ABTS-Radikalbildung aus Ferrylmyoglobin gemessen wird und der Einfluss der MnSOD darauf ungewiss ist.

Die Darstellung der Ergebnisse in prozentualer kompetitiver Hemmung der Radikalbildung im Vergleich zum Blindwert erscheint bei der Messung in verdünnten Leberhomogenaten sinnvoller, da sich bei Berücksichtigung der 200fachen Verdünnung der Homogenate die aus der Eichkurve resultierenden Trolox-Äquivalente entsprechend multiplizieren, was im Vergleich zu Messungen im Plasma, welches laut Originalvorschrift unverdünnt eingesetzt wird (MILLER et al. 1993, FECHNER et al. 2001), oder anderen Flüssigkeiten mit antioxidativer Kapazität sehr hohe Werte in mM TEAC ergibt. Die Übertragbarkeit von TAOS auf die *in vivo* Situation wird allerdings kontrovers diskutiert, da ABTS als einziger Scavenger in diesem System nicht die ganze Bandbreite der reaktiven Sauerstoffspezies erfasst (STRUBE et al. 1997).

### TBA-RS

Da in Folge einer erniedrigten MnSOD-Aktivität oxidative Beeinträchtigungen der Mitochondrienmembran auftreten können, wurde dieser Parameter zur Erfassung der oxidativen Lipidschädigung analysiert. Wie bei der Messung des totalen antioxidativen Status ergab auch die Messung des Grades der Lipidperoxidation anhand der Thiobarbitursäure reaktiven Substanzen in den Rattenlebern keine signifikanten Gruppenunterschiede (Abb. 14 Mitte). In einer Untersuchung mit mangandepletierten, wachsenden Ratten wiesen ZIDENBERG-CHERR et al. (1983) dagegen im Manganmangel zunehmende Schädigungen durch Lipidperoxidation nach, allerdings über einen Versuchszeitraum von Geburt bis Tag 60.

### Metallothionein

Die Metallothioneinkonzentrationen in den Lebern waren bei den suboptimal mit Mangan versorgten Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich erhöht (Abb. 14 rechte Seite), was anhand der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse für MT1 auf einen direkten oder indirekten prätranskriptionalen Effekt des Mangans auf Metallothionein hinweist. Diese Thematik wurde in Kapitel 5.5 diskutiert.

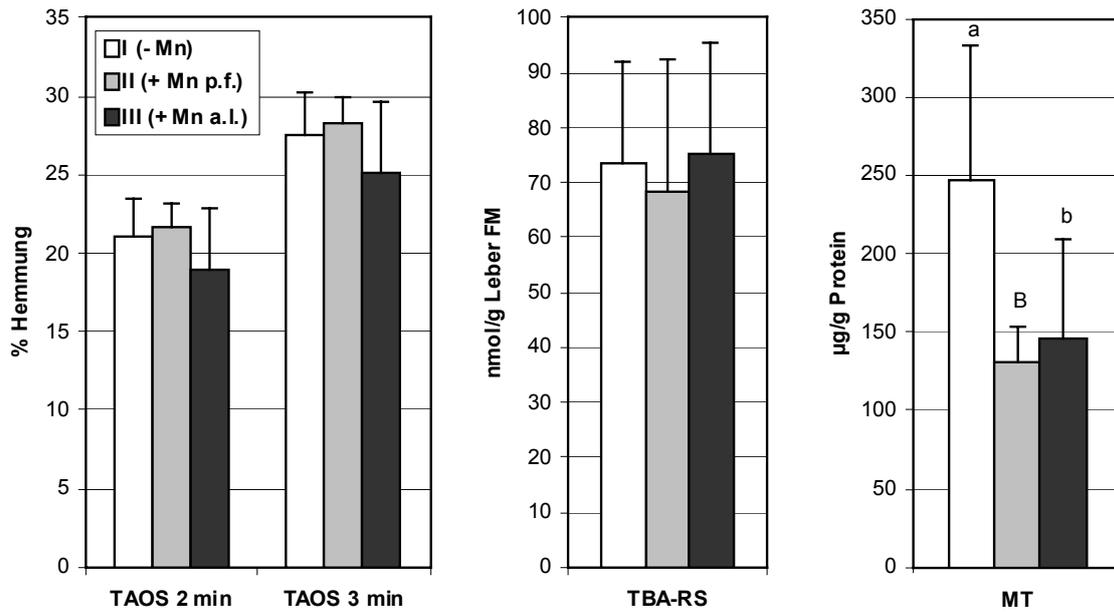


Abb. 14: Der totale antioxidative Status (TAOS) nach 2 bzw. 3 Minuten Reaktionszeit, die Thiobarbitursäure reaktiven Substanzen (TBA-RS) als Maß der Lipidperoxidation und die Metallothioneinkonzentration (MT) bezogen auf den Proteingehalt in den Leberhomogenaten der Ratten nach 6 Versuchswochen (unterschiedliche Buchstaben markieren signifikante Gruppenunterschiede: Großbuchstaben  $p < 0,01$ , Kleinbuchstaben  $p < 0,05$ )

## 6 Schlussfolgerungen

Der Einsatz der differentiellen Genexpressionsanalyse per cDNA-Microarray zur Diagnose von Mangelerkrankungen, bzw. einer suboptimalen Versorgungslage, also das Schließen von bestimmten Genexpressionsmustern auf eine Mangelsituation, erscheint anhand vieler weiterer möglicher Einflussfaktoren auf die Genexpression als problematisch und sehr aufwändig. Beim Vergleich unterschiedlicher Proben der gleichen Versuchsgruppen wurde außer für MT1 keine Reproduzierbarkeit für beeinflusste Gene gefunden. Daher scheint der Einfluss des angewandten Versuchsdesigns auf die Expression vieler Gene durch andere Faktoren auch innerhalb der Versuchsgruppen überlagert worden zu sein.

Da Genexpressionänderungen auch unterhalb von Faktor 2,0 bereits physiologische Veränderungen hervorrufen können, aber unter den vorliegenden Versuchsbedingungen anhand der Microarrayanalyse keine gesicherten Aussagen in diesem Differenzbereich möglich erscheinen, kann die differentielle Genexpressionsanalyse per Microarray, so wie sie in dieser Spurenelementmangeluntersuchung angewendet wurde aufgrund der zu geringen Sensitivität nur als eine Screeningmethode betrachtet werden.

Um mit der durchgeführten Microarray-Methode als stand-alone-System statistisch abgesicherte Aussagen bei höherer Sensitivität machen zu können, wären mehrere Wiederholungen des gleichen Arrays für jede einzelne zu untersuchende Probe nötig. Das durch den Hersteller eingeräumte unterschiedliche Hybridisierungsverhalten der drei verwendeten Arrays und die somit geringe Vergleichbarkeit vorhandener Parallelen auf unterschiedlichen Arrays machte eine nachfolgende Verifizierung der Ergebnisse durch andere Methoden unentbehrlich.

Da aus einer festgestellten Genexpressionsdifferenz durch die Vielzahl an posttranskriptionalen Einflussfaktoren auf Strukturbildung und Aktivierung, nicht auch zwangsläufig eine Aktivitäts- oder Konzentrationsänderung im Zielprotein resultieren muss, war neben der Verifizierung der Genexpressionsdaten auch die Analyse der Zielproteine bzw. der Enzymaktivitäten geboten.

So konnten die Ergebnisse der Microarrayuntersuchung bezüglich der nicht, bzw. evtl. unterhalb der Nachweisgrenze beeinflussten MnSOD-Genexpression per RT-PCR bestätigt werden. Die Analyse der Enzymaktivität der MnSOD ergab dagegen

niedrigere Aktivitäten in der Manganmangelgruppe, was auf eine wahrscheinlich rein posttranskriptionale Aktivierung der MnSOD durch Mangan schließen lässt oder ein Hinweis darauf ist, dass die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen nicht sensitiv genug waren.

Für das Metallothionein zeigte sich eine erhöhte Konzentration bei mangelnder Manganversorgung. Da bei den Mangeltieren gegenüber den Kontrolltieren zudem anhand der Microarrayanalyse und der RT-PCR-Verifizierung eine gesteigerte MT1-Genexpression festgestellt wurde, lässt dies auf einen direkten (Manganmangel) oder indirekten (ROS) Einfluss auf Transkriptionsebene schließen.

Bei der Arginase zeigten sich weder beim Enzymprotein noch bei der Genexpression Unterschiede zwischen Mangel- und Kontrolltieren. In der Annahme einer gehemmten nativen Arginaseaktivität im Manganmangel deutet dies auf einen rein posttranskriptionalen Effekt hin.

In der Manganmangelgruppe war gegenüber den Kontrollgruppen die MnSOD-Aktivität niedriger und die MT-Expression und -Konzentration erhöht. Zugleich konnten keine Auswirkungen auf den totalen antioxidativen Status und die Thiobarbitursäure reaktiven Substanzen festgestellt werden. Dies lässt darauf schließen, dass bis zu dem hier erreichten Stadium eines Manganmangels die niedrigere MnSOD-Aktivität bezüglich der Radikalentgiftung durch erhöhte MT-Level kompensiert wurde, wobei dies durch Regulation auf transkriptionaler Ebene erfolgte.

## 7 Zusammenfassung

Mangan ist wesentlicher Bestandteil vieler Enzyme und erfüllt so wichtige Funktionen im Kohlenhydrat- und Proteinstoffwechsel, bei antioxidativen Abwehrreaktionen und bei der Knorpelsynthese. Unter der Hypothese, dass der Versorgungsstatus mit Mikronährstoffen Einfluss auf die Genexpression nehmen kann, wurde anhand der differentiellen Genexpressionsanalyse mittels cDNA-Microarrays untersucht, ob ein Einfluss einer suboptimalen Manganversorgung auf die Genexpression feststellbar ist, bzw. ob im Umkehrschluss anhand eines Genexpressionsmusters auf eine Manganunterversorgung geschlossen werden kann. Zudem wurde durch die Untersuchung verschiedener physiologischer Parameter versucht, Rückschlüsse darauf zu ziehen, auf welcher Ebene der Proteinbiosynthese ein Einfluss einer Manganunterversorgung stattfinden könnte.

Zu diesem Zweck wurden in einem Stoffwechselversuch 3 x 9 männliche, wachsende Albinoratten (Wistar) mit einer initialen Lebendmasse von durchschnittlich 38 g über sechs Wochen mit halbsynthetischen Diäten auf Basis von Maisstärke, Casein, Saccharose, Sojaöl und Zellulose nach den Vorgaben des NRC (1995) bzw. des AIN-93 (REEVES et al. 1993) gefüttert. Der ermittelte Diätmangangehalt lag in der Mangelgruppe I (- Mn) bei  $0,35 \pm 0,01$  mg/kg und in den Kontrollgruppen II (+ Mn *pair fed* zu Gruppe I) und III (+ Mn *ad libitum*) bei  $18,84 \pm 0,74$  mg/kg.

Die Auswirkungen dieser suboptimalen alimentären Manganversorgung wurden auf zotechnische Parameter, Blutparameter, Gewebsmangankonzentrationen und die manganabhängigen Enzyme MnSOD und Arginase untersucht. Da die Genexpression z.B. der MnSOD auch durch redoxsensitive Transkriptionsfaktoren beeinflusst wird, wurden zudem der totale antioxidative Status, die Thiobarbitursäure reaktiven Substanzen und das Metallothionein in den Lebern analysiert. Der Manganstatus der Tiere zu Versuchsbeginn wurde anhand einer zusätzlichen  $t_0$ -Gruppe überprüft.

Für die differentielle Genexpressionsanalyse wurden drei verschiedene cDNA-Microarrays der Firma Clontech Laboratories Inc. eingesetzt (Atlas Rat 1.2 Array, Atlas Rat 1.2 Array II, Atlas Rat Toxicology 1.2 Array), welche jeweils 1176 Gene enthielten. Etwa 800 Gene kamen parallel auf je zwei dieser Arrays vor, womit eine teilweise Ergebnissicherung möglich wurde. Somit wurden insgesamt etwa 10 % des gesamten Rattengenoms untersucht. Zur Analyse wurde je ein RNA-Probenpool aus

dem *lobus median* von je drei Mangel- bzw. Kontrolltieren mit übereinstimmender Futteraufnahme und Lebendmasse eingesetzt. Aufgrund von Qualitätsmängeln wurde die Analyse für den Atlas Rat Toxicology 1.2 Array wiederholt, wobei mangels Probenmaterial RNA-Pools anderer Tiere der Mangel- und Kontrollgruppen eingesetzt wurden. Anschließend wurden einzelne Ergebnisse der Microarrayanalyse per Northern Blot und RT-PCR verifiziert.

Während und nach Ablauf des 6wöchigen Versuchszeitraumes waren bei den Versuchstieren keine sichtbaren Mangelsymptome zu beobachten. Bezüglich der Lebendmasseentwicklung waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu erkennen, die Futteraufnahme war nur gering beeinflusst. Somit konnte ein möglicher Einfluss dieser Faktoren auf die Genexpression minimiert werden.

Sowohl Hämatokritwert als auch Blutglucosekonzentration wiesen keine signifikanten Differenzen zwischen den Versuchsgruppen auf. Der Hämoglobingehalt war in der Manganmangelgruppe gegenüber den adäquat mit Mangan versorgten Tieren signifikant niedriger, lag mit  $13,8 \pm 0,7$  g/dl aber noch nicht im anämischen Bereich.

Die Mangankonzentrationen im Lebergewebe, im Femur und im Blutplasma waren in Gruppe I (- Mn) gegenüber den Kontrollgruppen höchstsignifikant erniedrigt. Der stärkste Effekt zeigte sich in den Lebern mit einer in der Mangelgruppe etwa 90 %igen Mn-Depletion gegenüber den Kontrolltieren. Ein Einfluss auf die anderen analysierten Mineralstoffe (Fe, Zn, Cu, Ca, Mg) war nicht zu erkennen. In den Lebern der  $t_0$ -Gruppe wurden mit etwa 1,9 mg/kg Leber-FM vergleichbare Mangankonzentrationen gefunden wie bei den Kontrolltieren zu Versuchsende.

Die Bestimmung der Aktivität der MnSOD in der Leber ergab anhand zweier unterschiedlicher Methoden um Faktor 1,3 bis 1,5 signifikant niedrigere Werte in der Mangelgruppe im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

Bei der angewandten Methode zur Bestimmung der Arginase wurde nicht die native, sondern die maximale Aktivität nach Manganaktivierung bestimmt, wodurch Rückschlüsse auf das vorhandene Enzymprotein möglich wurden. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Gruppenunterschiede.

Sowohl bei der Messung des totalen antioxidativen Status als auch bei der Bestimmung der Thiobarbitursäure reaktiven Substanzen zeigten sich keine

Gruppendifferenzen, wobei die TBA-RS-Werte nicht auf Lipidschädigungen hinwiesen.

Bei der Bestimmung des Gesamt-Metallothioneins konnte eine signifikant höhere MT-Konzentration in den Lebern der Manganmangelgruppe gegenüber den Kontrollgruppen festgestellt werden.

In der Microarrayuntersuchung wurde für die drei Arraypaare ein minimaler Faktor für Expressionsunterschiede von 2,5 angenommen. Insgesamt wurden bei 28 Genen unterschiedlicher Klassifizierungen Expressionsunterschiede zwischen den RNA-Pools festgestellt. In der Manganmangelgruppe war die Expression von 11 Genen vermindert und von 17 Genen erhöht. Bei den auf den Arrays vorhandenen Genen manganabhängiger Enzyme (Arginase I und II, MnSOD, PEPCK, Pyruvatcarboxylase, Glutaminsynthetase, Leber-Catalase, Glycosyltransferasen) konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden, wobei z.B. das Gen der MnSOD in beiden Gruppen als inaktiv detektiert wurde. Etwa 90 % aller vorhandenen Gene wurden als inaktiv detektiert.

Bei dieser Untersuchung zeigten sich Qualitätsmängel (nicht auswertbare Genspots, nur geringe Übereinstimmungen bei vorhandenen Parallelen beeinflusster Gene und ein stark positives Signal auf einer Negativkontrolle), weshalb mit dem Atlas Rat Toxicology 1.2 Array eine Wiederholungsuntersuchung durchgeführt wurde.

Mit dieser Wiederholungsuntersuchung konnte ein mit 2,0 etwas niedrigerer minimaler Faktor für Expressionsunterschiede angenommen werden. Hierbei wurden 7 beeinflusste Gene gefunden (3 Gene mit verminderter und 4 Gene mit erhöhter Expression bei den Proben der Mangeltiere). In einer Neuauswertung des entsprechenden Arraypaares der ersten Untersuchung wurden 15 beeinflusste Gene (7 Gene mit verminderter und 8 Gene mit erhöhter Expression bei den Mangelproben) gefunden. Auch die Wiederholungsuntersuchung zeigte im Falle der auf dem Chip vorhandenen Gene manganabhängiger Enzyme keine Expressionsunterschiede zwischen den Versuchsgruppen, wobei hier das Gen der MnSOD in beiden Gruppen als gering aktiv detektiert wurde.

In beiden Untersuchungen konnte bei den Proben der Mangeltiere eine deutlich erhöhte Expression des Metallothionein 1-Gens festgestellt werden. Alle anderen

Gene, bei welchen eine Beeinflussung gefunden wurde, konnten im Vergleich beider Untersuchungen nicht bestätigt werden.

Bei der Verifizierung der MnSOD-mRNA mittels Northern Blot und RT-PCR konnten ebenfalls keine Expressionsunterschiede zwischen den Manganmangeltieren und den adäquat versorgten Tieren nachgewiesen werden. Die fehlenden Banden beim Northern Blot und die relativ hohe nötige Zyklenzahl, um bei der RT-PCR quantifizierbare Banden zu erhalten, wiesen hierbei auf die geringe Aktivität des MnSOD-Gens hin. Bei der RT-PCR-Verifizierung der MT1-mRNA zeigten sich schon bei niedrigeren Zyklenzahlen quantifizierbare Banden, wobei hier eine signifikant höhere optische Dichte bei den Banden der Mangeltiere gegenüber den Kontrolltieren festgestellt werden konnte. Somit wurden die entsprechenden Ergebnisse der Microarrayuntersuchung durch diese Verifizierungen bestätigt.

Anhand dieser Ergebnisse wurden folgende Schlussfolgerungen gezogen:

- Der Einfluss der suboptimalen alimentären Manganversorgung auf die Genexpression wurde wahrscheinlich auch durch andere, teilweise gruppeninterne Faktoren überlagert
- Die cDNA-Microarrayanalyse kann so, wie sie hier angewendet wurde, aufgrund der zu geringen Sensitivität nur als eine Screeningmethode betrachtet werden. Für statistisch abgesicherte Aussagen bei höherer Sensitivität wären mehr Wiederholungen je Probe und Array nötig
- Eine Verifizierung der Genexpressionsdaten und der Effekte auf die Zielproteine mittels anderer Methoden war geboten
- Sowohl die MnSOD als auch die Arginase scheinen einem rein posttranskriptionalen Einfluss des Mangans zu unterliegen
- Die Genexpression und damit auch die Konzentration des Metallothionein war in der Mangelgruppe wahrscheinlich infolge eines vermehrten Auftretens von ROS erhöht
- Bis zu dem hier erreichten Stadium eines Manganmangels konnte die geringere MnSOD-Aktivität in der Mangelgruppe bezüglich der ROS-Entgiftung vermutlich durch erhöhte MT-Level kompensiert werden

## 8 Summary

### **Biochemical and molecular genetic effects of suboptimal dietary manganese in growing rats**

Manganese is an essential structural component or activator of many enzymes. Mn performs important functions in carbohydrate and protein metabolism, antioxidative defence, and synthesis of the cartilage. Assuming an influence of micro nutrient status on gene expression, the effects of suboptimal alimentary manganese on gene expression should be examined using cDNA-microarray analysis. The site of influence on protein biosynthesis should be established by comparing gene expression with some physiological parameters.

For this purpose a metabolism experiment was performed with 3 x 9 weaned male albino rats (Wistar) with 38 g initial average live weight. The animals were fed purified diets based on corn starch, casein, sucrose, soy bean oil and cellulose according to the NRC (1995) and AIN-93 (REEVES et al. 1993) over a six-week period. The dietary treatments differed in the manganese concentration. In the manganese deficiency group I (- Mn) the analyzed manganese content in the diet was  $0.35 \pm 0.01$  mg/kg. The diets of the control groups II (+ Mn *pair fed* to group I) and III (+ Mn *ad libitum*) contained  $18.84 \pm 0.74$  mg/kg manganese, supplemented as  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ .

Feed intake, live weight gain, blood parameters, manganese concentration in tissue, and the manganese dependent enzymes MnSOD and arginase were determined. The gene expression of MnSOD depends amongst others on redox sensitive transcriptional factors, thus the total antioxidative status, the thiobarbituric acid reactive substances, and metallothionein in the liver were examined. By means of an additional  $t_0$ -group, the Mn status of the animals at the beginning of the experiment was determined.

Differential gene expression was analysed in the liver with pooled mRNA from three control and three deficiency animals similar in feed intake and live weight gain using three different cDNA-microarrays from Clontech Laboratories Inc. (Atlas Rat 1.2 Array, Atlas Rat 1.2 Array II, and Atlas Rat Toxicology 1.2 Array) containing 1176 genes on every array. Approximately 800 genes are found to be parallel on even two arrays, thus enabling a partial comparison of results. Thereby a total of about 10 % of the rat genome was examined. Due to the unsatisfactory quality a rerun of the assay

was carried out with Atlas Rat Toxicology 1.2 Array, in which samples from other deficiency and control animals were used due to a shortage of material. Subsequently some results of the microarray experiment were verified by Northern blot and RT-PCR.

During the whole metabolism experiment the rats did not show any visible symptoms of Mn deficiency. Live weight gain did not show significant differences between the groups, feed intake was just slightly affected. Therefore an effect of these parameters on gene expression could be minimized. Neither hematocrit nor blood glucose concentration showed significant differences between the experimental groups. Hemoglobin was significantly lower in group I (- Mn), however the values ( $13.8 \pm 0.7$  g/dl) did not reach in anemic range. The Mn concentrations in liver, femur and blood plasma were significantly lower ( $p < 0.001$ ) in the Mn deficiency group I than in control groups II and III. The strongest effect occurred in the liver with a 90 % Mn depletion. The other minerals analyzed (Fe, Zn, Cu, Ca, Mg) did not show any effects of manganese supply. The livers of the  $t_0$ -group contained manganese concentrations (approx. 1.9 mg/kg FM) comparable to the control groups at the end of the experiment. Both methods to determine MnSOD activity in liver homogenates showed significantly lower activities in the manganese deficiency group compared to the control groups (about factor 1.3 to 1.5). By determining arginase activity in liver homogenates via Mn activation, not the native but the maximum activity was measured. Thus conclusions on the arginase protein present enabled. This analysis showed no significant differences between the groups. Neither the TAOS nor the TBA-RS showed any differences between the groups, whereby the values of TBA-RS did not indicate any lipid damage. Total metallothionein concentration in the rat liver was significantly increased in manganese deficiency compared to the controls.

With microarray investigation a minimum factor for differences of 2.5 was defined for the three array pairs. A total of 28 genes of various classifications showed differences in their mRNA levels. The expression of 11 genes was diminished and the expression of 17 genes was increased in the Mn deficiency group. The analysis did not show any effects on the genes of manganese dependent enzymes investigated (arginase I and II, MnSOD, PEPCCK, pyruvate carboxylase, glutamine synthetase, liver catalase, and glycosyl transferases). For example the MnSOD-gene was detected as inactive in both groups.

In this investigation a lack of quality was found (non evaluable gene spots, different behavior of parallel occurring affected genes, a strong signal on negative control), therefore a rerun of the investigation with the Atlas Rat Toxicology 1.2 Array was carried out.

With the rerun a minimum factor for differences of 2.0 was defined. The expression of 7 genes was affected in Mn deficiency. Of these genes 3 were diminished and 4 genes were increased in group I (- Mn). The re-evaluation of the Atlas Rat Toxicology 1.2 Array from the first analysis resulted in 15 affected genes. The expression of 7 genes was diminished and the expression of 8 genes was increased in the Mn deficiency group. The rerun also did not show any effects on the investigated genes of manganese dependent enzymes. However in this analysis the MnSOD gene showed low activity in both groups. In both investigations considerably increased expressions of metallothionein 1 gene in group I (- Mn) were determined. All further affected genes could not be confirmed by comparison of the investigations.

Using Northern blot and RT-PCR for verification, no influence on MnSOD-mRNA could be determined. In order to obtain quantifiable MnSOD-mRNA bands a comparatively high number of PCR-cycles were needed. This is a further indication of the low activity of the MnSOD gene. The densitometrical quantification of the MT1-mRNA RT-PCR showed a significantly increased expression in Mn deficiency, whereas quantifiable MT1-mRNA bands appeared with a lower number of PCR-cycles. Thus the results of the microarray analysis in relation to MnSOD and MT1 gene expression were confirmed.

These results led to the following conclusions:

- The effect of suboptimal alimentary manganese on gene expression probably interfered with other effects, also within the groups
- Under the conditions investigated the cDNA-microarray analysis should rather be considered as a screening method. In order to obtain significant results and higher sensitivity even more reruns per array and sample would be needed
- Verification of gene expression data and target proteins by other methods was required
- The effects of manganese on MnSOD and arginase were probably located at post-transcriptional level

- 
- Increasing gene expression and concentration of MT in Mn deficiency were probably caused by rising ROS levels
  - Up to the stage of Mn deficiency reached here, the lower MnSOD activity was probably compensated by higher MT levels relating to ROS detoxification

## 9 Literaturverzeichnis

- Abid, M. R.; Tsai, J. C.; Spokes, K. C.; Deshpande, S. S.; Irani, K.; Aird, W. C. (2001): Vascular endothelial growth factor induces manganese-superoxide dismutase expression in endothelial cells by a Rac1-regulated NADPH oxidase-dependent mechanism. *FASEB J.* **15**, 2548–2550.
- Andrews, G. K. (2000): Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 95–104.
- Anke, A.; Hennig, A.; Groppe, B.; Dittrich, G.; Grün, M.; Schellner, G. (1973b): Manganmangel beim Wiederkäuer. 4. Mitteilung [Manganese deficiency in ruminants. 4. Effect of manganese deficiency on the concentration of fat, protein manganese, ash, calcium, phosphorous, zinc and copper in newborn lambs]. *Arch. Tierernährung* **23**, 213–233.
- Anke, M.; Groppe, B.; Grün, M. (1973c): Manganmangel beim Wiederkäuer. 5. Mitteilung [Manganese deficiencies in ruminants. 5. Effect of manganese deficiency on the content of major and trace elements in adult male and female goats]. *Arch. Tierernährung* **23**, 483–500.
- Anke, M.; Groppe, B.; Reissig, W.; Lüdke, H.; Grün, M.; Dittrich, G. (1973a): Manganmangel beim Wiederkäuer. 3. Mitteilung [Manganese deficiency in ruminants. 3. Reproductive, skeletal and nervous disorders in female ruminants and their offsprings caused by manganese deficiency]. *Arch. Tierernährung* **23**, 197–211.
- Antonini, J. M.; Taylor, M. D.; Zimmer, A. T.; Roberts, J. R. (2004): Pulmonary responses to welding fumes: role of metal constituents. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* **67**, 233–249.
- Ash, D. E.; Cox, J. D.; Christianson, D. W. (2000): Arginase: a binuclear manganese metalloenzyme. *Met. Ions. Biol. Syst.* **37**, 407–428.
- Baek, S.-Y.; Cho, J.-H.; Kim, E.-S.; Kim, H.-J.; Yoon, S.; Kim, B.-S.; Kim, J.-B.; Lee, C.-R.; Yoo, C.; Lee, J.-H.; Lee, H.; Park, J.; Kim, J.-W.; Kim, Y. (2004): cDNA array analysis of gene expression profiles in brain of mice exposed to manganese. *Ind. Health.* **42**, 315–320.
- Baly, D. L.; Curry, D. L.; Keen, C. L.; Hurley, L. S. (1985b): Dynamics of insulin and glucagon release in rats: influence of dietary manganese. *Endocrinology* **116**, 1734–1740.
- Baly, D. L.; Curry, D. L.; Keen, C. L.; Hurley, L. S. (1984): Effect of manganese deficiency on insulin secretion and carbohydrate homeostasis in rats. *J. Nutr.* **114**, 1438–1446.
- Baly, D. L.; Keen, C. L.; Hurley, L. S. (1985a): Pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in developing rats: effect of manganese deficiency. *J. Nutr.* **115**, 872–879.
- Bannister, J. V.; Bannister, W. H.; Rotilio, G. (1987): Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **22**, 111–180.
- Barrett, T.; Suzek, T. O.; Troup, D. B.; Wilhite, S. E.; Ngau, W.-C.; Ledoux, P.; Rudnev, D.; Lash, A. E.; Fujibuchi, W.; Edgar, R. (2005): NCBI GEO: mining

- millions of expression profiles-database and tools. *Nucleic Acids Res.* **33**, D562-6.
- Beauchamp, C.; Fridovich, I. (1971): Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**, 276–287.
- Bell, L. T.; Hurley, L. S. (1974): Histochemical enzyme changes in epidermis of manganese-deficient fetal mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **145**, 1321–1324.
- Bergmann, V. (1992): Erkrankungen des Skelettsystems. In: Monreal, G.; Heider, G., Hrsg., Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, Bd. 2, 634–666.
- Bertinchamps, A. J.; Miller, S. T.; Cotzias, G. C. (1966): Interdependence of routes excreting manganese. *Am. J. Physiol.* **211**, 217–224.
- Bolze, M. S.; Reeves, R. D.; Lindbeck, F. E.; Kemp, S. F.; Elders, M. J. (1985): Influence of manganese on growth, somatomedin and glycosaminoglycan metabolism. *J. Nutr.* **115**, 352–358.
- Bond, J. S. (1973): Effect of manganese and amino acids on proteolytic inactivation of beef liver arginase. *Biochim. Biophys. Acta* **327**, 157–165.
- Bond, J. S.; Failla, M. L.; Unger, D. F. (1983): Elevated manganese concentration and arginase activity in livers of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Biol. Chem.* **258**, 8004–8009.
- Borrello, S.; Demple, B. (1997): NF kappa B-independent transcriptional induction of the human manganous superoxide dismutase gene. *Arch. Biochem. Biophys.* **348**, 289–294.
- Borrello, S.; Leo, M. E. de; Galeotti, T. (1992a): Transcriptional regulation of MnSOD by manganese in the liver of manganese-deficient mice and during rat development. *Biochem. Int.* **28**, 595–601.
- Borrello, S.; Leo, M. E. de; Wohlrab, H.; Galeotti, T. (1992b): Manganese deficiency and transcriptional regulation of mitochondrial superoxide dismutase in hepatomas. *FEBS Lett.* **310**, 249–254.
- Bracken, W. M.; Klaassen, C. D. (1987): Induction of metallothionein in rat primary hepatocyte cultures: evidence for direct and indirect induction. *J. Toxicol. Environ. Health.* **22**, 163–174.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Brannon, P. M.; Collins, V. P.; Korc, M. (1987): Alterations of pancreatic digestive enzyme content in the manganese-deficient rat. *J. Nutr.* **117**, 305–311.
- Brazma, A.; Hingamp, P.; Quackenbush, J.; Sherlock, G.; Spellman, P.; Stoeckert, C.; Aach, J.; Ansorge, W.; Ball, C. A.; Causton, H. C.; Gaasterland, T.; Glenisson, P.; Holstege, F. C.; Kim, I. F.; Markowitz, V.; Matese, J. C.; Parkinson, H.; Robinson, A.; Sarkans, U.; Schulze-Kremer, S.; Stewart, J.; Taylor, R.; Vilo, J.; Vingron, M. (2001): Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat. Genet.* **29**, 365–371.
- Brock, A. A.; Chapman, S. A.; Ullman, E. A.; Wu, G. (1994): Dietary manganese deficiency decreases rat hepatic arginase activity. *J. Nutr.* **124**, 340–344.

- Bull, C.; Niederhoffer, E. C.; Yoshida, T.; Fee, J. A. (1991): Kinetic studies of superoxide dismutases: properties of the manganese-containing protein from *Thermus thermophilus*. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 4069–4076.
- Burger, J.; Lord, C. G.; Yurkow, E. J.; McGrath, L.; Gaines, K. F.; Brisbin, I. L.; Gochfeld, M. (2000): Metals and metallothionein in the liver of raccoons: utility for environmental assessment and monitoring. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* **60**, 243–261.
- Burgess, J. K.; Hazelton, R. H. (2000): New developments in the analysis of gene expression. *Redox Rep.* **5**, 63–73.
- Butterworth, R. F.; Spahr, L.; Fontaine, S.; Layrargues, G. P. (1995): Manganese toxicity, dopaminergic dysfunction and hepatic encephalopathy. *Metab. Brain Dis.* **10**, 259–267.
- Carl, G. F.; Blackwell, L. K.; Barnett, F. C.; Thompson, L. A.; Rissinger, C. J.; Olin, K. L.; Critchfield, J. W.; Keen, C. L.; Gallagher, B. B. (1993): Manganese and epilepsy: brain glutamine synthetase and liver arginase activities in genetically epilepsy prone and chronically seized rats. *Epilepsia* **34**, 441–446.
- Carvajal, N.; Venegas, A.; Oestreicher, G.; Plaza, M. (1971): Effect of manganese on the quaternary structure of human liver arginase. *Biochim. Biophys. Acta* **250**, 437–442.
- Chen, C.-J.; Ou, Y.-C.; Lin, S.-Y.; Liao, S.-L.; Chen, S.-Y.; Chen, J.-H. (2006): Manganese modulates pro-inflammatory gene expression in activated glia. *Neurochem. Int.* **49**, 62–71.
- Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159.
- Christianson, S. L.; Peo, E. R., JR; Lewis, A. J. (1989): Effects of dietary manganese levels on reproductive performance of sows. *J. Anim. Sci.* **67 (Suppl. 1)**, 251 (abstr.).
- Christianson, S. L.; Peo, E. R., JR; Lewis, A. J.; Giesemann, M. A. (1990): Influence of dietary manganese levels on reproduction, serum cholesterol and milk manganese concentration of sows. *J. Anim. Sci.* **68 (Suppl. 1)**, 368 (abstr.).
- Chung, D. J.; Wright, A. E.; Clerch, L. B. (1998): The 3' untranslated region of manganese superoxide dismutase RNA contains a translational enhancer element. *Biochemistry* **37**, 16298–16306.
- Churchill, G. A. (2002): Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat. Genet.* **32 Suppl**, 490–495.
- Clegg, M. S.; Lönnerdal, B.; Hurley, L. S.; Keen, C. L. (1986): Analysis of whole blood manganese by flameless atomic absorption spectrophotometry and its use as an indicator of manganese status in animals. *Anal. Biochem.* **157**, 12–18.
- Combs, D. K. (1987): Hair analysis as an indicator of mineral status of livestock. *J. Anim. Sci.* **65**, 1753–1758.
- Combs, D. K.; Goodrich, R. D.; Meiske, J. C. (1982): Mineral concentrations in hair as indicators of mineral status: a review. *J. Anim. Sci.* **54**, 391–398.

- Conrad, M. E.; Umbreit, J. N. (2000): Iron absorption and transport-an update. *Am. J. Hematol.* **64**, 287–298.
- Cooper, A. J. L.; Vergara, F.; Duffy, T. E. (1983): Cerebrale glutamine synthetase. In: Hertz, L.; Kvamme, E.; McGeer, E. G.; Schousboe, A., eds., *Glutamine, glutamate, and GABA in the central nervous system: neurology and neurobiology*, Vol 7. Liss, New York **9**, 77–93.
- Corraliza, I. M.; Soler, G.; Eichmann, K.; Modolell, M. (1995): Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **206**, 667–673.
- Cotzias, G. C. (1958): Manganese in health and disease. *Physiol. Rev.* **38**, 503–532.
- Cotzias, G. C. (1961): Manganese versus magnesium: why are they so similar in vitro and so different in vivo? *Fed. Proc.* **20**, 98–103.
- Cotzias, G. C.; Miller, S. T.; Edwards, J. (1966): Neutron activation analysis: the stability of manganese concentrations in human blood and serum. *J. Lab. Clin. Med.* **67**, 836–849.
- Crapo, J. D.; McCord, J. M.; Fridovich, I. (1978): Preparation and assay of superoxide dismutases. *Meth. Enzymol.* **53**, 382–393.
- Cunningham, M. J.; Liang, S.; Fuhrman, S.; Seilhamer, J. J.; Somogyi, R. (2000): Gene expression microarray data analysis for toxicology profiling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **919**, 52–67.
- Daniel, H. (2002): Genomics and proteomics: importance for the future of nutrition research. *Br. J. Nutr.* **87 Suppl 2**, S305-11.
- Das, K. C.; White, C. W. (1997): Activation of NF-kappa B by Antineoplastic Agents. Role of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **272**, 14914–14920.
- Davidsson, L.; Almgren, A.; Juillerat, M. A.; Hurrell, R. F. (1995): Manganese absorption in humans: the effect of phytic acid and ascorbic acid in soy formula. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**, 984–987.
- Davidsson, L.; Lönnerdal, B.; Sandström, B.; Kunz, C.; Keen, C. L. (1989): Identification of transferrin as the major plasma carrier protein for manganese introduced orally or intravenously or after in vitro addition in the rat. *J. Nutr.* **119**, 1461–1464.
- Davis, C. A.; Monnier, J. M.; Nick, H. S. (2001): A coding region determinant of instability regulates levels of manganese superoxide dismutase mRNA. *J. Biol. Chem.* **276**, 37317–37326.
- Davis, C. D.; Wolf, T. L.; Greger, J. L. (1992): Varying levels of manganese and iron affect absorption and gut endogenous losses of manganese by rats. *J. Nutr.* **122**, 1300–1308.
- Davis, C. D.; Zech, L.; Greger, J. L. (1993): Manganese metabolism in rats: an improved methodology for assessing gut endogenous losses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **202**, 103–108.
- Dougall, W. C.; Nick, H. S. (1991): Manganese superoxide dismutase: a hepatic acute phase protein regulated by interleukin-6 and glucocorticoids. *Endocrinology* **129**, 2376–2384.

- Eaton, D. L.; Toal, B. F. (1982): Evaluation of the Cd/hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **66**, 134–142.
- Erikson, K.; Aschner, M. (2002): Manganese causes differential regulation of glutamate transporter (GLAST) taurine transporter and metallothionein in cultured rat astrocytes. *Neurotoxicology* **23**, 595–602.
- Erikson, K. M.; Suber, R. L.; Aschner, M. (2002): Glutamate/aspartate transporter (GLAST), taurine transporter and metallothionein mRNA levels are differentially altered in astrocytes exposed to manganese chloride, manganese phosphate or manganese sulfate. *Neurotoxicology* **23**, 281–288.
- Everson, G. J.; Shrader, R. E. (1968): Abnormal glucose tolerance in manganese-deficient guinea pigs. *J. Nutr.* **94**, 89–94.
- Falbe, J.; Regitz, M. (1991): Römpp Chemie Lexikon; M-Pk. 9. erw. und neubearb. Aufl. Stuttgart: Thieme (Bd 4).
- Fechner, A.; Böhme, C.; Gromer, S.; Funk, M.; Schirmer, R.; Becker, K. (2001): Antioxidant status and nitric oxide in the malnutrition syndrome kwashiorkor. *Pediatr. Res.* **49**, 237–243.
- Finley, J. W.; Caton, J. S.; Zhou, Z.; Davison, K. L. (1997): A surgical model for determination of true absorption and biliary excretion of manganese in conscious swine fed commercial diets. *J. Nutr.* **127**, 2334–2341.
- Finley, J. W.; Davis, C. D. (2001): Manganese absorption and retention in rats is affected by the type of dietary fat. *Biol. Trace Elem. Res.* **82**, 143–158.
- Finley, J. W. (2004): Does environmental exposure to manganese pose a health risk to healthy adults? *Nutr. Rev.* **62**, 148–153.
- Finley, J. W.; Penland, J. G.; Pettit, R. E.; Davis, C. D. (2003): Dietary manganese intake and type of lipid do not affect clinical or neuropsychological measures in healthy young women. *J. Nutr.* **133**, 2849–2856.
- Flohé, L.; Brigelius-Flohé, R.; Saliou, C.; Traber, M. G.; Packer, L. (1997): Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radic. Biol. Med.* **22**, 1115–1126.
- Fridovich, I. (1976): Superoxide dismutases: studies of structure and mechanism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **74**, 530–539.
- Friedmann, N.; Rasmussen, H. (1970): Calcium, manganese and hepatic gluconeogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **222**, 41–52.
- Fülle, H.-J. (2003): Quality assessment of cDNA libraries. *Methods Mol. Biol.* **221**, 145–153.
- Galeotti, T.; Wohlrab, H.; Borrello, S.; Leo, M. E. de (1989): Messenger RNA for manganese and copper-zinc superoxide dismutases in hepatomas: correlation with degree of differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165**, 581–589.
- García-Martínez, J.; Linares, A.; Suárez, M. D.; García-Peregrín, E. (1982): Partial purification and properties of mevalonate kinase from neonatal chick liver. *Rev. Esp. Fisiol.* **38**, 261–266.

- Gavin, C. E.; Gunter, K. K.; Gunter, T. E. (1999): Manganese and calcium transport in mitochondria: implications for manganese toxicity. *Neurotoxicology* **20**, 445–453.
- Gemeinschaftsregister der Futtermittelzusatzstoffe gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003: Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung (ABl. EU Nr. L 268/29 vom 18.10.2003). COMMISSION REGULATION (EC) No 1334/2003 of 25 July 2003 amending the conditions for authorisation of a number of additives in feedingstuffs belonging to the group of trace elements (Official Journal of the European Union L 187/11 vom 26.7.2003).
- GfE Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (1995): Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Mastriinder. Frankfurt (Main): DLG-Verl. (Energie- und Nährstoffbedarf landwirtschaftlicher Nutztiere, 6).
- GfE Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (2000): Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Legehennen und Masthühner (Broiler) 1999. Frankfurt am Main: DLG-Verl. (Energie- und Nährstoffbedarf landwirtschaftlicher Nutztiere, 7).
- GfE Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (2003): Recommendations for the Supply of Energy and Nutrients to goats. Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Ziegen. Frankfurt am Main: DLG-Verlag (Energie- und Nährstoffbedarf landwirtschaftlicher Nutztiere, 9).
- Gold, D.; Coombes, K.; Medhane, D.; Ramaswamy, A.; Ju, Z.; Strong, L.; Koo, J. S.; Kapoor, M. (2004): A comparative analysis of data generated using two different target preparation methods for hybridization to high-density oligonucleotide microarrays. *BMC Genomics* **5**, 2.
- Gotoh, T.; Chowdhury, S.; Takiguchi, M.; Mori, M. (1997): The glucocorticoid-responsive gene cascade. Activation of the rat arginase gene through induction of C/EBPbeta. *J. Biol. Chem.* **272**, 3694–3698.
- Grace, N. D.; Lee, J. (1990): Effect of Co Cu Fe Mn Mo Se and Zn supplementation on the elemental content of soft tissues and bone sheep grazing ryegrass/white clover pasture. *N. Z. J. Agric. Res.* **33**, 635–647.
- Graham, T. W. (1991): Trace element deficiencies in cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **7**, 153–215.
- Greve, C.; Trachtenberg, E.; Opsahl, W.; Abbott, U.; Rucker, R. (1987): Diet as an external factor in the expression of scoliosis in a line of susceptible chickens. *J. Nutr.* **117**, 189–193.
- Gunshin, H.; Mackenzie, B.; Berger, U. V.; Gunshin, Y.; Romero, M. F.; Boron, W. F.; Nussberger, S.; Gollan, J. L.; Hediger, M. A. (1997): Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **388**, 482–488.
- Günther, T.; Höllriegel, V.; Vormann, J.; Bubeck, J.; Classen, H. G. (1994): Increased lipid peroxidation in rat tissues by magnesium deficiency and vitamin E depletion. *Mag. Bull.* **16**, 38–43.
- Hakhamian, N. (1973): Wechselwirkung unterschiedlicher Eisen- und Mangan-Gaben bei der Ratte. Diss. Agr., Universität Gießen.

- Halgren, R. G.; Fielden, M. R.; Fong, C. J.; Zacharewski, T. R. (2001): Assessment of clone identity and sequence fidelity for 1189 IMAGE cDNA clones. *Nucleic Acids Res.* **29**, 582–588.
- Halpin, K. M.; Baker, D. H. (1986): Long-term effects of corn, soybean meal, wheat bran, and fish meal on manganese utilization in the chick. *Poult. Sci.* **65**, 1371–1374.
- HaMai, D.; Rinderknecht, A. L.; Guo-Sharman, K.; Kleinman, M. T.; Bondy, S. C. (2006): Decreased expression of inflammation-related genes following inhalation exposure to manganese. *Neurotoxicology* **27**, 395–401.
- Harris, C. A.; Derbin, K. S.; Hunte-McDonough, B.; Krauss, M. R.; Chen, K. T.; Smith, D. M.; Epstein, L. B. (1991): Manganese superoxide dismutase is induced by IFN-gamma in multiple cell types. Synergistic induction by IFN-gamma and tumor necrosis factor or IL-1. *J. Immunol.* **147**, 149–154.
- Heiseke, D.; Kirchgessner, M. (1977): Experimenteller Mn-Mangel bei Ratten durch Frühabsetzen. *Z. Tierphysiol. Tierernährg. u. Futtermittelkde.* **39**, 197–203.
- Heiseke, D.; Kirchgessner, M. (1979): Activity of different dehydrogenases and alkaline phosphatase in manganese deficiency. *Nutr. Metab.* **23**, 211–216.
- Henry, P. R.; Ammerman, C. B.; Littell, R. C. (1992): Relative bioavailability of manganese from a manganese-methionine complex and inorganic sources for ruminants. *J. Dairy Sci.* **75**, 3473–3478.
- Herzfeld, A.; Raper, S. M. (1976): The heterogeneity of arginases in rat tissues. *Biochem. J.* **153**, 469–478.
- Hidalgo, A.; Betancor, L.; Moreno, R.; Zafra, O.; Cava, F.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M.; Berenguer, J. (2004): Thermus thermophilus as a Cell Factory for the Production of a Thermophilic Mn-Dependent Catalase Which Fails To Be Synthesized in an Active Form in Escherichia coli. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3839–3844.
- Hidiroglou, M. (1979): Manganese in ruminant nutrition. *Can. J. Anim. Sci.* **59**, 217–236.
- Hidiroglou, M.; Ho, S. K.; Ivan, M.; Shearer, D. A. (1978): Manganese status of pasturing ewes, of pregnant ewes and doe rabbits on low manganese diets and of dairy cows with cystic ovaries. *Can. J. Comp. Med.* **42**, 100–107.
- Hidiroglou, M.; Ivan, M.; Bryan, M. K.; Ribble, C. S.; Janzen, E. D.; Proulx, J. G.; Elliot, J. I. (1990): Assessment of the role of manganese in congenital joint laxity and dwarfism in calves. *Ann. Rech. Vet.* **21**, 281–284.
- Hidiroglou, M.; Williams, C. J.; Siddiqui, I. R.; Khan, S. U. (1979): Effects of Mn-deficit feeding to ewes on certain amino acids and sugars in cartilage of their newborn lambs. *Am. J. Vet. Res.* **40**, 1375–1377.
- Hirsch-Kolb, H.; Heine, J. P.; Kolb, H. J.; Greenberg, D. M. (1970): Comparative physical-chemical studies of mammalian arginases. *Comp. Biochem. Physiol.* **37**, 345–359.
- Hirsch-Kolb, H.; Kolb, H. J.; Greenberg, D. M. (1971): Nuclear magnetic resonance studies of manganese binding of rat liver arginase. *J. Biol. Chem.* **246**, 395–401.

- Hsu, J. L.; Hsieh, Y.; Tu, C.; O'Connor, D.; Nick, H. S.; Silverman, D. N. (1996): Catalytic properties of human manganese superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **271**, 17687–17691.
- Huang, T. T.; Carlson, E. J.; Kozy, H. M.; Mantha, S.; Goodman, S. I.; Ursell, P. C.; Epstein, C. J. (2001): Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1101–1110.
- Hughes, T. R.; Mao, M.; Jones, A. R.; Burchard, J.; Marton, M. J.; Shannon, K. W.; Lefkowitz, S. M.; Ziman, M.; Schelter, J. M.; Meyer, M. R.; Kobayashi, S.; Davis, C.; Dai, H.; He, Y. D.; Stephaniants, S. B.; Cavet, G.; Walker, W. L.; West, A.; Coffey, E.; Shoemaker, D. D.; Stoughton, R.; Blanchard, A. P.; Friend, S. H.; Linsley, P. S. (2001): Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat. Biotechnol.* **19**, 342–347.
- Hurley, L. S.; Bell, L. T. (1974): Genetic influence on response to dietary manganese deficiency in mice. *J. Nutr.* **104**, 133–137.
- Hurley, L. S.; Keen, C. L. (1987): Manganese. In: Underwood, E.; Mertz., W., eds., Trace Elements in Human Health and Animal Nutrition. Academic Press; New York 185–223, 185–225.
- Hurley, L. S.; Keen, C. L.; Baly, D. L. (1984): Manganese deficiency and toxicity: effects on carbohydrate metabolism in the rat. *Neurotoxicology* **5**, 97–104.
- Iacobas, D.; Massimi, A.; Urban, M.; Iacobas, S.; Spray, D. (2002): Hits and misses from gene expression ratio measurements in cDNA microarray studies. *J. Biomol. Tech* **13**, 143–157.
- Jiralerspong, S.; Ge, B.; Hudson, T. J.; Pandolfo, M. (2001): Manganese superoxide dismutase induction by iron is impaired in Friedreich ataxia cells. *FEBS Lett.* **509**, 101–105.
- Johnson, P. E.; Korynta, E. D. (1992): Effects of copper, iron, and ascorbic acid on manganese availability to rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **199**, 470–480.
- Kane, M. D.; Jatcoe, T. A.; Stumpf, C. R.; Lu, J.; Thomas, J. D.; Madore, S. J. (2000): Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Res.* **28**, 4552–4557.
- Kanyo, Z. F.; Chen, C. Y.; Daghigh, F.; Ash, D. E.; Christianson, D. W. (1992): Crystallization and oligomeric structure of rat liver arginase. *J. Mol. Biol.* **224**, 1175–1177.
- Karatzias, H.; Roubies, N.; Polizopoulou, Z.; Papasteriades, A. (1995): Zungenspielen und Manganmangel bei Milchkühen. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* **102**, 352–353.
- Kauer, C. (2006): Auswirkungen suboptimaler Manganversorgung auf biochemische Parameter, Mangan-Versorgungsstatus und Chondropoese beim Ferkel. Untersuchungen zur optimalen Manganversorgung. Diss. med. vet., Universität Gießen.
- Kauer, C.; Brandl, K.; Pallauf, J. (2005): Reduced activity of manganese dependent enzymes in piglets as an indicator of subclinical manganese deficiency. 59. Tagung vom 08. - 10.03.2005 in Stuttgart-Hohenheim, Kurzfassungen der

- Originalmitteilungen (Abstracts). Frankfurt am Main: DLG-Verl. (Proceedings of the Society of Nutrition Physiology, 14).
- Keen, C. L.; Clegg, M. S.; Lönnerdal, B.; Hurley, L. S. (1983): Whole-blood manganese as an indicator of body manganese. *N. Engl. J. Med.* **308**, 1230.
- Keen, C. L.; Ensunsa, J. L.; Watson, M. H.; Baly, D. L.; Donovan, S. M.; Monaco, M. H.; Clegg, M. S. (1999): Nutritional aspects of manganese from experimental studies. *Neurotoxicology* **20**, 213–223.
- Keen, C. L.; Lonnerdal, B.; Hurley, L. S. (1984): Manganese. In: Frieden, E. ed., *Biochemistry of the Ultratrace Elements*, Plenum Publishing Co., New York, 89–132.
- Kemmerer, A. R.; Elvehjem, C. A.; Hart, E. B. (1931): Studies on the relation of manganese to the nutrition of the mouse. *J. Biol. Chem.* **92**, 623–630.
- Kimura, M.; Ujihara, M.; Yokoi, K. (1996): Tissue manganese levels and liver pyruvate carboxylase activity in magnesium-deficient rats. *Biol. Trace. Elem. Res.* **52**, 171–179.
- Kirchgessner, M.; Heiseke, D. (1978): Arginase-Aktivität in der Leber wachsender Ratten bei Mn-Mangel. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **48**, 75–78.
- Kirchgessner, M.; Roth-Maier, D. A.; Grassmann, E.; Mader, H. (1982): [Fe-, Cu-, Zn-, Ni- and Mn-concentrations in sow's milk during a five-week lactation period]. *Arch. Tierernährung* **32**, 853–858.
- Knight, J. (2001): When the chips are down. *Nature* **410**, 860–861.
- Knirsch, L.; Clerch, L. B. (2001): Tyrosine phosphorylation regulates manganese superoxide dismutase (MnSOD) RNA-binding protein activity and MnSOD protein expression. *Biochemistry* **40**, 7890–7895.
- Kobayashi, K.; Kuroda, J.; Shibata, N.; Hasegawa, T.; Seko, Y.; Satoh, M.; Tohyama, C.; Takano, H.; Imura, N.; Sakabe, K.; Fujishiro, H.; Himeno, S. (2007): Induction of metallothionein by manganese is completely dependent on interleukin-6 production. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **320**, 721–727.
- Kondoh, M.; Inoue, Y.; Atagi, S.; Futakawa, N.; Higashimoto, M.; Sato, M. (2001): Specific induction of metallothionein synthesis by mitochondrial oxidative stress. *Life Sci.* **69**, 2137–2146.
- Kothapalli, R.; Yoder, S. J.; Mane, S.; Loughran, T. P. (2002): Microarray results: how accurate are they? *BMC Bioinformatics* **3**, 22.
- Kuo, W. P.; Jenssen, T.-K.; Butte, A. J.; Ohno-Machado, L.; Kohane, I. S. (2002): Analysis of matched mRNA measurements from two different microarray technologies. *Bioinformatics* **18**, 405–412.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lamb, A. L.; Torres, A. S.; O'Halloran, T. V.; Rosenzweig, A. C. (2001): Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 751–755.
- Leach, R. M. (1971): Role of manganese in mucopolysaccharide metabolism. *Fed. Proc.* **30**, 991–994.

- Leach, R. M.; Gross, J. R. (1983): The effect of manganese deficiency upon the ultrastructure of the eggshell. *Poult. Sci.* **62**, 499–504.
- Leach, R. M.; Lilburn, M. S. (1978): Manganese metabolism and its function. *World. Rev. Nutr. Diet.* **32**, 123–134.
- Leach, R. M., JR: The role of trace elements in the development of cartilage matrix. In: Lonnerdal, B.; Rucker, R. B., eds., Trace elements in man and animals – 6. Plenum 1988; New York, 1988, 267–271.
- Leach, R. M., JR; Harris, E. D. (1997): Manganese. In: O'Dell, B. L.; Sunde, R. A., eds., Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements. Marcel Dekker, Inc, New York, 335–356.
- Lebovitz, R. M.; Zhang, H.; Vogel, H.; Cartwright, J.; Dionne, L.; Lu, N.; Huang, S.; Matzuk, M. M. (1996): Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 9782–9787.
- Lee, C. K.; Klopp, R. G.; Weindruch, R.; Prolla, T. A. (1999): Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* **285**, 1390–1393.
- Lee, C. K.; Weindruch, R.; Prolla, T. A. (2000): Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nat. Genet.* **25**, 294–297.
- Lee, D. Y.; Johnson, P. E. (1988): Factors affecting absorption and excretion of <sup>54</sup>Mn in rats. *J. Nutr.* **118**, 1509–1516.
- Leibholz, J. M.; Speer, V. C.; Hays, V. W. (1962): Effect of Dietary Manganese on Baby Pig Performance and Tissue Manganese Levels. *J. Anim Sci.* **21**, 772–776.
- Lima, P. D. L.; Vasconcellos, M. C.; Bahia, M. O.; Montenegro, R. C.; Pessoa, C. O.; Costa-Lotuf, L. V.; Moraes, M. O.; Burbano, R. R. (2008): Genotoxic and cytotoxic effects of manganese chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. *Toxicol. In Vitro* **22**, 1032–1037.
- Lipshutz, R. J.; Fodor, S. P.; Gingeras, T. R.; Lockhart, D. J. (1999): High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat. Genet.* **21**, 20–24.
- Liu, A. C.; Heinrichs, B. S.; Leach, R. M. (1994): Influence of manganese deficiency on the characteristics of proteoglycans of avian epiphyseal growth plate cartilage. *Poult. Sci.* **73**, 663–669.
- Lockhart, D. J.; Dong, H.; Byrne, M. C.; Follettie, M. T.; Gallo, M. V.; Chee, M. S.; Mittmann, M.; Wang, C.; Kobayashi, M.; Horton, H.; Brown, E. L. (1996): Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.* **14**, 1675–1680.
- Luo, X.; Li, S.; Liu, B.; Bu, Y.; Kuang, X.; Yu, S. (2004): Bioavailabilities of manganese sources based on heart manganese-containing superoxide dismutase gene expression for broilers. *Wei sheng yan jiu = Journal of hygiene research* **33**, 681–686.
- Lyons, M.; Insko, W. M., JR. (1937): Chondrodystrophy in the chick embryo produced by manganese deficiency in the diet of the hen. *Kentucky Agric. Exp. Sta. Bull.* **371**, 62–75.
- Macmillan-Crow, L. A.; Cruthirds, D. L. (2001): Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic. Res.* **34**, 325–336.

- Maggini, S.; Stoecklin-Tschan, F. B.; Mörikofer-Zwez, S.; Walter, P. (1993): A physiological role of Mn<sup>2+</sup> in the regulation of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase from rat liver is unlikely. *Biochem. J.* **292** ( Pt 2), 365–370.
- Malecki, E. A.; Greger, J. L. (1996): Manganese protects against heart mitochondrial lipid peroxidation in rats fed high levels of polyunsaturated fatty acids. *J. Nutr.* **126**, 27–33.
- Malecki, E. A.; Huttner, D. L.; Greger, J. L. (1994): Manganese status, gut endogenous losses of manganese, and antioxidant enzyme activity in rats fed varying levels of manganese and fat. *Biol. Trace. Elem. Res.* **42**, 17–29.
- Malecki, E. A.; Lo, H. C.; Yang, H.; Davis, C. D.; Ney, D. M.; Greger, J. L. (1995): Tissue manganese concentrations and antioxidant enzyme activities in rats given total parenteral nutrition with and without supplemental manganese. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* **19**, 222–226.
- Marklund, S.; Marklund, G. (1974): Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**, 469–474.
- Marshall, E. (2004): Getting the noise out of gene arrays. *Science* **306**, 630–631.
- Martinez-Hernandez, A.; Bell, K. P.; Norenberg, M. D. (1977): Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* **195**, 1356–1358.
- Mary-Huard, T.; Daudin, J.-J.; Baccini, M.; Biggeri, A.; Bar-Hen, A. (2007): Biases induced by pooling samples in microarray experiments. *Bioinformatics* **23**, i313–8.
- Mary-Huard, T.; Daudin, J.-J.; Robin, S.; Bitton, F.; Cabannes, E.; Hilson, P. (2004): Spotting effect in microarray experiments. *BMC Bioinformatics* **5**, 63.
- Masters, D. G.; Paynter, D. I.; Briegel, J.; Baker, S. K.; Purser, D. B. (1988): Influence of manganese intake on body, wool and testicular growth of young rams and on the concentration of manganese and the activity of manganese enzymes in tissues. *Aust. J. Agric. Res.* **39**, 517–524.
- Masuda, A.; Longo, D. L.; Kobayashi, Y.; Appella, E.; Oppenheim, J. J.; Matsushima, K. (1988): Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase by interleukin 1. *FASEB J.* **2**, 3087–3091.
- McNatt, M. L.; Fiser, F. M.; Elders, M. J.; Kilgore, B. S.; Smith, W. G.; Hughes, E. R. (1976): Uridine diphosphate xylosyltransferase activity in cartilage from manganese-deficient chicks. *Biochem. J.* **160**, 211–216.
- Mecham, B. H.; Wetmore, D. Z.; Szallasi, Z.; Sadovsky, Y.; Kohane, I.; Mariani, T. J. (2004): Increased measurement accuracy for sequence-verified microarray probes. *Physiol. Genomics* **18**, 308–315.
- Meister, A.: Enzymology of glutamine. In: Häussinger, D.; Sies, H., eds., glutamine metabolism in mammalian tissue. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1984, 3–15.
- Melov, S.; Schneider, J. A.; Day, B. J.; Hinerfeld, D.; Coskun, P.; Mirra, S. S.; Crapo, J. D.; Wallace, D. C. (1998): A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* **18**, 159–163.

- Merkblatt zur BK Nr. 1105: Erkrankungen durch Mangan oder seine Verbindungen. Merkblatt zu BK Nr. 12 der Anl. 1 zur 7. BKVO (Bek. des BMA v. 19.5.1964, BArbBI Fachteil Arbeitsschutz 1964, 128f).
- Miller, K. B.; Newman, S. M.; Caton, J. S.; Finley, J. W. (2004): Manganese alters mitochondrial integrity in the hearts of swine marginally deficient in magnesium. *Biofactors* **20**, 85–96.
- Miller, N. J.; Rice-Evans, C.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A. (1993): A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* **84**, 407–412.
- Minson, D. J. (1990): Forage in ruminant nutrition, Academic Press, San Diego, Calif., 359–368.
- Mitchell, R. L. (1957): The trace element content of plants. *Res. UK* **10**, 357–362.
- Modolell, M.; Corraliza, I. M.; Link, F.; Soler, G.; Eichmann, K. (1995): Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur. J. Immunol.* **25**, 1101–1104.
- Moffatt, P.; Denizeau, F. (1997): Metallothionein in physiological and physiopathological processes. *Drug Metab. Rev.* **29**, 261–307.
- Montes, S.; Alcaraz-Zubeldia, M.; Muriel, P.; Rios, C. (2003): Role of manganese accumulation in increased brain glutamine of the cirrhotic rat. *Neurochem. Res.* **28**, 911–917.
- Müller, H.-J.; Röder, T. (2004): Der Experimentator: Microarrays. 1. Aufl. Heidelberg: Elsevier Spektrum Akad. Verl.
- Murley, J. S.; Kataoka, Y.; Hallahan, D. E.; Roberts, J. C.; Grdina, D. J. (2001): Activation of NFkappaB and MnSOD gene expression by free radical scavengers in human microvascular endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 1426–1439.
- Naumann, C.; Bassler, R. (1997): Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (Hg.). Darmstadt: VDLUFA-Verl.
- Neher, G. M.; Doyle, L. P.; Thrasher, D. M.; Plumlee, M. P. (1956): Radiographic and histopathological findings in the bones of swine deficient in manganese. *Am. J. Vet. Res.* **17**, 121–128.
- Norenberg, M. D. (1979): Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. *J. Histochem. Cytochem.* **27**, 756–762.
- NRC National Research Council (1985): Nutrient requirements of sheep. 6. rev. ed. Washington D. C.: National Acad. Press.
- NRC National Research Council (1994): Nutrient requirements of poultry. 9. rev. ed. Washington D. C.: National Acad. Press.
- NRC National Research Council (1995): Nutrient requirements of laboratory animals. 4. rev. ed. Washington D. C.: National Acad. Press.
- NRC National Research Council (1998): Nutrient requirements of swine. 10. rev. ed. Washington D. C.: National Acad. Press.

- NRC National Research Council (2000): Nutrient requirements of beef cattle. 7th rev. ed., update. Washington D. C.: National Acad. Press.
- Ochrimenko, C.; Lemser, A.; Richter, G.; Krause, U.; Bonsak, H. (1992): [Effect of the manganese content in laying hen feed with different Ca and mineral levels on the egg shell quality and bone mineralization of hens]. *Arch. Tierernährung* **42**, 25–35.
- Onosaka, S.; Cherian, M. G. (1982): Comparison of metallothionein determination by polarographic and cadmium-saturation methods. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **63**, 270–274.
- Orent, E. R.; McCollum, E. V. (1931): Effects of deprivation of manganese in the rat. *J. Biol. Chem.* **92**, 651–678.
- Oubrahim, H.; Stadtman, E. R.; Chock, P. B. (2001): Mitochondria play no roles in Mn(II)-induced apoptosis in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 9505–9510.
- Oubrahim, H.; Chock, P. B.; Stadtman, E. R. (2002): Manganese(II) induces apoptotic cell death in NIH3T3 cells via a caspase-12-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 20135–20138.
- Özer, N. (1985): A new enzyme-coupled spectrophotometric method for the determination of arginase activity. *Biochem. Med.* **33**, 367–371.
- Pallauf, J.; Höhler, D.; Rimbach, G. (1992): Effekt einer Zulage an mikrobieller Phytase zu einer Mais-Soja-Diät auf die scheinbare Absorption von Mg, Fe, Cu, Mn und Zn sowie auf Parameter des Zinkstatus beim Ferkel. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **68**, 1–9.
- Parkinson, H.; Sarkans, U.; Shojatalab, M.; Abeygunawardena, N.; Contrino, S.; Coulson, R.; Farne, A.; Lara, G. G.; Holloway, E.; Kapushesky, M.; Lilja, P.; Mukherjee, G.; Oezcimen, A.; Rayner, T.; Rocca-Serra, P.; Sharma, A.; Sansone, S.; Brazma, A. (2005): ArrayExpress--a public repository for microarray gene expression data at the EBI. *Nucleic Acids Res.* **33**, D553–555.
- Paynter, D. I. (1980): Changes in activity of the manganese superoxide dismutase enzyme in tissues of the rat with changes in dietary manganese. *J. Nutr.* **110**, 437–447.
- Pernecco, L. C.; Viridis, R. U. (1977): Distribution of glutamine synthetase in animal tissues. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **53**, 1871–1875.
- Petersen, D.; Chandramouli, G. V. R.; Geoghegan, J.; Hilburn, J.; Paarlberg, J.; Kim, C. H.; Munroe, D.; Gangi, L.; Han, J.; Puri, R.; Staudt, L.; Weinstein, J.; Barrett, J. C.; Green, J.; Kawasaki, E. S. (2005): Three microarray platforms: an analysis of their concordance in profiling gene expression. *BMC Genomics* **6**, 63.
- Peterson, W. H.; Skinner, J. T. (1931): Distribution of Manganese in Foods. *J. Nutr.* **4**, 419–426.
- Powell, J. T.; Brew, K. (1976): Metal ion activation of galactosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **251**, 3645–3652.
- Przybilla, P.; Pallauf, J. (1991): Studies on manganese deficiency in the growing rat. *Agribiol. Res.* **44**, 63–69.

- Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey, G. C. (1993): AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* **123**, 1939–1951.
- Rhéaume, J. A.; Chavez, E. R. (1989): Trace mineral metabolism in non-gravid, gestating and lactating gilts fed two dietary levels of manganese. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* **3**, 231–242.
- Rhéaume, J. A.; Chavez, E. R. (1991): Metabolic activity of manganese during late gestation of first-litter gilts. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* **5**, 227–234.
- Rice-Evans, C.; Miller, N. J. (1994): Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Meth. Enzymol.* **234**, 279–293.
- Riddell, C.: Developmental, metabolic and other non-infectious disorders. In: Calnek, B. W., ed., *Diseases of poultry*, 10th edn. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1997, 913–950.
- Riddell, C.: Non-infectious skeletal disorders of poultry: An overview. In: Whitehead, C. C., ed., *Bone biology and skeletal disorders in poultry*, Poultry Science Symposium 23, Carfax Co., Abingdon, England, 1992, 119–145.
- Rimbach, G.; DePascual-Teresa, S. (2005): Application of Nutrigenomics Tools to Analyze the Role of Oxidants and Antioxidants in Gene Expression. In: Rimbach, G.; Packer, L.; Fuchs, J., eds., *Nutrigenomics*. Boca Raton, FL: Taylor & Francis (Oxidative stress and disease, 17).
- Roberts, V. A.; Fisher, C. L.; Redford, S. M.; McRee, D. E.; Parge, H. E.; Getzoff, E. D.; Tainer, J. A. (1991): Mechanism and atomic structure of superoxide dismutase. *Free Radic. Res. Commun.* **12-13 Pt 1**, 269–278.
- Robinson, B. H. (1998): The role of manganese superoxide dismutase in health and disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **21**, 598–603.
- Rockett, J. C.; Dix, D. J. (2000): DNA arrays: technology, options and toxicological applications. *Xenobiotica* **30**, 155–177.
- Rodén, L.: Structure and metabolism of connective tissue proteoglycans. In: Lennarz, W. J., ed., *The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans*, Plenum, New York, 1980, 267–371.
- Rogers, R. J.; Monnier, J. M.; Nick, H. S. (2001): Tumor necrosis factor-alpha selectively induces MnSOD expression via mitochondria-to-nucleus signaling, whereas interleukin-1beta utilizes an alternative pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 20419–20427.
- Rognstad, R. (1981): Manganese effects on gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.* **256**, 1608–1610.
- Sakurai, H.; Nishida, M.; Yoshimura, T.; Takada, J.; Koyama, M. (1985): Partition of divalent and total manganese in organs and subcellular organelles of MnCl<sub>2</sub>-treated rats studied by ESR and neutron activation analysis. *Biochim. Biophys. Acta* **841**, 208–214.
- Sakurai, H.; Nishida, M.; Yoshimura, T. (1982): EPR detection and characterization of manganous-(II) ion in subcellular fractions of the liver and kidney and thyroid

- homogenate of mice treated with manganese chloride. *Inorganica Chim. Acta* **66**, L17-L20.
- Salimuddin; Nagasaki, A.; Gotoh, T.; Isobe, H.; Mori, M. (1999): Regulation of the genes for arginase isoforms and related enzymes in mouse macrophages by lipopolysaccharide. *Am. J. Physiol.* **277**, E110-7.
- Sansom, B. F. (1973): Mineral nutrition and production disease in dairy cows. *Br. Vet. J.* **129**, 207–220.
- Sato, M.; Sasaki, M.; Hojo, H. (1995): Antioxidative roles of metallothionein and manganese superoxide dismutase induced by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**, 738–744.
- Schena, M.; Shalon, D.; Davis, R. W.; Brown, P. O. (1995): Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467–470.
- Schena, M. (2003): Microarray analysis. Hoboken, NJ: Wiley-Liss.
- Schramm, V. L.; Fullin, F. A.; Zimmerman, M. D. (1981): Kinetic studies of the interaction of substrates, Mn<sup>2+</sup>, and Mg<sup>2+</sup> with the Mn<sup>2+</sup>-sensitive and -insensitive forms of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.* **256**, 10803–10808.
- Schroeder, H. A.; Balassa, J. J.; Tipton, I. H. (1966): Essential trace metals in man: manganese. A study in homeostasis. *J. Chronic Dis.* **19**, 545–571.
- Schroeder, J. J.; Cousins, R. J. (1990): Interleukin 6 regulates metallothionein gene expression and zinc metabolism in hepatocyte monolayer cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 3137–3141.
- Schulte, A. E.; van der Heijden, R.; Verpoorte, R. (2000): Purification and characterization of mevalonate kinase from suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Arch. Biochem. Biophys.* **378**, 287–298.
- Scrutton, M. C.; Griminger, P.; Wallace, J. C. (1972): Pyruvate carboxylase. Bound metal content of the vertebrate liver enzyme as a function of diet and species. *J. Biol. Chem.* **247**, 3305–3313.
- Scrutton, M. C.; Utter, M. F.; Mildvan, A. S. (1966): Pyruvate carboxylase. VI. The presence of tightly bound manganese. *J. Biol. Chem.* **241**, 3480–3487.
- Settle, E. A.; Mraz, F. R.; Douglas, C. R.; Bletner, J. K. (1969): Effect of diet and manganese level on growth, perosis and <sup>54</sup>Mn uptake in chicks. *J. Nutr.* **97**, 141–146.
- Smith, M. O.; Sherman, I. L.; Miller, L. C.; Robbins, K. R.; Halley, J. T. (1995): Relative biological availability of manganese from manganese proteinate, manganese sulfate, and manganese monoxide in broilers reared at elevated temperatures. *Poult. Sci.* **74**, 702–707.
- Sonoki, T.; Nagasaki, A.; Gotoh, T.; Takiguchi, M.; Takeya, M.; Matsuzaki, H.; Mori, M. (1997): Coinduction of nitric-oxide synthase and arginase I in cultured rat peritoneal macrophages and rat tissues in vivo by lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **272**, 3689–3693.
- Stears, R. L.; Martinsky, T.; Schena, M. (2003): Trends in microarray analysis. *Nat. Med.* **9**, 140–145.

- Strube, M.; Haenen, G. R.; van Den Berg, H.; Bast, A. (1997): Pitfalls in a method for assessment of total antioxidant capacity. *Free Radic. Res.* **26**, 515–521.
- Swarup, G.; Dasgupta, J. D.; Garbers, D. L. (1984): Tyrosine-specific protein kinases of normal tissues. *Adv. Enzyme Regul.* **22**, 267–288.
- Tabor, S.; Richardson, C. C. (1989): Effect of manganese ions on the incorporation of dideoxynucleotides by bacteriophage T7 DNA polymerase and Escherichia coli DNA polymerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 4076–4080.
- Takeda, A. (2003): Manganese action in brain function. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **41**, 79–87.
- Tan, P. K.; Downey, T. J.; Spitznagel, E. L.; Xu, P.; Fu, D.; Dimitrov, D. S.; Lempicki, R. A.; Raaka, B. M.; Cam, M. C. (2003): Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms. *Nucleic Acids Res.* **31**, 5676–5684.
- Taniguchi, M.; Miura, K.; Iwao, H.; Yamanaka, S. (2001): Quantitative Assessment of DNA Microarrays--Comparison with Northern Blot Analyses. *Genomics* **71**, 34–39.
- Thomas, K. W.; Lowther, D. A. (1976): Manganese levels and the morphology of the epiphyseal plate in broilers with slipped tendons. *Poult. Sci.* **55**, 1962–1968.
- Thongphasuk, J.; Oberley, L. W.; Oberley, T. D. (1999): Induction of superoxide dismutase and cytotoxicity by manganese in human breast cancer cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**, 317–327.
- tom Dieck, H.; Döring, F.; Roth, H.-P.; Daniel, H. (2003): Changes in rat hepatic gene expression in response to zinc deficiency as assessed by DNA arrays. *J. Nutr.* **133**, 1004–1010.
- Underwood, E. J.; Suttle, N. F. (1999): *The Mineral Nutrition of Livestock*. 3rd ed. Wallingford: CABI.
- van Bruwaene, R.; Gerber, G. B.; Kirchmann, R.; Colard, J.; van Kerkom, J. (1984): Metabolism of <sup>51</sup>Cr, <sup>54</sup>Mn, <sup>59</sup>Fe and <sup>60</sup>Co in lactating dairy cows. *Health Phys.* **46**, 1069–1082.
- van Kampen, E.; Zijlstra, W. G. (1961): Standardization of hemoglobinometry. II. The hemiglobincyanide method. *Clin. Chim. Acta* **6**, 538–544.
- Velculescu, V. E.; Zhang, L.; Vogelstein, B.; Kinzler, K. W. (1995): Serial analysis of gene expression. *Science* **270**, 484–487.
- Visner, G. A.; Chesrown, S. E.; Monnier, J.; Ryan, U. S.; Nick, H. S. (1992): Regulation of manganese superoxide dismutase: IL-1 and TNF induction in pulmonary artery and microvascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 453–462.
- Visner, G. A.; Dougall, W. C.; Wilson, J. M.; Burr, I. A.; Nick, H. S. (1990): Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response. *J. Biol. Chem.* **265**, 2856–2864.
- Waalkes, M. P.; Klaassen, C. D. (1985): Concentration of metallothionein in major organs of rats after administration of various metals. *Fundam. Appl. Toxicol.* **5**, 473–477.

- Wachtel, L. W.; Elvehjem, C. A.; Hart, E. B. (1943): Studies on the physiology of manganese in the rat. *Am. J. Physiol.* **140**, 72–82.
- Walker, J. E. (1983): Glutamate, GABA, and CNS disease: a review. *Neurochem. Res.* **8**, 521–550.
- Watanabe, H.; Mishina, T.; Ohe, H.; Araki, H.; Nakao, M. (1981): A clustering of prostatic cancer in an area with many manganese mines. *Tohoku J. Exp. Med.* **135**, 441–442.
- Weber, S.; Dorman, D. C.; Lash, L. H.; Erikson, K.; Vrana, K. E.; Aschner, M. (2002): Effects of manganese (Mn) on the developing rat brain: oxidative-stress related endpoints. *Neurotoxicology* **23**, 169–175.
- Wedekind, K. J.; Baker, D. H. (1990): Effect of varying calcium and phosphorus level on manganese utilization. *Poult. Sci.* **69**, 1156–1164.
- Wedler, F. C.; Denman, R. B. (1984): Glutamine synthetase: the major Mn(II) enzyme in mammalian brain. *Curr. Top. Cell. Regul.* **24**, 153–169.
- Wedler, F. C.; Denman, R. B.; Roby, W. G. (1982): Glutamine synthetase from ovine brain is a manganese(II) enzyme. *Biochemistry* **21**, 6389–6396.
- Weigand, E.; Kirchgessner, M.; Helbig, U. (1986): True absorption and endogenous fecal excretion of manganese in relation to its dietary supply in growing rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **10**, 265–278.
- Weisiger, R. A.; Fridovich, I. (1973): Superoxide dismutase. Organelle specificity. *J. Biol. Chem.* **248**, 3582–3592.
- Werner, L.; Korc, M.; Brannon, P. M. (1987): Effects of manganese deficiency and dietary composition on rat pancreatic enzyme content. *J. Nutr.* **117**, 2079–2085.
- White, J. E.; Lin, H. Y.; Davis, F. B.; Davis, P. J.; Tsan, M. F. (2000): Differential induction of tumor necrosis factor alpha and manganese superoxide dismutase by endotoxin in human monocytes: role of protein tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and nuclear factor kappaB. *J. Cell. Physiol.* **182**, 381–389.
- White, M. F.; Haring, H. U.; Kasuga, M.; Kahn, C. R. (1984): Kinetic properties and sites of autophosphorylation of the partially purified insulin receptor from hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **259**, 255–264.
- White CL; Robson AD; Fisher HM (1981): Variation in nitrogen, sulfur, selenium, cobalt, manganese, copper and zinc contents of grain from wheat and two lupin species grown in a range of Mediterranean environments. *Aust. J. Agric. Res.* **32**, 47–59.
- Wilgus, H. S., JR; Norris L. C.; Heuser G. F. (1937): The role of manganese and certain other trace elements in the prevention of perosis. *J. Nutr.* **14**, 155–167.
- Wilkinson, M.; Doskow, J.; Lindsey, S. (1991): RNA blots: staining procedures and optimization of conditions. *Nucleic Acids Res.* **19**, 679.
- Wimhurst, J. M.; Manchester, K. L. (1973): Effects of manganese on the activity of glycolytic and gluconeogenic enzymes in the perfused rat liver. *FEBS Lett.* **29**, 201–203.

- Wise, D. R.; Jennings, A. R.; Bostock, D. E. (1973): Perosis in turkeys. *Res. Vet. Sci.* **14**, 167–172.
- Wong, G. H.; Goedel, D. V. (1988): Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* **242**, 941–944.
- Wu, C. (1963): Glutamine synthetase. I. a comparative study of its distribution in animals and its inhibition by dl-allo-delta-hydroxylysine. *Comp. Biochem. Physiol.* **34**, 335–351.
- Xu, Y.; Kinningham, K. K.; Devalaraja, M. N.; Yeh, C. C.; Majima, H.; Kasarskis, E. J.; St Clair, D. K. (1999): An intronic NF-kappaB element is essential for induction of the human manganese superoxide dismutase gene by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta. *DNA Cell Biol.* **18**, 709–722.
- Yamamoto, H.; Konno, H.; Yamamoto, T.; Ito, K.; Mizugaki, M.; Iwasaki, Y. (1987): Glutamine synthetase of the human brain: purification and characterization. *J. Neurochem.* **49**, 603–609.
- Yang, Y. H.; Speed, T. (2002): Design issues for cDNA microarray experiments. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 579–588.
- Ying, S.-Y. (2004): Complementary DNA libraries: an overview. *Mol. Biotechnol.* **27**, 245–252.
- Yue, H.; Eastman, P. S.; Wang, B. B.; Minor, J.; Doctolero, M. H.; Nuttall, R. L.; Stack, R.; Becker, J. W.; Montgomery, J. R.; Vainer, M.; Johnston, R. (2001): An evaluation of the performance of cDNA microarrays for detecting changes in global mRNA expression. *Nucleic Acids Res.* **29**, E41-1.
- Zelko, I. N.; Mariani, T. J.; Folz, R. J. (2002): Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 337–349.
- Zhu, C. H.; Huang, Y.; Oberley, L. W.; Domann, F. E. (2001): A family of AP-2 proteins down-regulate manganese superoxide dismutase expression. *J. Biol. Chem.* **276**, 14407–14413.
- Zidenberg-Cherr, S.; Keen, C. L.; Lönnnerdal, B.; Hurley, L. S. (1983): Superoxide dismutase activity and lipid peroxidation in the rat: developmental correlations affected by manganese deficiency. *J. Nutr.* **113**, 2498–2504.

## 10 Anhang

Anhangstab. 1: Mittels Flammen-AAS analysierte Mangangehalte (mg/kg) in den Einzelkomponenten der Diäten, in einzelnen Mengen- und Spurenelementverbindungen für die Mineralstoffvormischung, in der Mineralstoffvormischung, in der Manganvormischung und in den Endmischungen der Diäten für die Gruppen I (- Mn) sowie II (+ Mn p.f.) und III (+ Mn a.l.)

Einzelkomponente	Mn (mg/kg)
Maisstärke	0,03 ± 0,00
Casein	0,07 ± 0,01
Cellulose	1,01 ± 0,02
Puderrucker	< NWG
Elementverbindung	
CoSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	< NWG
KCr(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	< NWG
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	1,9
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	16,6
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	105,7
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	< NWG
NaCl	< NWG
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	< NWG
CaCO <sub>3</sub>	< NWG
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	< NWG
CaHPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O *	62,2
Mischungen	
Grundmischung	0,32 ± 0,01
Mineralstoffvormischung	1,95 ± 0,07
Manganvormischung	239,1 ± 3,13
Endmischung Diät für Gruppe I (- Mn)	0,35 ± 0,07
Endmischung Diät für Gruppen II (+ Mn p.f.) und III (+ Mn a.l.)	18,84 ± 0,01

< NWG = unterhalb der Nachweisgrenze

\* wurde wegen des hohen Mangangehaltes nicht verwendet

Anhangstab. 2: Futteraufnahme (g) nach Versuchswoche und Futterverwertung (FV g Futter/g Zunahme) der Ratten über den 6wöchigen Versuchszeitraum

Gruppe	Tier	Futteraufnahme nach Versuchswoche (g)						FV	
		1	2	3	4	5	6	ges.	(g Fu./g Zun.)
I (- Mn)	1	40,5	78,8	90,6	93,8	96,9	86,9	487,4	2,92
	2	66,9	96,1	103,3	101,7	94,3	115,3	577,7	2,47
	3	62,9	90,0	104,7	106,4	103,0	121,9	589,0	2,76
	4	61,9	91,1	102,7	110,4	110,6	115,4	592,0	2,52
	5	64,5	93,6	98,7	104,1	106,7	93,3	560,9	2,64
	6	58,0	81,8	89,4	90,0	95,3	86,5	500,9	2,82
	7	73,7	100,6	97,8	130,4	109,6	110,3	622,3	2,72
	8	29,8	86,9	86,9	116,3	103,4	115,4	538,7	2,68
	9	68,1	97,1	107,2	100,1	97,0	110,6	580,0	2,69
		M	58,5	90,7	97,9	105,9	101,9	106,2	561,0
	SD	14,2	7,2	7,4	12,1	6,2	13,5	44,3	0,14
II (+ Mn p.f.)	10	40,5	78,8	90,6	93,8	100,9	88,1	492,7	2,47
	11	66,9	96,1	99,2	88,9	94,2	95,9	541,2	2,61
	12	62,9	90,0	104,7	96,9	87,8	107,2	549,6	2,49
	13	61,9	91,1	102,7	108,7	106,5	106,1	576,9	2,54
	14	34,3	93,6	98,7	101,7	101,9	94,1	524,3	2,45
	15	58,0	81,8	89,4	90,0	100,2	87,7	507,0	2,48
	16	73,7	100,6	97,8	107,4	95,0	92,2	566,6	2,78
	17	29,8	86,9	86,9	113,0	102,2	96,9	515,7	2,39
	18	68,1	97,1	107,2	86,6	89,0	110,7	558,7	2,58
		M	55,1	90,7	97,5	98,6	97,5	97,6	537,0
	SD	16,0	7,2	7,1	9,6	6,4	8,4	28,7	0,11
III (+ Mn a.l.)	19	75,7	102,1	111,6	103,9	95,2	120,6	609,0	2,52
	20	70,3	101,4	109,3	101,6	85,5	132,5	600,6	2,65
	21	25,5	55,1	80,5	103,2	101,1	93,9	459,3	3,24
	22	72,7	102,8	108,9	101,3	84,5	127,3	597,5	2,67
	23	70,7	103,8	117,7	110,1	73,3	134,8	610,3	2,66
	24	33,4	77,3	95,8	106,2	107,0	117,6	537,3	2,54
	25	72,3	95,5	106,0	106,8	93,0	130,1	603,7	2,45
	26	64,6	90,7	100,9	105,5	98,8	118,1	578,6	2,94
	27	67,9	99,0	115,1	117,8	105,6	127,6	633,0	2,65
		M	61,5	92,0	105,1	106,3	93,8	122,5	596,2
	SD	18,5	16,1	11,4	5,1	11,0	12,4	28,2	0,15

Streichungen = physiologischer Ausreißer

Anhangstab. 3: Lebendmasse (g) und tägliche Zunahmen (g/d) der Ratten über den 6wöchigen Versuchszeitraum

Gruppe	Tier	Lebendmasse (g)							tgl. Zun. (g/d)
		d0	d7	d14	d21	d28	t35	d42	
I (- Mn)	1	44,3	58,0	102,0	135,2	169,8	198,7	211,0	3,97
	2	39,9	86,2	134,2	175,3	208,3	231,0	273,9	5,57
	3	39,7	79,2	124,0	163,4	201,1	228,1	253,4	5,09
	4	38,0	82,9	128,9	172,7	217,1	249,4	272,6	5,59
	5	38,0	85,4	130,1	165,1	205,2	239,6	250,2	5,05
	6	37,2	78,3	115,4	152,0	184,4	209,1	215,0	4,23
	7	37,1	89,0	136,3	176,0	216,2	238,2	265,6	5,44
	8	40,7	56,7	107,7	139,6	190,8	217,8	241,4	4,78
	9	34,7	83,3	133,0	172,8	203,4	228,0	250,1	5,13
		M	38,8	77,7	123,5	161,3	199,6	226,7	248,1
	SD	2,7	12,0	12,3	15,5	15,4	15,8	22,7	0,57
II (+ Mn p.f.)	10	42,7	60,5	101,4	138,4	177,0	211,7	242,0	4,75
	11	40,3	75,1	120,0	159,0	191,2	215,1	247,3	4,93
	12	39,6	79,4	126,3	165,7	201,4	219,3	260,3	5,25
	13	38,1	78,0	122,6	162,0	208,5	230,7	265,0	5,40
	14	40,5	47,4	103,3	148,6	190,5	218,2	254,9	5,10
	15	37,5	70,5	110,2	144,8	180,5	210,1	241,8	4,86
	16	36,5	78,7	128,8	151,0	194,2	215,5	240,3	4,85
	17	35,5	48,7	101,6	143,1	189,8	219,8	250,9	5,13
	18	34,0	75,1	124,6	166,5	188,3	205,3	250,7	5,16
		M	38,3	68,2	115,4	153,2	191,3	216,2	250,4
	SD	2,7	12,8	11,3	10,4	9,6	7,2	8,6	0,21
III (+ Mn a.l.)	19	41,6	91,3	142,0	185,8	221,8	244,5	283,5	5,76
	20	40,5	90,0	141,5	179,1	209,4	225,5	266,9	5,39
	21	39,5	25,6	60,2	102,7	139,6	174,1	<del>181,2</del>	<del>3,37</del>
	22	38,6	85,7	133,3	173,1	202,8	218,8	262,0	5,32
	23	37,7	85,5	136,2	181,5	215,5	217,2	267,1	5,46
	24	37,5	45,4	91,7	136,8	180,5	219,0	249,1	5,04
	25	36,3	88,8	137,3	180,6	220,1	244,4	282,3	5,86
	26	35,9	77,2	123,0	159,3	194,5	212,4	233,0	4,69
	27	33,6	79,6	128,7	173,8	212,8	237,5	272,3	5,68
		M	37,9	74,3	121,5	163,6	199,7	221,5	264,5
	SD	2,5	23,0	27,7	27,3	26,1	21,5	16,8	0,39

Streichungen = physiologischer Ausreißer

Anhangstab. 4: Hämatokrit (HK %), Hämoglobin (Hb g/dl) und Blutglucose (mg/dl) der Ratten nach 6 Versuchswochen

Gruppe	Tier	HK (%)	Hb (g/dl)	Glucose (mg/dl)
I (- Mn)	1	44,7	14,1	66,5
	2	41,0	12,6	91,5
	3	43,0	12,8	87,0
	4	45,3	13,7	84,0
	5	45,0	14,2	102,5
	6	47,3	14,8	93,0
	7	45,0	13,8	90,5
	8	45,3	14,0	66,0
	9	45,3	14,5	71,5
		M	44,7	13,8
	SD	1,8	0,7	12,8
II (+ Mn p.f.)	10	51,3	15,7	69,5
	11	46,7	14,1	59,0
	12	46,7	14,6	97,0
	13	46,0	14,2	77,5
	14	43,7	14,3	87,0
	15	45,3	14,6	70,5
	16	49,7	15,5	74,0
	17	46,0	14,2	78,5
	18	46,7	14,7	95,0
		M	46,9	14,7
	SD	2,3	0,6	12,4
III (+ Mn a.l.)	19	47,7	15,8	87,5
	20	46,0	14,3	92,0
	21	43,0	13,4	82,0
	22	45,0	14,5	65,5
	23	45,3	14,5	80,5
	24	46,7	15,4	63,5
	25	46,3	14,5	70,5
	26	50,0	15,6	49,5
	27	48,0	15,4	69,5
		M	46,4	14,8
	SD	2,0	0,8	13,3

Anhangstab. 5: Mangankonzentrationen in Leber (mg/kg FM), Femur ( $\mu\text{g/kg FM}$ ) und Plasma ( $\mu\text{g/l}$ ) der Ratten nach 6 Versuchswochen und im Vergleich dazu in der Leber der  $t_0$ -Gruppe zu Versuchsbeginn

Gruppe	Tier	Leber-Mn	Femur-Mn	Plasma-Mn	Leber-Mn	
		(mg/kg FM)	( $\mu\text{g/kg FM}$ )	( $\mu\text{g/l}$ )	Tier	(mg/kg FM)
I (- Mn)	1	0,24	76,2	1,45	$t_0$ 28	2,23
	2	0,16	65,4	<del>8,21</del>	$t_0$ 29	2,08
	3	0,16	65,2	1,19	$t_0$ 30	1,82
	4	0,16	48,2	1,47	$t_0$ 31	1,93
	5	0,19	55,9	1,11	$t_0$ 32	1,65
	6	0,28	52,8	2,44	$t_0$ 33	1,86
	7	0,17	59,2	0,83	$t_0$ 34	1,99
	8	0,20	71,6	0,95	$t_0$ 35	1,88
	9	0,17	61,2	1,14	$t_0$ 36	1,80
		M	0,19	61,7	1,32	M
	SD	0,04	8,9	0,50	SD	0,17
II (+ Mn p.f.)	10	1,78	267,5	7,03		
	11	2,08	275,4	6,38		
	12	1,77	238,2	6,04		
	13	1,94	259,9	6,69		
	14	2,37	254,2	5,39		
	15	2,13	241,1	5,73		
	16	1,73	289,9	6,38		
	17	1,75	225,7	7,74		
	18	1,92	245,3	4,71		
		M	1,94	255,2	6,23	
	SD	0,22	20,1	0,90		
III (+ Mn a.l.)	19	1,82	257,7	6,07		
	20	1,95	275,2	8,13		
	21	1,68	227,9	5,59		
	22	1,98	244,3	5,54		
	23	1,81	233,3	4,44		
	24	1,58	<del>803,9</del>	8,41		
	25	1,88	242,3	5,90		
	26	1,75	232,0	5,56		
	27	1,90	224,2	3,31		
		M	1,82	242,1	5,88	
	SD	0,13	17,1	1,60		

Streichungen = analytische Ausreißer

Anhangstab. 6: Mineralstoffkonzentrationen im Lebergewebe der Ratten nach 6 Versuchswochen

Gruppe	Tier	Leber-Fe (mg/kg FM)	Leber-Zn (mg/kg FM)	Leber-Cu (mg/kg FM)
I (- Mn)	1	106,40	32,93	5,46
	2	104,14	29,20	4,52
	3	106,80	31,56	5,20
	4	152,01	34,02	4,87
	5	88,52	33,56	6,12
	6	93,82	32,71	4,66
	7	113,62	28,27	5,11
	8	95,28	32,70	4,79
	9	129,51	34,90	4,97
		M	110,01	32,21
	SD	19,86	2,19	0,49
II (+ Mn p.f.)	10	79,94	32,05	5,36
	11	80,83	30,27	5,08
	12	94,09	28,08	4,75
	13	112,22	29,55	4,53
	14	80,98	32,44	5,01
	15	169,24	32,85	4,91
	16	79,08	29,17	4,47
	17	86,81	28,10	4,85
	18	90,83	30,25	4,11
		M	97,11	30,31
	SD	29,01	1,79	0,37
III (+ Mn a.l.)	19	84,65	28,28	4,50
	20	165,12	29,87	4,36
	21	187,32	37,38	7,45
	22	78,84	33,82	5,34
	23	89,65	28,20	4,76
	24	99,19	32,67	6,28
	25	78,94	29,44	4,68
	26	121,37	33,36	4,47
	27	85,26	26,55	4,59
		M	110,04	31,06
	SD	40,11	3,46	1,05

Anhangstab. 7: Mineralstoffkonzentrationen im Femur der Ratten nach 6 Versuchswochen

Gruppe	Tier	Femur-Ca (g/kg)	Femur-Mg (g/kg)	Femur-P (g/kg)	Femur-Fe (mg/kg)	Femur-Zn (mg/kg)
I (- Mn)	1	100,06	1,83	53,13	39,72	123,56
	2	87,56	1,86	46,92	43,61	110,74
	3	72,01	1,58	41,18	40,83	95,41
	4	76,65	1,47	42,02	39,97	88,95
	5	87,02	1,58	42,64	43,75	103,48
	6	91,44	1,62	43,25	39,86	98,89
	7	95,96	1,66	46,67	40,75	114,92
	8	90,49	1,74	45,40	42,61	107,49
	9	89,58	1,59	42,06	39,07	102,74
		M	87,86	1,66	44,81	41,13
	SD	8,76	0,13	3,76	1,75	10,46
II (+ Mn p.f.)	10	95,66	1,59	48,14	37,24	117,22
	11	95,78	1,73	47,80	40,68	103,52
	12	86,77	1,58	44,12	45,51	95,56
	13	92,73	1,70	45,84	39,87	106,02
	14	80,10	1,45	40,04	41,53	89,84
	15	89,12	1,72	43,51	48,05	105,80
	16	93,72	1,81	45,41	39,77	111,22
	17	82,16	1,48	40,24	39,13	94,20
	18	86,81	1,62	42,94	40,12	105,83
		M	89,21	1,63	44,23	41,32
	SD	5,72	0,12	2,91	3,37	8,67
III (+ Mn a.l.)	19	92,60	1,86	46,28	46,17	99,12
	20	93,71	1,75	43,96	44,37	93,66
	21	72,85	1,48	36,59	42,70	88,22
	22	91,21	1,76	44,26	39,82	98,09
	23	79,09	1,56	40,93	39,07	89,73
	24	83,84	1,51	44,78	36,48	106,42
	25	98,42	1,77	48,64	51,81	104,96
	26	83,65	1,67	42,05	45,30	96,28
	27	70,20	1,50	37,47	35,37	83,43
		M	85,06	1,65	42,77	42,34
	SD	9,73	0,14	3,95	5,21	7,62

Anhangstab. 8: MnSOD-Aktivität im Lebergewebe der Ratten nach 6 Versuchswochen

Gruppe	Tier	Marklund-Methode		Crapo-Methode	
		MnSOD (U/mg Prot.)	MnSOD (U/mg FM)	MnSOD (U/mg Prot.)	MnSOD (U/mg FM)
I (- Mn)	1	1,49	0,34	5,32	1,21
	2	2,35	0,44	4,75	0,89
	3	1,84	0,44	3,20	0,77
	4	1,83	0,35	4,72	0,90
	5	2,38	0,48	4,50	0,90
	6	2,03	0,48	3,03	0,71
	7	2,53	0,49	<del>11,34</del>	<del>2,20</del>
	8	1,22	0,28	2,77	0,63
	9	2,30	0,34	6,63	0,99
		M	2,00	0,40	4,37
	SD	0,44	0,08	1,31	0,18
II (+ Mn p.f.)	10	2,70	0,46	6,62	1,14
	11	3,20	0,63	5,05	1,00
	12	2,37	0,47	6,93	1,39
	13	2,84	0,49	7,26	1,25
	14	2,17	0,43	8,38	1,67
	15	2,44	0,44	6,11	1,10
	16	2,60	0,56	5,88	1,26
	17	3,12	0,51	9,53	1,57
	18	2,82	0,45	9,45	1,52
		M	2,70	0,50	7,25
	SD	0,34	0,07	1,58	0,23
III (+ Mn a.l.)	19	2,93	0,55	3,89	0,72
	20	2,45	0,52	6,44	1,37
	21	2,63	0,57	5,74	1,25
	22	2,24	0,51	7,71	1,75
	23	3,14	0,66	7,95	1,67
	24	2,24	0,46	8,08	1,67
	25	1,79	0,42	<del>9,43</del>	<del>2,19</del>
	26	2,12	0,46	<del>10,84</del>	<del>2,37</del>
	27	2,83	0,57	5,89	1,18
		M	2,49	0,52	6,53
	SD	0,43	0,07	1,52	0,36

Streichungen = analytische Fehler

Anhangstab. 9: Densitometrische Auswertung der nativen MnSOD-PAGE mit jeweils 40 µg bzw. 80 µg Protein und Arginaseaktivität im Lebergewebe der Ratten nach 6 Versuchswochen

Gruppe	Tier	native PAGE der MnSOD		Arginase-Aktivität	
		40 µg Prot. (OD/mm <sup>2</sup> )	80 µg Prot. (OD/mm <sup>2</sup> )	(U/mg FM)	(U/mg Protein)
I (- Mn)	1	11334	13329	2,04	14,99
	2	12398	17645	2,02	17,64
	3	13508	19995	2,38	16,88
	4	14083	17158	1,98	15,98
	5	8987	11649	2,56	17,99
	6	9902	15604	2,66	19,85
	7	6480	10241	2,07	15,62
	8	9545	11546	1,59	14,51
	9	6431	10234	1,94	16,21
		M	10296	14155	2,14
	SD	2786	3568	0,33	1,66
II (+ Mn p.f.)	10	13435	14762	2,01	15,40
	11	7009	8649	2,80	19,08
	12	8122	11466	2,37	21,27
	13	7467	10922	2,30	18,81
	14	11151	15838	2,45	18,21
	15	13752	17522	2,38	17,34
	16	15599	17413	2,20	17,80
	17	6454	9830	2,15	13,94
	18	13670	16278	2,69	22,74
		M	10740	13631	2,37
	SD	3510	3426	0,25	2,69
III (+ Mn a.l.)	19	16542	23238	2,43	18,93
	20	12242	16474	2,39	19,15
	21	15746	18571	2,21	17,96
	22	6428	9925	2,24	17,25
	23	8270	10519	2,18	15,54
	24	9313	12484	2,46	16,62
	25	5314	9374	2,77	21,03
	26	6072	8361	2,70	20,95
	27	5538	7874	2,11	17,30
		M	9496	12980	2,39
	SD	4360	5300	0,23	1,88

Anhangstab. 10: Totaler antioxidativer Status in mM TEAC (Trolox Equivalent Antioxidative Capacity) und in prozentualer kompetitiver Hemmung der Radikalbildung im Vergleich zum Blindwert nach 2 min bzw. 3 min Inkubation im Lebergewebe der Ratten nach 6 Versuchswochen

Gruppe	Tier	TAOS 2 min (mM TEAC)	TAOS 3 min (mM TEAC)	TAOS 2 min (% Hemmung)	TAOS 3 min (% Hemmung)
I (- Mn)	1	201	371	18,0	23,6
	2	154	291	23,1	29,9
	3	166	333	24,1	31,1
	4	157	311	20,1	25,5
	5	207	392	24,7	30,0
	6	192	369	21,8	29,9
	7	216	411	19,6	26,1
	8	211	403	19,2	26,1
	9	226	430	18,8	25,3
		M	192	368	21,0
	SD	27	47	2,4	2,7
II (+ Mn p.f.)	10	241	440	20,9	26,4
	11	186	349	19,3	25,9
	12	234	440	21,9	28,8
	13	244	458	21,4	28,3
	14	206	375	23,0	30,2
	15	249	441	24,7	30,9
	16	217	430	21,1	28,1
	17	196	376	20,7	27,1
	18	193	376	21,9	29,1
		M	218	409	21,7
	SD	24	40	1,5	1,7
III (+ Mn a.l.)	19	189	364	22,0	28,9
	20	208	380	25,7	32,5
	21	215	413	20,8	26,4
	22	211	399	15,6	20,6
	23	223	428	16,9	23,7
	24	224	426	15,9	22,1
	25	259	477	21,5	28,0
	26	192	377	19,3	26,2
	27	137	256	13,3	17,7
		M	207	391	19,0
	SD	33	61	3,9	4,6

Anhangstab. 11: Metallothioneinkonzentration und Thiobarbitursäure reaktive Substanzen (TBA-RS) im Lebergewebe der Ratten nach 6 Versuchswochen

Gruppe	Tier	Metallothionein		TBA-RS
		( $\mu\text{g/g FM}$ )	( $\mu\text{g/g Prot.}$ )	( $\text{nmol/g FM}$ )
I (- Mn)	1	19,3	142,4	34,2
	2	22,8	198,5	84,3
	3	21,6	152,8	87,8
	4	37,2	299,9	59,4
	5	28,9	203,4	93,4
	6	33,1	246,8	85,9
	7	32,2	243,5	65,2
	8	44,5	405,2	81,9
	9	39,4	329,8	70,5
		M	31,0	246,9
	SD	8,6	85,7	18,6
II (+ Mn p.f.)	10	19,6	150,6	50,1
	11	17,5	119,2	46,4
	12	13,1	117,4	96,2
	13	17,1	139,6	32,8
	14	20,1	149,7	76,7
	15	22,0	159,8	58,5
	16	16,3	132,4	103,0
	17	13,6	88,0	86,5
	18	13,4	113,4	66,5
		M	17,0	130,0
	SD	3,2	22,7	23,9
III (+ Mn a.l.)	19	14,0	109,3	40,6
	20	15,1	121,1	101,2
	21	<del>57,1</del>	<del>463,3</del>	52,6
	22	26,2	202,2	73,8
	23	14,2	100,9	75,1
	24	37,3	251,9	96,0
	25	8,8	66,6	86,9
	26	25,5	198,3	66,1
	27	14,6	119,9	86,6
		M	19,5	146,3
	SD	9,4	63,4	19,9

Streichungen = physiologischer Ausreißer

# Danksagung

*“Basic research is like shooting an arrow into the air  
and, where it lands, painting a target.”  
Homer Burton Adkins (1892-1949)*

Ich bedanke mich bei allen, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich danke herzlich meinem betreuenden Hochschullehrer, Herrn Prof. Dr. Josef Pallauf, für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die Diskussions- und Hilfsbereitschaft während der Durchführung der Untersuchungen und der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Edgar Weigand danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Allen Mitgliedern der Prüfungskommission möchte ich für eine angenehme Disputation danken.

Mein besonderer Dank gilt meinem langjährigen Gegenüber, Herrn Juniorprof. Dr. Andreas Müller, für seine Anregungen und seine engagierte Unterstützung bei der molekulargenetischen Analytik sowie für den stets freundschaftlichen Gedankenaustausch.

Frau Dr. Erika Most danke ich für die überaus kompetente und freundschaftliche Unterstützung bei analytischen Fragestellungen und für die schöne gemeinsame Zeit bei der Betreuung der Laborpraktika.

Herrn Prof. Dr. Othmar P. Walz danke ich für seine immerwährende Bereitschaft zum konstruktiven Dialog.

Herrn Dr. Christian Kauer danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit bei der Prüfung, Etablierung und Durchführung zahlreicher enzymatischer Bestimmungsmethoden.

Ich danke allen technischen Mitarbeitern, die mich im Rahmen ihrer jeweiligen Spezialgebiete bei der Realisierung des praktischen Teils dieser Arbeit unterstützt haben:

bei der Mineralstoffanalytik: Martina Schneider, Frauke Frank und Silke Hees

im biochemischen Labor: Anja Marx, Nicole Krämer und Susanne Breitstadt

bei der Weenderanalyse: Helmut Henzel

im Stoffwechsellabor: Steffen Brückel

bei technischen Fragen aller Art: Marco Jäger, Christian Spangenberg und Andreas Breitstadt.

All meinen ehemaligen Kollegen am Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie danke ich nochmals für die schöne gemeinsame Zeit.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern, Renate und Werner Brandl, und meiner Frau Michi für die immerwährende, geduldige Unterstützung sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts aus ganzem Herzen danken.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**

