

Center for Biomolecular Interactions Bremen

**Untersuchungen zur Zink-modulierten  
Signaltransduktion in Säugerzellen:**

**Die Auswirkungen von Signalwegen auf die Zinkhomöostase**

**Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
- Doctor rerum naturalium -

Vorgelegt dem Fachbereich 2 Biologie/Chemie  
Der Universität Bremen

Von  
**Sven Jansen**

Oktober 2004

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>I</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1 Biochemische Relevanz von Zink	3
2.2 Zinkverteilung und Homöostase im Gewebe	5
2.3 Zinktransport	6
2.3.1 Die ZnT-Proteine	7
2.3.2 Die ZIP-Familie	11
2.3.3 Kationen Transporter	12
2.3.4 Der Na/Zn-Austauscher	13
2.3.5 Zinkaufnahme mittels Ionophoren	13
2.3.5.1 Natrium-Pyrithion	13
2.3.5.2 Der Calcium Ionophor A23187	13
2.3.6 Inhibition des Zinkexports	14
2.4 Intrazelluläre Zinkverteilung	15
2.4.1 Zinkspezifische Fluoreszenzsonden	15
2.4.1.1 Fura-2	16
2.4.1.2 TSQ und Zinquin	16
2.4.1.3 Newport Green	17
2.4.1.4 Zinpyr	17
2.4.2 Metallothionein (MT)	17
2.5 Physiologische Funktionen von Zink	20
2.5.1 Toxizität von Zink	20
2.5.2 Funktionen von Zink bei der Proliferation	20
2.5.3 Funktionen von Zink bei der Differenzierung	21
2.5.4 Antioxidative Wirkung von Zinkionen	21
2.5.5 Zink und Zelltod	21
2.5.5.1 Zink und Apoptose	22
2.5.6 Zink und Sport	25
2.5.6.1 Zink als Nahrungsergänzungsmittel im Sport	27
2.5.7 Der Einfluss von Zink auf neuronale Prozesse	29
2.5.7.1 Zink als Neuromodulator	29
2.5.7.2 Zink und Neurodegeneration	29
2.5.7.3 Zink und Epilepsie	30
2.5.7.4 Zink und Down Syndrom	31
2.5.8 Der Einfluss von Zink auf Signaltransduktionswege	32
2.5.8.1 Zinkeinfluss auf die Phosphorylierung des Epidermal Growth Factors Receptor (EGFR)	32
2.5.8.2 Zinkeinfluss auf den Insulin-Signalweg	34
2.5.8.3 Ca/Zn-Crosstalk	34
2.5.8.4 Der Zinc-sensing Receptor (ZnR)	35
2.5.9 Zinkeinfluss auf das Immunsystem	36
2.5.10 Zink und Alzheimer Disease	36
2.5.11 Zink und Alterung	39
2.6 Fragestellung	41

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
	3.1 Cytotoxizität von ZnCl <sub>2</sub>	42
	3.1.1 Neutralrottest	42
	3.1.2 DNA-Fragmentierung	44
	3.1.3 Einfluss des Calcium Ionophors A23187 auf die zinkinduzierte Apoptose	46
	3.2. Zinkaufnahme in C6-Zellen	50
	3.3 Modulation des cGMP-PKG Signalwegs	52
	3.3.1 Der Einfluss von NO auf den intrazellulären Zinkgehalt	52
	3.3.2 Der Einfluss der Inhibition der GC auf den intrazellulären Zinkgehalt	63
	3.3.3 Der Einfluss eines cGMP-Analogons auf den zellulären Zinkgehalt	64
	3.4 Modulation des cAMP-PKA Signalwegs	66
	3.4.1 Der Einfluss von Sp-5,6-DCl-cBIMPS auf den zellulären Zinkgehalt	67
	3.4.2 Der Einfluss von 8-Bromo-cAMP auf den zellulären Zinkgehalt	67
	3.5 Der Einfluss der Inhibition der Cyclonukleotid Phosphodiesterasen auf den zellulären Zinkgehalt	68
	3.6 Modulation der Phospholipase C-Aktivität	70
	3.7 Modulation der PKC-Aktivität und des freien cytosolischen Ca <sup>2+</sup> -Gehaltes	80
	3.7.1 Der Einfluss von intrazellulärer Calcium-Freisetzung durch Thapsigargin auf den zellulären Zinkgehalt	80
	3.7.2 Der Einfluss des PKC-Aktivators TPA auf den zellulären Zinkgehalt	82
	3.7.3 Der Einfluss des PKC-Inhibitors Calphostin C auf den zellulären Zinkgehalt	83
	3.8 Untersuchungen zum Zinc-sensing Receptor	84
	3.9 Der Einfluss von Translation und Histon-Acetylierung auf den zellulären Gesamtzinkgehalt in C6-Zellen	88
	3.9.1 Der Einfluss einer direkten Translations-Inhibition auf den Gesamtzinkgehalt	88
	3.9.2 Der Einfluss einer erhöhten Histon-Acetylierung auf den Gesamtzinkgehalt	89
	3.10 Zusammenfassung der Ergebnisse	91
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>94</b>
	4.1 Cytotoxische Wirkungen von Zink	94
	4.2 Zelluläre Zinkaufnahme	95
	4.3 Signaltransduktion und Zinkaufnahme	96
	4.4 Ausblick	110
<b>5.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>115</b>
	5.1 Material	115
	5.1.1 Chemikalien	115
	5.1.2 Geräte	119

---

5.2 Methoden	121
5.2.1 Zellkultur	121
5.2.2 Untersuchungen zur Cytotoxizität in C6-Zellen	124
5.2.2.1 Untersuchungen zur chronischen Zinktoxizität in C6-Glioma-Zellen	126
5.2.3 Fluoreszenzspektrometrie	128
5.2.3.1 Fluoreszenzmessungen für Inkubationsversuche mit Zink	128
5.2.3.2 Fluoreszenzmessungen für Inkubationsversuche mit Calcium	130
5.2.3.3 Fluoreszenzmessungen zur indirekten Identifikation des ZnR's	130
5.2.4 DNA-Extraktion und Agarose-Gelelektrophorese	131
5.2.5 Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)	132
5.2.5.1 Probenaufarbeitung für die Flammen-AAS	134
5.2.6 Proteinbestimmung	134
5.2.7 Mikroskopie	135
5.2.7.1 Phasenkontrastmikroskopie	135
5.2.8 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie	136
5.2.9 Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)	136
5.2.10 Massenspektrometrie	137
5.2.10.1 Electrospray Ionisation Mass-Spectrometry	137
5.2.11 Statistik	138
<b>6. Literatur</b>	<b>139</b>
<b>7. Eigene Publikationen</b>	<b>167</b>
<b>8. Kongressbeiträge</b>	<b>168</b>
<b>9. Curriculum vitae</b>	<b>169</b>
<b>10. Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>170</b>

---

## Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Professor Dr. Detmar Beyersmann für seine immer hilfsbereite und freundliche Betreuung meiner Dissertation.

Weiterhin danke ich der gesamten Arbeitsgruppe für die außergewöhnlich angenehme Arbeitsatmosphäre und insbesondere Herrn Jürgen Arning und Herrn Dr. Ulf Meyer-Grahle für zahlreiche, weiterführende Gespräche und Diskussionen, sowie Frau Monika Cox für die uneingeschränkte Unterstützung in allen technischen und labor-alltäglichen Fragen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung und Verständnis mir das Biologiestudium gar nicht möglich gewesen wäre.

Ebenso gilt mein Dank meiner Freundin Janina Sonnemann für die mir entgegengebrachte Geduld und Hilfe während des Entstehens dieser Arbeit.

Auch möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Michael Koch für die vielen intradisziplinären Gespräche danken, durch die immer wieder unterschiedliche Herangehensweisen an Themen gefunden werden konnten.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Dorit Kemken und Herrn Dr. Thomas Dülcks für die mir entgegengebrachte Hilfe bei der Durchführung der Massenspektrometrie bedanken.

*Last but not least* gehört mein Dank Herrn Dr. Hajo Haase, der mich durch seine Anregungen erst an das Gebiet der Zinkforschung herangeführt hat.

## Abkürzungen

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
AC	Adenylat-Cyclase
AD	<i>Alzheimer Disease</i> ; Alzheimer Krankheit
ADP	Adenosindiphosphat
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i> ; apoptoseindizierender Faktor
ApoE	Apolipoprotein E
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methylsoxazol-4-Propionsäure
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i> ; akutes Atemnotsyndrom
ATP	Adenosinriphosphat
$\alpha$ 2M	$\alpha$ -2-Makroglobulin
BCA	<i>Bicinchonic acid</i> ; Bicinchoninsäure
Bp	Basenpaare
cAMP	3'-5'- cyclisches Adenosinonophosphat
cGMP	3'-5'- cyclisches Guanosinmonophosphat
CaR	<i>Calcium-sensing receptor</i> ; calciumsensitiver Rezeptor
DCT	<i>Divalent Cation Transporter</i> ; Transporter von divalenten Kationen
CDF	<i>Cation Diffusion Facilitator</i> ; Transporter, der die Kationdiffusion ermöglicht/erleichtert
CHO cells	<i>Chinese Hamster Ovary cells</i> ; Ovarzellen des chinesischen Hamsters
CHX	Cycloheximid
DAG	Diacylglycerol
DC	Dünnschichtchromatographie
2D-DC	Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie
DIDS	4,4'-Diiso-thiocyanatostilben-2,2' disulfonsäure
DMEM	<i>Dulbeccos modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
CQ	Clioquinol
ds	<i>double-stranded</i> ; Doppelstrang
DS	<i>Down Syndrome</i>
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> ; Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> ; Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors
EGTA	Ethylenglycoldiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum

ESI-MS	<i>Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i>
FKS	Fötale Kälber Serum
FT	<i>Fast Twitch</i> ; schnellkontrahierende Muskulatur
Fura-2	1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-2oxyl-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Fura-2/AM	Acetoxymethylester von Fura-2
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GABA	<i>γ-Aminobutyric acid</i> ; <i>γ</i> -Aminobuttersäure
GC	Guanylat-Cyclase
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> ; grünfluorezierendes Protein
HaCat	<i>Human Keratinocyte cell line</i> ; Humane Keratinozyten
HEK293	<i>human embryonic kidney cell line</i> ; humane, embryonale Nierenzellen
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HDL	high density lipoprotein; Lipoprotein hoher Dichte (Cholesterinart)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> ; hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
HT29-C1	<i>Human Colon Carcinoma cell line</i> ; humane Dickdarmkrebszellen
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
IC <sub>50</sub>	<i>Inhibitory Concentration (50%)</i> ; Konzentration, bei der zu 50% ein inhibitorischer Effekt auftritt
IGF	<i>Insulin like Growth Factor</i> ; insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IGFR	<i>Insulin like Growth Factor Receptor</i> ; Rezeptor des insulinähnlichen Wachstumsfaktors
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
Irt	<i>Iron-regulated Transporter</i> ; eisenregulierter Transporter
IUB	<i>International Union of Biochemistry</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> ; Lipoprotein geringer Dichte (Cholesterinart)
LTCC	<i>L-type Calcium Channels</i> ; L-Typ Calciumkanäle
LY83583	6-Anilinoquinoline-5,8-Quinone
<i>m</i> -3M3FBS	2,4,6-trimethyl- <i>N</i> -(meta-3-trifluoromethyl-phenyl) benzenesulfonamide
MFF	<i>Metal Fume Fever</i> ; Metallrauch-Fieber/Vergiftung
MT	Metallothionein
MTF-1	Metallregulierter Transkriptionsfaktor 1
MRE	<i>Metal Response Element</i> ; Metall-responsives Element
MS	<i>Mass Spectrometry</i> ; Massenspektrometrie

m/z	Verhältnis von Masse/Ladung in der Massenspektrometrie ( <i>mass-to-charge ratio</i> )
NHK	<i>Normal Human epidermal Keratinocytes</i> ; humane, epidermale Keratinozyten
NMDA	<i>N-Methyl-D-aspartic Acid</i> ; N-Methyl-D-Asparaginsäure
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> ; Kernresonanzspektroskopie
NO	<i>Nitric Oxide</i> ; Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NP <sub>40</sub>	Nonidet P <sub>40</sub> (nichtionisches Detergenz)
<i>o</i> -3M3FBS	2,4,6-trimethyl- <i>N</i> -(ortho-3-trifluoromethyl-phenyl) benzenesulfonamide
ORF	<i>Open Reading Frame</i> ; offenes Leseraster
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PDE	Cyclonukleotid-Phosphodiesterase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
ppb	<i>parts per billion</i> ; ein Teil in einer Million
Pp <sub>i</sub>	Diphosphat
PTP	Phosphotyrosin-Phosphatase
PP	Protein-Phosphatase
RDA	<i>Recommended Daily Allowance</i> ; empfohlene tägliche Aufnahme
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> ; Ribonukleinsäure
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i> ; reaktive Stickstoffspezies
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> ; reaktive Sauerstoffspezies
RP	<i>Reversed Phase</i> ; Umkehrphase in der HPLC
rpm	<i>rotations per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RSA	Rinderserumalbumin
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> ; Natrium Dodecylsulfat
SNOC	S-Nitosocystein
SNOG	S-Nitrosogluthathion
SOD	Superoxiddismutase
Sp-5,6-DCI-cBIMPS	Sp-5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole-3',5'-cyclic-monophosphothioate
Sp-8-pCPT-cGMPS	Sp-8-para-chloro-phenylthio-cGMP
ss	<i>single-stranded</i> ; Einzelstrang
ST	<i>Slow Twitch</i> ; langsamkontrahierende Muskulatur



---

TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> ; Dünnschichtchromatographie
TPA	12-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TPEN	N,N,N',N'-tetrakis-(2-pyridylmethyl)-ethylenediamine
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Trichostatin A
TSH	Thyreotropes Hormon
TSQ	6-methoxy-8- <i>p</i> -toluenesulfonamido-quinoline
U73122	1-[6-((17 $\beta$ -3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)-amino)hexyl]-1H-pyrrol-2,5-dion
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultra Violett
ZIP	<i>Zrt-/Irt-like Protein</i> ; Zrt-/Irt-ähnliches Protein
ZnR	<i>Zinc-sensing receptor</i> ; zinksensitiver Rezeptor
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZnT	Zinktransporterprotein
Zinquin-A	2-methyl-8- <i>p</i> -toluenesulphonamido-6-quinolyloxy acetic acid; die freie Säure von Zinquin
Zinquin-E	Ethylester von Zinquin
Zrt	<i>Zinc-regulated transporter</i> ; zinkregulierter Transporter

## 1. Zusammenfassung

Zink ist als divalentes Kation ein essentielles Spurenelement und wird als regulatorischer Bestandteil einer immer größer werdenden Anzahl von Proteinen erkannt. Da Zink Transkriptionsfaktoren und Enzyme reguliert sowie steuernd in Differenzierung, Proliferation und Zelltod eingreift, wird eine „second messenger“-Funktion von Zink diskutiert. Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit der Einfluss von Zinkionen auf intrazelluläre Signalwege untersucht werden. Das Hauptaugenmerk wurde dabei auf den enzymmodulierten Zinkim- und -export sowie die Auslösung von programmiertem Zelltod durch Zink in C6 Ratten-Gliomazellen gerichtet. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche zur Zinkaufnahme wurden mit der Atom-Absorptionsspektroskopie untersucht. Diese Experimente konnten zeigen, dass der Calcium-Ionophor A23187 ebenfalls Zinkionen transportiert und dadurch den intrazellulären Zinklevel signifikant erhöht. Durch diese Zinkaufnahme wird Apoptose bei Zinkkonzentrationen induziert, die alleine nicht in der Lage sind, programmierten Zelltod auszulösen. Apoptotischer Zelltod wurde mit Hilfe der charakteristischen DNA-Fragmentation („DNA-Leiter“) in der Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen. Fluoreszenzmessungen mit der zinkspezifischen Fluoreszenzsonde Zinquin konnten die Ergebnisse zur Zinkaufnahme bestärken. Untersuchungen von Signalwegen brachten einen Hinweis auf die Beteiligung von Phosphodiesterasen und der Phospholipase C bei Zinkimport- sowie -export-Mechanismen. Die Inhibition der Phosphodiesterasen mit Hilfe von IBMX zeigte eine deutliche Verminderung des Gesamtzinkgehalts. Eine Aktivierung der PLC mittels Imipramine und ADP führte zu einem signifikanten Abfall des zellulären Gesamtzinkgehalts, eine Inhibition durch Neomycin und U73122 hingegen, resultierte in einem deutlichen Anstieg des Gesamtzinkgehalts. Fraglich ist weiterhin das Ausmaß der Beteiligung von cAMP und der PKA am zellulären Zinktransport. Eine Beteiligung von cGMP, Calcium, der Proteinkinase C und G sowie der Guanylat-Cyclase konnte für diesen Mechanismus hingegen nicht gefunden werden.

Ferner wurde geprüft, ob die hier verwendeten C6-Zellen über einen zinkbindenden, extrazellulären Zelloberflächenrezeptor verfügen, der spezifisch durch Zinkionen aktiviert wird und durch die intrazelluläre Freisetzung von Calciumionen die Zinkhomöostase beeinflussen kann. Versuche in C6-Zellen zeigten im Gegensatz zu A459-Zellen keine Anhaltspunkte für einen solchen „Zinc-sensing receptor“.

Methodische Ergebnisse dieser Arbeit konnten zum einen zeigen, dass SH-Gruppen-enthaltende Reagenzien in der Lage sind, dem sich bereits gebildeten Zink/Zinquin-Komplex das Metallion wieder zu entziehen. Durch diesen Umstand kommt es zu einer deutlichen Reduktion der Fluoreszenz und einer eingeschränkten Verwendbarkeit von Zinquin. Zum anderen zeigten chromatographische und spektrometrische Untersuchungen des PLC-Aktivators m-3M3FBS, eine durch Autofluoreszenz und UV-induzierten Zerfall bedingte Einschränkung bei dessen fluorimetrischen Nutzung.

## Summary

Zinc, as a divalent cation, is an essential trace element and fulfils a regulatory function in a frequently growing number of proteins. Because zinc is known to directly regulate and modulate the activity of transcription factors and enzymes as well as playing a crucial role in differentiation, proliferation and apoptotic cell death, a second messenger function for this metal ion has been discussed. For this reason the present work addresses the influence of zinc ions on intracellular signal transduction pathways. Major emphasis was put on enzyme-modulated zinc im- and export mechanisms as well as the initiation of programmed cell death in C6 rat glioma cells.

Studies determining the total cellular zinc uptake by atomic absorption spectroscopy showed that the calcium ionophore A23187 transports zinc ions with high selectivity over  $\text{Ca}^{2+}$ . Indeed, as demonstrated in the present study, the incubation of C6 cells with A23187 lead to an enhanced intracellular zinc level and subsequent induction of programmed cell death where the same concentration of zinc alone was not able to do so. Apoptotic cell death was characterized by internucleosomal DNA fragmentation which leads to formation of the so-called “DNA-ladder” during detection by agarose-gel electrophoresis. Fluorescence measurements applying the zinc-specific fluorescent dye Zinquin confirmed these findings.

Studies focused on intracellular signal transduction pathways identified phosphodiesterases and the phospholipase C to be involved in cellular zinc in- and efflux. Inhibition of phosphodiesterases by IBMX resulted in significant drop in the total cellular zinc content. Inhibition of PLC by Neomycin and U73122 lead to a sustained rise in the total cellular zinc level whereas activation of PLC by imipramin and ADP resulted in a significant drop in the total cellular zinc content. Furthermore the extent of cAMP- and PKA-participation in cellular zinc transport is still questionable but involvement of cGMP, calcium, protein kinase C and G as well as the guanylate cyclase could be excluded in this context.

Additionally C6 cells were examined with regard to the existence of a zinc-binding, extracellular cell-surface receptor which is specifically activated by zinc ions and might influence the intracellular zinc homeostasis by releasing calcium ions from cytosolic stores. Studies with C6 cells showed, in contrast to A459 cells (human lung carcinoma cells), no evidence for the so-called „zinc-sensing receptor“.

Methodical results of the present work showed that S-nitroso-compounds have the ability to extract zinc ions from the previously formed zinc/Zinquin-complex. This circumstance leads to a significant reduction of zinc-specific fluorescence-intensity and limits the use of Zinquin in fluorescence measurements. Furthermore the results of chromatographic and spectrographic studies of the PLC-activator *m*-3M3FBS lead to an exclusion of this component from fluorimetric studies due to its emitted auto-fluorescence and decay induced by UV-light.

## 2. Einleitung

### 2.1 Biochemische Relevanz von Zink

Die erste biologische Funktion von Zink wurde von Raulin 1869 diskutiert, als er zeigen konnte, dass Zinkentzug die Zellteilung in *Aspergillus niger* verhindert. In den folgenden Jahren etablierte sich Zink als essentielles Spurenelement, denn es konnte durch verbesserte molekularbiologische Methoden experimentell belegt werden, dass es an Vorgängen wie Proliferation, Differenzierung, Zelltod und Enzymaktivierung beteiligt ist. Die Carboanhydrase war das erste Enzym, für das Keilin und Mann 1940 eine auf Zink basierende katalytische Aktivität nachweisen konnten. Die Anzahl der bekannten Zinkenzyme hat sich in den letzten 60 Jahren auf über 400 erhöht und eine Zusammenfassung von Vallee und Falchuk aus dem Jahre 1993 zeigt, dass sie in allen sechs Enzymklassen zu finden sind.

Aus den verschiedenen chemischen Eigenschaften von Zink, aus denen sich auch das häufige Vorkommen in Enzymen erklärt, ist besonders sein stark negatives Standardreduktionspotential von  $-0,76\text{ V}$  zu erwähnen, aufgrund dessen es in biologischen Systemen immer als zweifach geladenes Kation vorkommt. Als starker Kontrast zu Kupfer und Eisen kann Zink durch diese Redoxstabilität in direkter Nähe von DNA vorkommen, ohne dass es zu mutagener Radikalbildung kommt.

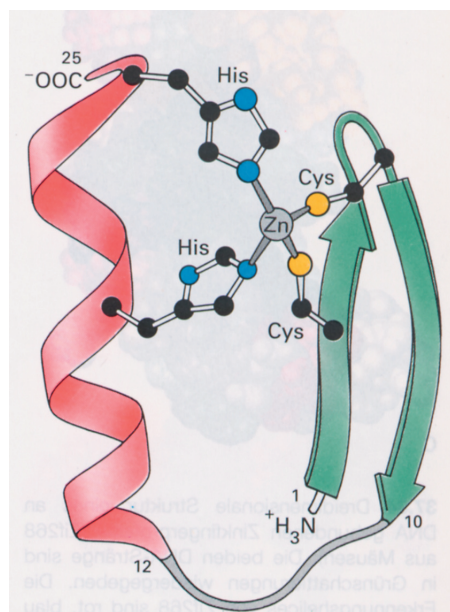
Zink kann in Koordinationszahlen zwischen 2 und 8 in unterschiedlichen Anordnungen komplexiert werden. In Proteinen ist Zink meistens von vier tetraedisch angeordneten Liganden gebunden. Im Vergleich zu freien Zinkionen wird diese Anordnung energetisch favorisiert und liegt in der Ionengröße und den „kovalenten“ Bindungskräften (Komplexbindungen) des Zinks begründet. Da es sich bei Zink um ein  $d^{10}$ -System mit vollbesetzter d-Unterschale handelt, treten keine bevorzugten Ligandenfeldstabilisierungsenergien auf.

Zinkionen können in Proteinen verschiedene Aufgaben übernehmen. Katalytische Zinkionen sind von drei Aminosäureresten, am häufigsten Histidin, Aspartat, Glutamat und Cystein, komplexiert. Die vierte und damit letzte freie Bindungsstelle wird von einem Wassermolekül besetzt, dessen Funktionalität während der Katalyse von Enzym zu Enzym variiert. In der Carboanhydrase wird das Wassermolekül zu einem zinkgebundenen Hydroxidion ionisiert, in der Carboxypeptidase A zu einem Nucleophil polarisiert und in der Alkalischen Phosphatase durch ein Substrat ersetzt, wobei das Zink seine oben bereits erwähnte Eigenschaft als Lewis-Säure einnimmt und eine negative Ladung im Übergangszustand stabilisiert. In der Phospholipase C übernimmt das Zinkion, in direkter Nähe eines anderen katalytischen Metallions vorkommend, eine kokatalytische Funktion ein, es erleichtert also die Katalyse ohne direkt in die ablaufende Reaktion einzugreifen.

Strukturelle Zinkionen sind von vier Aminosäureresten, meistens Cystein, weniger häufig Histidin, tetraedisch komplexiert und ihre Aufgabe liegt in der Stabilisierung von Tertiär- und Quartärstrukturen, wodurch ihre Funktion häufig mit Disulfidbrücken verglichen wird. Am

bekanntesten ist das Vorkommen von strukturellen Zinkionen in der Alkoholdehydrogenase (ADH), aber Hanas et al. entdeckte 1983 mit dem Transkriptionsfaktor TFIIIA aus *Xenopus laevis* den ersten einer immer größer werdenden Gruppe von Transkriptionsfaktoren mit Zinkatomen als strukturbildende Elemente. In diesen Zinkfingerdomänen fungiert ein Zinkatom als strukturstabilisierendes Element, an dem jeweils zwei Cystein- und Histidinseitenketten gebunden sind (Abb. 2.1). Schätzungen postulieren das Vorhandensein von mehreren tausend verschiedenen Zinkfingerproteinen und es wird angenommen, dass das menschliche Genprodukt zu ungefähr 1% aus Proteinen besteht, die Domänen wie die des TFIIIA enthalten. In Transkriptionsfaktoren sind gut 10 unterschiedliche zinkbindende Strukturen bekannt, von denen der Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>-Typ der am häufigsten vorkommende ist.

Die in Transkriptionsfaktoren vorkommenden Zinkfinger binden in der großen Furche der DNA und hinsichtlich der Strukturstabilisierung ist das Zink dabei die notwendige Bedingung für die Konsistenz einer Konformation mit DNA-Bindungsfähigkeit. Wie Berg und Shi in ihrem umfassenden Review von 1996 schon beschrieben, befinden sich die sequenzspezifischen Aminosäuren bei einer solchen Bindung an der zinkabgewandten Seite der  $\alpha$ -Helix.



**Abb. 2.1: Das Zinkfinger-Motiv in *Xenopus laevis*.** Ein Zinkion ( $Zn^{2+}$ ) ist tetraedisch an jeweils zwei Cystein- (Cys) und Histidinpaare (His) gebunden (verändert nach Stryer 1996).

## 2.2 Zinkverteilung und Homöostase im Gewebe

Zink kommt in allen Geweben des menschlichen Organismus vor und die Gesamtmenge in unserem Körper beläuft sich, je nach Größe und Gewicht, auf 2 bis 3 Gramm. Tabelle 2.2 liefert einen Überblick über den durchschnittlichen Zinkgehalt einiger menschlicher Organe. Im Gastrointestinaltrakt wird, hauptsächlich durch Aufnahme und Ausscheidung, die Zinkhomöostase reguliert. Ebenfalls werden geringe Mengen an Zink über die Haut und durch die Nieren abgegeben. Die normale Zinkaufnahme liegt zwischen 10 und 15 Gramm am Tag, was ungefähr der empfohlenen, maximalen Aufnahmeempfehlung (recommended-daily-allowance; RDA) entspricht (RDA = 15 mg/Tag). Bei ausgewogener Ernährung ist damit nicht von einer signifikanten Unterversorgung an Zink auszugehen. Erhöhter Zinkbedarf besteht bei der Schwangerschaft (20 bis 25 mg/Tag) und bei intensiver sportlicher Ausdauerbelastung (15 bis 25 mg/Tag) wie z.B. Langstreckenläufen (Marathon) und Triathlon (siehe dazu 2.5.6). Zum Teil erklärt sich dieser Mehrbedarf durch die tragende Rolle von Zink bei Wachstumsvorgängen, bei der Aktivierung des Immunsystems, bei der Wundheilung, bei der neurophysiologischen Leistungsfähigkeit und bei Regenerationsprozessen.

Organ	Zinkgehalt	
	µg/g Organ-Trockengewicht	% des Gesamtkörper-Zn
Muskel	51	57.0
Knochen	100	29.0
Haut	32	6.0
Leber	58	5.0
Gehirn	11	1.5
Nieren	55	0.7
Herz	23	0.4
Haare	150	0.1
Blutplasma	1	0.1

**Tab. 2.2: Zusammenfassung des Zinkgehalts menschlicher Organe.** Dargestellt ist der durchschnittliche Zinkgehalt in µg/g Organ-Trockengewicht sowie der prozentuale Anteil am Gesamtgehalt des Körpers (verändert nach Rink und Gabriel 2000).

## 2.3 Zinktransport

Aufgrund der im vorherigem Abschnitt diskutierten Relevanz von Zink in zahlreichen entscheidenden Prozessen im menschlichen Organismus ist es selbstverständlich, dass die Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung von Zink auf der Ebene von einzelnen Zellen, von Geweben und ganzen Organismen durch eine Vielzahl von Mechanismen geregelt werden muss.

Bei der Verteilung von Zink im Körper spielt das Serumalbumin eine entscheidende Rolle, da Zink im Blutplasma zu den einzelnen Geweben transportiert wird. Obwohl sich weniger als 1% des Gesamtzinkgehalts im Blut befindet (100 µg/100 ml) sind davon 70% an Serumalbumin gebunden.

Der Zinktransport auf zellulärer Ebene macht ein Passieren von Plasmamembranen unumgänglich und die hierfür notwendigen Transporter sind Gegenstand vieler Studien. Die erste fundierte und umfassende, mit radioaktivem <sup>65</sup>Zink durchgeführte, Untersuchung zum Thema Zinkaufnahme in Säugerzellen lieferte Reyes 1996. In einem detaillierten Review lieferte er Versuchsergebnisse zum Zinktransport in Leber-, Nieren-, Darm-, Endothel- und Plazentazellen sowie in Erythrocyten, Fibroblasten, Leukocyten und Spermien. Diese Untersuchungen zeigten eine zelltypunabhängige zweiphasige Zinkaufnahme: die erste Komponente war ein cytoplasmatischer, schneller Transport von sehr lose gebundenem Zink, die zweite Komponente war ein länger andauernder, langsamer Transport von fester gebundenem Zink. Es muss bei solchen Studien trotzdem immer berücksichtigt werden, dass ein signifikanter Teil des gemessenen Zinks möglicherweise an der Außenseite der Plasmamembran adsorbiert und dadurch das Messergebnis beeinträchtigt.

Zu klären bleibt in diesem Zusammenhang noch die Natur eines solchen Zinkimport/-export-Mechanismus. Denkbar wäre ein Transport als freies Ion oder als Komplex mit einem Anion wie Phosphat, Chlorid und Carbonat, einer Aminosäure oder anderen Bestandteilen physiologischer Medien. Als eine weitere Transportmöglichkeit wird ein Diffusionsprozess als neutraler Komplex angenommen, so wie er bereits durch Gutknecht 1981 für Quecksilberchlorid (HgCl<sub>2</sub>) experimentell belegt werden konnte. Auch wurde 1998 von Pattison et al. ein passiver Transport von Zink diskutiert, hier fehlen aber genaue Angaben zur Art des gebildeten Komplexes sowie zu den beteiligten Reakanden. Viele unterschiedliche Versuchsergebnisse lassen aber eine Verallgemeinerung des Zinktransportprinzips nicht zu. So konnte in einigen Zelllinien mit 4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-disulfonsäure (DIDS), einem Inhibitor für Anionenaustauscher, der Zinktransport unterdrückt werden. Dieser Effekt, der auf einen Transport als anionischer Komplex mit Cl<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> oder HO<sup>-</sup> hinweist, konnte wiederum in anderen Zelllinien nicht bestätigt werden. 1992 konnten Aiken et al. zeigen, dass Zink als Histidin-Komplex in Erythrocyten aufgenommen wird. Ein Jahr später konnten Bobilya et al. (1993) das gleiche für Endothelzellen beweisen. In Nierenzellen hingegen hatte nicht nur Histidin, sondern auch Cystein eine positive Wirkung auf die Aufnahme von Zink (Gachot et al. 1991).

Es gibt aber auch gegenläufige Ergebnisse bezüglich der Wirkung dieser beiden Aminosäuren, denn diese berichten von einer Hemmung der Zinkaufnahme durch Chelatierung.

### 2.3.1 Die ZnT-Proteine

Der erste Zinktransporter in Säugetieren wurde 1995 von Palmiter und Findley entdeckt und ZnT-1 genannt. Untersuchungen auf molekularer Ebene identifizierten den ZnT-1 als 507-Aminosäuren-großes Transportprotein, das in anschließenden Untersuchungen in allen bisher charakterisierten Zelllinien nachgewiesen werden konnte. Eine Transfektion von ZnT-1 in Nierenzellen des Hamsters resultiert in einer signifikant erhöhten Überlebensrate gegenüber toxischen extrazellulären Zinkkonzentrationen sowie einer erhöhten Efflux-Kapazität für Zink. Die Lokalisation von ZnT-1 in der Plasmamembran konnte durch ein Fusionsprotein mit ZnT-1 und grünfluoreszenten Protein (GFP, green fluorescent protein) gezeigt werden und ließ den Schluss zu, dass es sich bei ZnT-1 um ein Plasmamembran-lokalisiertes Zinkexporterprotein handeln muss. Eine Analyse der Aminosäuresequenz des ZnT-1-Proteins zeigte das Vorhandensein von Konsensussequenzen für Tyrosin-Kinase- und Proteinkinase C-Phosphorylierung. Trotz dieses Sachverhalts existieren noch keine Forschungsergebnisse, die auf eine Beteiligung von Kinasen an der ZnT-1-Aktivität hinweisen, ebenso wenig scheinen ATP oder ein Natriumgradient beteiligt zu sein.

Wie Fluoreszenzuntersuchungen an HEK-293-Zellen (human embryonic kidney cell line) zeigten, reguliert das oben beschriebene ZnT-1-Protein nicht nur den Zinkeinstrom durch L-Type Calcium Kanäle (LTCC; L-type calcium channel), sondern über den gleichen Weg auch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle (Sekler 2003).

1996 wurde wiederum von der Gruppe um Palmiter (Palmiter et al. 1996a) das zweite Zinktransporterprotein, ZnT-2, identifiziert. Auch hier konnte mit Hilfe einer Transfektion eine erhöhte Überlebensrate bei signifikant gesteigerten extrazellulären Zinkkonzentrationen beobachtet werden. Ein Fusionsprotein aus einer Kombination von ZnT-2 und GFP vermochte es, das ZnT-2-Protein in vesikulären Strukturen des Cytoplasmas zu lokalisieren. Aus diesen Ergebnissen konnte geschlussfolgert werden, dass die erhöhte Überlebensrate nicht wie bei ZnT-1 auf einen erhöhten Zinkexport zurückzuführen ist, sondern auf eine erhöhte Sequestration von Zink in vesikuläre Kompartimente. Diese Kompartimente wiesen nach Doppelfärbung mit der zinkspezifischen Fluoreszenzsonde Zinquin eine deutlich erhöhte Konzentration an freiem Zink auf (Haase 1999, 2001) und werden Zincosomen genannt. ZnT-2 ist damit ein Zinkimporterprotein, das in der Lage ist, durch Speicherung von Zinkionen in Zincosomen eine Art Puffersystem für überhöhte extrazelluläre Zinkkonzentrationen aufzubauen. Dieses System ist zusammen mit der Pufferkapazität von Metallothionein und Mitochondrien (Sensi et al.

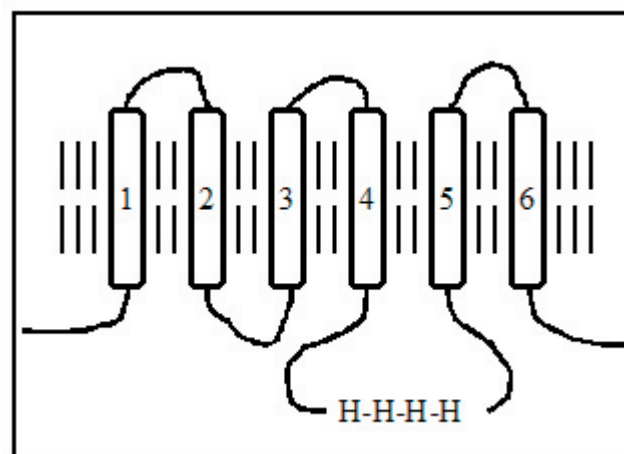


1999a, 2003) ein effektiver Schutz vor toxischen Zinkkonzentrationen.

Ein weiterer Zinktransporter ZnT-3 wird nur in Geweben des Gehirns und der Testis exprimiert (Palmiter et al. 1996b). Die wichtigste Aufgabe des ZnT-3-Proteins ist der Transport und dadurch die Akkumulation von Zink in synaptische Vesikel, aus denen es nach einer Stimulation freigesetzt wird und als Neuromodulator wirkt. Aufgrund dieser Wirkungsweise kommt dem ZnT-3-Protein im Gehirn eine besondere Bedeutung zu, da es verstärkt in den Synapsen und Axonen glutamerger Neuronen zu finden ist.

Der letzte, gut charakterisierte Zinktransporter ZnT-4 wurde 1997 von Huang und Gitschier entdeckt. Wie auch schon bei ZnT-1 und ZnT-2 beobachtet werden konnte, vermag das ZnT-4-Protein die Überlebensrate bei erhöhten extrazellulären Zinkkonzentrationen zu steigern. Ob ZnT-4 in der Plasmamembran oder in Vesikelmembranen lokalisiert ist, bleibt ungeklärt und damit auch die genaue Funktion dieses Proteins. Bekannt ist nur, dass eine Punktmutation im ZnT-4-Gen zu einer signifikanten Abnahme des Zinkgehalts in der Muttermilch von Mäusen führt, die so signifikant ist, dass Nachkommen nicht überleben können. Da ZnT-4 in einer großen Anzahl von Geweben nachgewiesen werden konnte, ist eine umfassende Funktionalität dieses Transporters anzunehmen.

Alle bisher hier diskutierten ZnT-Proteine weisen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit auf. Sie bestehen aus sechs hydrophoben Regionen, bei denen es sich um membrandurchspannende Domänen handelt. Zwischen der vierten und fünften dieser Domänen existiert eine konservierte, histidinreiche Schlaufe auf der Seite des zu transportierenden Zinkions. Palmiter et al. (1996a) und van der Zaal et al. 1999 diskutieren daher eine Beteiligung dieser „Histidin-Loop“ an der Erkennung der zu transportierenden Zinkionen. Es existieren außerdem noch einige, weniger konservierte Cysteine, denen aber nur eine untergeordnete Rolle zugesprochen wird.



**Abb. 2.3.1: Struktur eines ZnT-Proteins.** Dargestellt sind die Transmembrandomänen, sowie die Histidin-reiche Schlaufe (H).

Diese Art von Zinktransporterproteinen ist nicht nur auf Säugetiere beschränkt, sondern wurde auch in anderen Spezies, wie zum Beispiel in der Pflanze *Arabidopsis thaliana*, deren Genom als eines der ersten vollständig sequenziert wurde, nachgewiesen. Die Blütenpflanze *Arabidopsis thaliana* (Acker-Schmalwand) aus der Familie *Brassicaceae* (zu dieser Familie gehören z.B. Kohl und Rettich) wird als Modellorganismus in der Pflanzengenetik verwendet. Hier fand sich ein Zinktransporter (ZAT) mit einer Sequenzübereinstimmung von 20-30% im Vergleich zu ZnT-Proteinen und einer histidinreichen Schlaufe zwischen der vierten und fünften membrandurchspannenden Domäne (van der Zaal et al. 1999).

Eine detaillierte Zusammenstellung aller bekannten Daten der oben genannten Zinktransporterproteine und deren Aufgaben finden sich bei McMahon und Cousins (1998) sowie Cousins und MacMahon (2000).

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden fünf weitere ZnT-Proteine charakterisiert, von denen aber nur zwei in der Literatur genauer beschrieben werden. Auf der „ZincSignals2003“-Konferenz wurden diese von Michel Seve, vom Institut für Pharmakologie der Universität J. Fourier in Grenoble, Frankreich, vorgestellt. Das ZnT-5-Gen besteht aus 16 Exons, umfasst einen Bereich von 36 kb, ist auf dem Chromosom 5p13.1 lokalisiert und kodiert für ein 765-Aminosäuren-großes Protein. Mit Hilfe eines GFP-Fusionsproteins, das stabil in HeLa-Zellen transfiziert wurde, konnte gezeigt werden, dass ZnT-5 im Golgi Apparat lokalisiert ist. Mit Hilfe verschiedener Varianten der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaktion, PCR) und computergestützten Datenbank-Analysen an menschlichen Geweben und Zelllinien konnte gezeigt werden, dass ZnT-5 in allen Geweben exprimiert wird. Die höchsten Expressionslevel wurden aber im Gehirn, im Herz, in der Muskulatur, im Hoden, in den Eierstöcken, in der Prostata und im Darm gemessen. Eine Erhöhung der Konzentration an Zinkionen resultierte in einem erhöhten ZnT-5-mRNA-Level. Zusätzlich existieren Erkenntnisse von Kambe et al. (2002), die zeigen, dass der humane ZnT-5 ein ebenfalls 765-Aminosäuren-großes-Protein mit 15 Transmembrandomänen darstellt. Alle untersuchten menschlichen Gewebe zeigen eine ausgeprägte Expression, insbesondere die insulinhaltigen Beta-Zellen der Bauchspeicheldrüse, die die höchste vorkommende Zinkkonzentration im menschlichen Körper aufweisen. Weiterführende Untersuchungen an humanen und Hefe-Zelllinien konnten zeigen, dass ZnT-5 eine entscheidende Rolle beim Transport von Zink in sekretorische Vesikel von pankreatischen Beta-Zellen spielt (Kambe et al. 2002).

Das ZnT-7-Gen besteht aus 11 Exons, umfasst einen Bereich von 105 kb und ist auf dem Chromosom 1p21.2 lokalisiert. ZnT-7-mRNA konnte nur in wenigen Geweben detektiert werden, was auf eine Gewebespezifität dieses Proteins schließen lässt. Wie auch schon beim ZnT-5-Protein beobachtet wurde, erhöht eine gesteigerte Zinkkonzentration die ZnT-7-Expression in HeLa-Zellen. Zusätzlich konnten Kirschke und Huang (2003) an Mäusen zeigen, dass das 387-Aminosäuren-große ZnT-7-Protein dort in fast allen Geweben exprimiert wird. Eine opulente Expression findet sich in der Leber und im Dünndarm, wohingegen sie sich diese in der Niere, Lunge, Milz und im Gehirn, eher moderat manifestiert. Mit Immuno-

fluoreszenzmikroskopie konnte weiterhin gezeigt werden, dass ZnT-7 im Golgi Apparat und in cytoplasmatischen Vesikeln vorkommt. Eine Erhöhung der Zinkkonzentration in ZnT-7 exprimierenden Eierstockzellen vom Hamster (Chinese hamster ovary cells, CHO-cells) zeigte eine Akkumulation von Zink in den Golgi Apparat, was die Schlussfolgerung zulässt, dass ZnT-7 den Zinktransport vom Cytoplasma in den Golgi Apparat unterstützt. Identisch zu ZnT-1 bis -4 besteht auch ZnT-7 aus sechs Transmembrandomänen mit einer Histidin-reichen Schleife zwischen Domäne IV und V (Kirschke und Huang, 2003).

Eine Zusammenstellung aller bekannten ZnT-Proteine, deren Aufgaben, Funktionen und Vorkommen, findet sich in Tabelle 2.3.1.

<b>Abkürzung des Proteins</b>	<b>Klassifizierung des Proteins</b>	<b>Funktion des Proteins</b>	<b>Hauptvorkommen im Gewebe</b>	<b>Anzahl der vorhandenen Transmembrandomänen</b>
<b>ZnT-1</b>	Zinktransporter	Zn <sup>2+</sup> Export	<i>Niere</i>	6
<b>ZnT-2</b>	Zinktransporter	Zn <sup>2+</sup> Export	<i>Vesikuläre Strukturen (Zincosomen)</i>	6
<b>ZnT-3</b>	Zinktransporter	Zn <sup>2+</sup> Export/ Import	<i>Gehirn, Testis, Synapsen, synaptische Vesikel</i>	6
<b>ZnT-4</b>	Zinktransporter	Zn <sup>2+</sup> Export/ Import	<i>Plasmamembran/ Vesikelmembran</i>	6
<b>ZnT-5</b>	Zinktransporter	Zn <sup>2+</sup> Export/ Import	<i>Golgi Apparat (ubiquitär exprimiert)</i>	15
<b>ZnT-7</b>	Zinktransporter	Zn <sup>2+</sup> Export/ Import	<i>Golgi Apparat (ubiquitär exprimiert)</i>	6

**Tab. 2.3.1: ZnT-Proteine.** Dargestellt ist die Zusammenfassung der jeweilig relevanten Daten der bekannten ZnT-Proteine (McMahon und Cousins 1998, Cousins und MacMahon 2000).

### 2.3.2 Die ZIP-Familie

Die in der vorliegenden Arbeit bisher beschriebenen Zinktransporterproteine übernehmen hauptsächlich die Aufgabe des Zinkexports. Proteine, die ausschließlich dem Zinkimport dienen, runden das Kapitel des direkten Zinktransports ab und sollen an dieser Stelle ausführlich diskutiert werden.

Gerade in den letzten Jahren wurden, aufgrund verbesserter Datenbankeinträge für Gensequenzen, Proteine auf der Basis von Sequenzhomologien zu Familien zusammengefasst. Diese Gruppierung trifft auch für die zinkregulierten Metalltransporter (Zrt, zinc regulated metal transporter) sowie für die eisenregulierten Metalltransporter (Irt, iron regulated metal transporter) zu, die zum Teil in der Familie der zink- und eisenverwandten Proteine (ZIP, Zrt- and Irt-related protein) zusammengefasst wurden. Mitglieder dieser Familie weisen einen stark konservierten Histidyl-Rest auf, der in einem membrandurchspannenden Segment liegt. Es wird angenommen, dass es sich bei dieser Region um einen Teil einer Schwermetallbindungsstelle innerhalb des Ionenkanals handelt. Eine weitere Metallbindungsstelle wurde im extrazellulären Bereich der Membran lokalisiert (Eng et al. 1998). Die am besten charakterisierten Transporter der ZIP-Familie sind der Zrt1 und der Zrt2. Das Zrt1-Gen ZRT1 codiert in *Saccharomyces cerevisiae* für ein hocheffektives Zinkaufnahmesystem, das auf dem transkriptionalen Level durch Zinkmangel induziert wird. Der Zrt1 besitzt acht membrandurchspannende Domänen und eine extrazelluläre metallbindende Domäne und ist damit nicht nur in der Struktur, sondern auch auf der Gen-Ebene ein Homolog zum Irt1 bzw. IRT1. Der Zrt1 ist neben dem Zrt2 eins von zwei Zinkaufnahmesystemen in *Saccharomyces cerevisiae*. Der Zrt2 besitzt im Vergleich jedoch eine geringere Affinität zu Zink und wird von dessen Vorhandensein auch weitaus weniger stark reguliert. Trotz dieses Umstandes weist das ZRT2-Gen eine starke Identität mit den Irt1- und Zrt1-Sequenzen auf. Es liegen Ergebnisse vor, die zeigen, dass das funktionell noch nicht näher charakterisierte Homolog zu Irt1, Zrt1 und Zrt2 in Reis, Trypanosomen, Nematoden und Menschen vorkommen (Eide et al. 1996, Zhao und Eide 1996a,b, Grotz et al. 1998). Der phylogenetische Verwandtschaftsgrad auf Basis der offenen Leseraster (ORFs, open reading frames) der drei oben genannten Transporter der ZIP-Familie wurde noch nicht ermittelt. Eide et al. (1996) screenen daher Datenbanken auf der Suche nach potentiellen Homologen von Irt1, Zrt1 und Zrt2 und identifizierten 15 weitere Mitglieder der ZIP-Familie in *Saccharomyces cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana*, gleichzeitig wurde ein Dendrogram dieser Proteine erstellt (Grotz et al. 1998, Rogers et al. 2000). Eine Zusammenstellung der für den Zinktransport relevanten Proteine der ZIP-Familie findet sich in Tabelle 2.3.2.

Abkürzung des Proteins	Klassifizierung des Proteins	Funktion des Proteins	Organismus	Größe des Proteins, ausgedrückt in der Anzahl der Aminosäuren	Anzahl der vorhandenen Transmembrandomänen	Accession Nummer
<b>Zip1 Ath</b>	Zinktransporter	Zn <sup>2+</sup> Aufnahme	<i>Arabidopsis thaliana</i>	355	7 oder 8	AF033535
<b>Zip2 Ath</b>	Zinktransporter	Zn <sup>2+</sup> Aufnahme	<i>Arabidopsis thaliana</i>	353	8	AF033536
<b>Zip3 Ath</b>	Zinktransporter	Zn <sup>2+</sup> Aufnahme	<i>Arabidopsis thaliana</i>	339	8 oder 9	AF033537
<b>Zip4 Ath</b>	Zinktransporter	Zn <sup>2+</sup> Aufnahme	<i>Arabidopsis thaliana</i>	374	8	GbU95973
<b>Zrt1 Sce</b>	Zinktransporter	Zn <sup>2+</sup> Aufnahme	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	376	8	SpP32804
<b>Zrt2 Sce</b>	Zinktransporter	Zn <sup>2+</sup> Aufnahme	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	422	8	PirS59319

**Tab. 2.3.2: ZIP-Proteine.** Dargestellt ist die Zusammenfassung der jeweilig relevanten Daten der bekannten ZIP-Proteine (Eide et al. 1996, Grotz et al. 1998, Rogers et al. 2000).

Weiterführend berichtete Glen Andrews vom Department of Biochemistry and Molecular Biology der University of Kansas, Kansas City auf der „ZincSignals2003“ Konferenz über die Charakterisierung von vier ZIP-Genen der Maus (mZIP1-4). Jedes dieser mZIP-Gene kodiert für ein Protein mit acht membrandurchspannenden Domänen und weist eine hohe Übereinstimmung mit den menschlichen ZIP-Genen auf.

### 2.3.3 Kationen Transporter

Es muss außerdem davon ausgegangen werden, dass sich weitere Proteine am Zinktransport beteiligen. Gunshin et al. konnten 1997 zeigen, dass der divalent cation transporter 1 (DCT1) neben Cadmium, Eisen, Cobalt und Mangan auch Zink transportiert. Die Aminosäuresequenz des DCT1-Proteins besteht aus 12 hydrophoben Regionen, bei denen es sich um membrandurchspannende Domänen handeln dürfte. Außerdem wurde eine mögliche ATP-Bindungsstelle identifiziert, womit auch keine strukturelle Verwandtschaft von DCT1-Proteinen zu ZnT-Proteinen besteht.

### 2.3.4 Der Na/Zn-Austauscher

Eine weitere Möglichkeit des Zinktransports wurde erst kürzlich von Israel Sekler und seinen Mitarbeitern der Ben Gurion Universität in Israel aufgedeckt. Durch die Feststellung, dass in vielen Organen des menschlichen Körpers ein starker, nach innen gerichteter Gradient an freiem Zink besteht, muss die intrazelluläre Zinkkonzentration ( $[Zn]_i$ ) durch aktive Sequestration und/oder durch Blockierung des Zinkeinstroms konstant gehalten werden. Zur genaueren Untersuchung eines möglichen Ausschleusungsprozesses wurden Zellen mit Zink beladen und dann einem nach innen gerichteten Zinkgradienten ausgesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass aktiver Zinkexport von der extrazellulären Natriumkonzentration abhängt und durch Erschöpfung des ATP-Vorrates nicht beeinträchtigt wird. Diese Beobachtung führt zu dem Schluss, dass die aktive Zinkausschleusung durch einen sekundären, den bestehenden Natriumgradienten ausnutzenden Na/Zn-Austauscher vermittelt wird, und nicht auf einer primären Zinkpumpe beruht. Außerdem unterscheiden sich Na/Zn- und Na/Ca-Austauscher, da eine heterologe Expression des Letzteren die Zinkaufnahme nicht verbesserte (Ohana et al. 2003).

### 2.3.5 Zinkaufnahme mittels Ionophoren

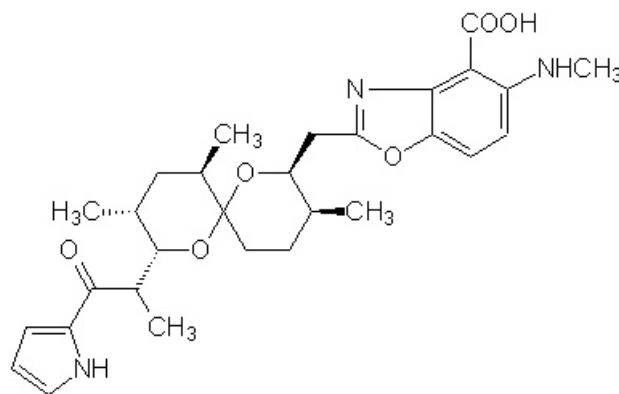
#### 2.3.5.1 Der Zink-Ionophor Pyrithion

Zalewski et al. (1993) identifizierten Pyrithion als einen spezifischen Ionophor für Zink. Haase et al. (2001) konnte dann in Versuchen mit C6-Zellen zeigen, dass Pyrithion in der Lage ist die zelluläre Zinkaufnahme soweit zu steigern, dass mit normalerweise nicht-toxischen Konzentrationen von Zink im Medium, Apoptose ausgelöst wird. In diesen Experimenten reicht eine extrazelluläre Zinkkonzentration von 50  $\mu$ M, kombiniert mit 500 nM Pyrithion aus, um eine apoptoseinduzierte DNA-Fragmentation auszulösen (Haase et al. 2001).

#### 2.3.5.2 Der Calcium-Ionophor A23187

Von Erdahl et al. (1996) konnte gezeigt werden, dass der designierte Calciumionophor A23187 Mangan und Zink weitaus besser transportiert als Calcium. A23128, auch bekannt unter dem Namen Calcimycin, wird aus dem Pilz *Streptomyces chartreusensis* gewonnen und ist ein dreizähliger, polycyclischer Ligand, der zweiwertige Metallionen durch Komplexbildung membrangängig macht. Aufgrund unterschiedlicher Komplexbildungsgeometrien für Zink und Calcium transportieren zwei Moleküle A23187 daher ein Calciumion in einem 2:1-Komplex. Zinkionen hingegen werden von dem Ionophor in einem 1:1-Komplex transportiert (Abb. 2.3.5.2). Erschwerend kommt beim Calcium noch der Umstand hinzu, dass es hohe Koordinationszahlen (7-9) bevorzugt und dass nach Komplexbildung durch den Ionophor die restlichen freien Koordinationsstellen mit Wassermolekülen besetzt werden, wodurch die

Membranpermeabilität des Komplexes herabgesetzt wird. Zinkionen bevorzugen 4 und 6 als Koordinationszahlen, so dass bei Transport als 1:1-Komplex drei Bindungsstellen durch den Ionophor besetzt sind und im Falle der bevorzugten tetraedischen Koordination bleibt die verbleibende freie Stelle unbesetzt oder wird mit einem Chlorid- bzw. OH-Liganden gesättigt. Der resultierende, einfach geladene, bzw. neutrale Komplex gelangt durch elektrogenen Transport bzw. passive Diffusion weitaus besser durch die Plasmamembran als der 2:1-Komplex mit Calcium. Basierend auf eigenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass der Zinktransport durch A23187 ausreicht, um mit normalerweise nicht-toxischen Konzentrationen von Zink, Apoptose auszulösen (Jansen et al. 2003). Mit diesem Zinktransport über einen Calciumionophor wird einmal mehr die enge Verknüpfung der Transportwege dieser beiden divalenten Kationen deutlich.



**Abb. 2.3.5.2: Strukturformel von A23187.**

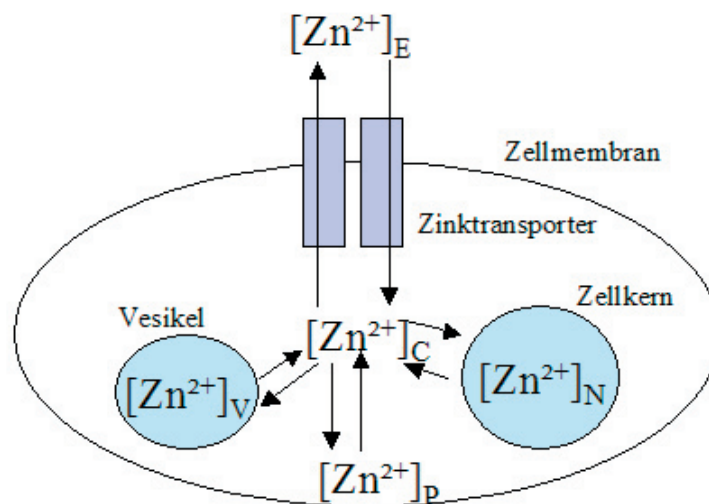
### 2.3.6 Inhibition des Zinkexports

Eine amerikanische Arbeitsgruppe charakterisierte in Versuchen mit isolierten Membranvesikeln, Lanthan als einen Inhibitor von Zinkexportern in der Plasmamembran (Colvin 1998, Colvin et al. 2000). Haase et al. (2001) konnte dann zeigen, dass  $\text{LaCl}_3$  in der Lage ist den Gesamtzinkgehalt von C6-Zellen signifikant zu steigern. Parallel zu diesem Anstieg hätte man, so wie bei Pyrithion und A23187, eine apoptoseinduzierten DNA-Fragmentation erwartet, doch diese Ergebnisse blieben aus. Weitere Untersuchungen konnten dann zeigen, dass dieser antiapoptotische Effekt von Lanthan auf seiner Wirkung beruhte, dass durch Zink ausgelöste Zusammenbrechens des mitochondrialen Membranpotentials zu verhindern (Haase et al. 2001).

## 2.4 Intrazelluläre Zinkverteilung

Die Menge des intrazellulär vorhandenen Zinks verteilt sich zu 50% auf das Cytosol, zu 20-30% auf den Kern und 10-20% sind membranassoziiert (Vallee und Falchuk 1993). Bei dieser Verteilung muss man bedenken, dass der überwiegende Teil des intrazellulär vorhandenen Zinks proteingebunden vorliegt, bzw. einen Komplex mit verschiedenen Anionen bildet, oder an andere Makromoleküle gebunden ist (Abb. 2.4).

Die Menge an intrazellulärem freiem Zink ist verschwindend gering und Versuche, diesen Zinkanteil mit den verschiedensten Fluoreszenzsonden nachzuweisen, gibt es seit Anfang der neunziger Jahre. Die daraus resultierenden Ergebnisse fallen in einem Bereich von  $<0,1$  nM (Atar et al. 1995) bis  $18,8 \mu\text{M}$  (Coyle et al. 1994) unterschiedlich aus. Selbst Messungen, die an gleichen Zelltypen durchgeführt wurden, zeigten eine Abhängigkeit der detektierten Konzentration an freiem intrazellulärem Zink von der verwendeten Fluoreszenzsonde sowie von der Meßmethode. Dieses Phänomen lässt sich erklären, berücksichtigt man die jeweilige Affinität der verwendeten Fluoreszenzsonde zum detektierten Metall. Durch diesen Umstand kommt es unter Umständen nicht nur zur Komplexbildung von freien Metallionen, sondern von allen, deren Bindung schwächer ist, als die Affinität der Fluoreszenzsonde für dieses Metall.



**Abb. 2.4.: Intrazelluläre Zinkverteilung.** Schematische Darstellung der intrazellulären Zink-Poole.  $[\text{Zn}^{2+}]_E$ : Extrazelluläres Zink;  $[\text{Zn}^{2+}]_V$ : vesikuläres Zink;  $[\text{Zn}^{2+}]_N$ : nukleares Zink;  $[\text{Zn}^{2+}]_P$ : proteingebundenes Zink;  $[\text{Zn}^{2+}]_C$ : cytosolisches Zink.

### 2.4.1 Zinkspezifische Fluoreszenzsonden

Da Fluoreszenzsonden für die Quantifizierung des intrazellulären Zinkgehalts unerlässlich sind, es aber auch sondenspezifisch zu den oben genannten Komplikationen kommen kann, sollen an dieser Stelle die wichtigsten diskutiert werden.



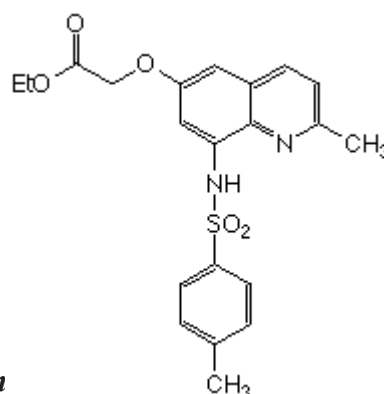
### 2.4.1.1 Fura-2

Fura-2 wurde zur fluorimetrischen Detektion von Calciumionen entwickelt. Fura-2/AM, der Acetoxymethylester von Fura-2, kann für intrazelluläre Calciummessungen verwendet werden, da der Methylester von unspezifischen, intrazellulären Esterasen gespalten wird. Das daraus resultierende negativ geladene Molekül weist eine deutlich geringere Membranpermeabilität auf und bleibt somit im Cytosol „gefangen“. Fura-2 zeigt außer für Calcium, auch noch eine erhöhte Affinität zu Zink, woraus seine Verwendung als Zinksonde resultiert. Dieses Phänomen beruht auf der Tatsache, dass nicht nur die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ , sondern auch die von  $\text{Zn}^{2+}$  zu einer hypsochromen Verschiebung des Intensitätsmaximums im Anregungsspektrum der freien Sonde (380 nm) zur metalliongebundenen Sonde (340 nm) führt.

### 2.4.1.2 TSQ und Zinquin

Die beiden zinkspezifischen Fluoreszenzsonden TSQ (Frederickson et al. 1987) und Zinquin (Zalewski et al. 1993) sollen hier zusammen diskutiert werden, da sie chemisch beide auf einem Chinolingerüst basieren. Der Unterschied dieser Sonden liegt in der Methylgruppe, die das Zinquinmolekül an Position 2 trägt, wodurch die Affinität für Zink im Vergleich zum TSQ-Molekül herabgesetzt wird. Diese Modifikation führt zu einer deutlich reduzierten Menge an Zink, die Proteinen entzogen wird. Ebenfalls verfügt das Zinquinmolekül (Abb. 2.4.1.2) über eine Ethylestergruppe, die durch intrazelluläre unspezifische Esterasen gespalten wird. Das daraus resultierende negativ geladene Molekül ist weniger membrangängig als das ungeladene, und somit innerhalb der Zelle eingeschlossen (Mahadevan et al. 1996).

Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien zeigten nach Färbung mit TSQ (Nasir et al. 1999) sowie mit Zinquin (Zalewski et al. 1993, Coyle et al. 1994) einen nicht fluoreszierenden Zellkern, sowie im Cytoplasma liegende Punkte mit intensiver Fluoreszenz. Es wird angenommen, dass es sich bei diesen Punkten um zinktransportierende Vesikel handelt, die man Zincosomen nennt und die unter Umständen für den Transport von Zink zwischen den intrazellulären Zink-Pools verantwortlich sind. Kritiker machen eine ungleichmäßige Verteilung der beiden Sonden für das Auftreten der stark fluoreszierenden Punkte verantwortlich und zweifeln an der Zincosomen-Theorie.



**Abb. 2.4.1.2: Strukturformel von Zinquin**

### 2.4.1.3 Newport Green

Im Kontrast zu TSQ- oder Zinquin-behandelten Zellen, wiesen vergleichbare Experimente mit der Zinksonde Newport Green eine gleichmäßige Fluoreszenz innerhalb der untersuchten Zellen auf (Canzoniero et al. 1999, Sensi et al. 1999a). Dieses Ergebnis lässt Zweifel an der Fähigkeit von Zinquin aufkommen, in Zellkerne vorzudringen. Ebenso könnte es sich bei den beobachteten Zinkosomen um eine höhere lokale Fluoreszenzintensität an der Außenseite der vesikulären Membran durch dortige Assoziation von Zinquin handeln.

### 2.4.1.4 Zinpyr

Zu einer neuen Generation von Zinksonden gehört das fluoresceinenthaltende Zinpyr (ZP), von dem es mittlerweile drei verschiedene Subtypen (ZP1, 2 und 4) gibt (Burdette et al. 2001, 2003). Der große Unterschied zu den bisher diskutierten Sonden liegt darin, dass die Excitations- sowie die Emissionswellenlängen im sichtbaren Bereich liegen (~500 nm). Alle drei Zinpyr-Sonden haben Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) für Zink, die unter 1 nM liegen und eine Quantenausbeute ( $\Phi$ ) von ungefähr 0.9 für ZP1 und 2, sowie 0.4 für ZP4. Zinpyr 1 und 2 werden als gut zellpermeabel beschrieben, ZP4 hingegen kann nicht in Zellen eindringen. Ein großer Nachteil von ZP1 und 2 ist, dass die Selbstfluoreszenz der Sonde bei intrazellulären Messungen auch nicht durch Zugabe des Zinkchelators TPEN herabgesetzt werden kann, was zu dem Schluss führt, dass die Konzentration an freiem Zink in den untersuchten Zellen unter dem Detektionslimit der Sonde liegt. Ein weiterer Nachteil dieser Sonden liegt in der Fähigkeit, andere zweiwertige Metallionen (besonders  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  und  $Cu^{2+}$ ) ebenso gut zu binden wie Zink. Auch wenn die Autoren die daraus resultierende Konkurrenz mit Zink um die Bindungsstelle der Sonde als nicht drastisch darstellen, denn Ansammlungen von diesen Metallen dürfte man in gesunden Zellen nicht antreffen, schränkt dieser Umstand dennoch die Verwendung von Zinpyr-Sonden ein.

Abschließend lässt sich zu Versuchen mit zinkspezifischen Fluoreszenzsonden folgendes sagen: nimmt man die durch Färbung mit TSQ und Zinquin erlangten Ergebnisse als Grundlage für Rückschlüsse auf die tatsächliche intrazelluläre Zinkverteilung, so stellt diese für die Zelle einen stark energieverbrauchenden, dynamischen Prozess dar und zeigt damit gleichzeitig welche hohe Stellung die Verteilung von freien Zinkionen im Cytoplasma einnimmt. Dies ist jedoch nicht überraschend, betrachtet man die Beteiligung von Zink an den schon diskutierten fundamentalen zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose.

### 2.4.2 Metallothionein (MT)

1957 wurde von Margoshes und Vallee das Protein Metallothionein (MT) charakterisiert. Erst später wurde seine zentrale Rolle im Prozess der intrazellulären Zinkhomöostase deutlich. Zu

Beginn der auf MT-basierenden Forschung erwachsen verschiedene Theorien über dessen Funktion. Zuerst wurde vermutet, dass MT aufgrund seiner Fähigkeit, Cadmium und Zink zu binden, zur Detoxifikation von Schwermetallen dient. Versuche, die zeigen konnten, dass erhöhte Konzentrationen an Cadmium und Zink über ein Metall-responsives Element (MRE) im Promotor des MT, dessen Expression induzieren, erhärteten diese Annahme. Gleichzeitig konnte jedoch auch gezeigt werden, dass MT unter Zinkentzug ebenfalls stärker exprimiert wird. Die daraus resultierende Anreicherung von Zink in der Zelle führte zu deren Überleben und gab Anstoß für Überlegungen, Metallothionein als notwendiges Speicherprotein anzusehen (Suhy et al. 1999). Die Aufklärung seiner Struktur zeigte, dass das MT-Protein aus insgesamt 60 bis 68 nicht aromatischen Aminosäuren besteht und 20 hochkonservierte Cysteine enthält. Diese hohe Anzahl an Cysteinen erklärt die große Bindungskapazität von Metallionen durch Sulfhydrylgruppen und die Ausbildung von Metall-Thiolat-Clustern. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das N-terminale Ende des MT-Proteins acetyliert ist (Klaassen et al. 1999). Seine bedeutsame Rolle im Bezug auf die Zinkverteilung innerhalb der Zelle beruht auf der allgemeinen Fähigkeit, 7 divalente Kationen binden zu können, wobei jedes einzelne dieser Ionen von 4 Schwefelatomen tetraedrisch komplexiert wird. Die beiden dadurch entstehenden Cluster, die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Domäne genannt werden, enthalten, im Bezug auf Zink, 3 bzw. 4 Zinkatome, die durch 9 bzw. 11 Cysteinreste komplexiert werden. In acider Umgebung kommt es zu einer Freisetzung von Metallionen und zu einer Bildung von Apothioneinen. In Säugetieren existieren vier Isoformen des MT-Proteins, die, historisch bedingt, in der Reihenfolge ihrer Eluierung durch Anionenaustausch-Chromatographie von MT I bis MT IV bezeichnet wurden. Diese, auf Ladungsunterschieden basierende, konventionelle Nomenklatur bezieht sich im Eigentlichen auf die Abwesenheit (MT I) oder Anwesenheit (MT II) eines Aminosäurerestes an Position 10 oder 11 der Proteinsequenz. Während MT I und MT II in allen Organen exprimiert werden, kommt MT III nur im Gehirn und den Nieren vor und MT IV sogar nur während eines Differenzierungsprozesses (Quaife et al. 1994, Aschner et al. 1997). Außerdem konnte gezeigt werden, dass alle Isoformen des MT-Proteins in der Plazenta exprimiert werden (Liang et al. 1996).

Diese Erkenntnisse über Struktur und Funktion lassen eine weitaus größere Komplexität der Wirkung von Metallothionein, besonders auf die Verteilung von intrazellulärem freiem Zink, vermuten. Seinen positiven Einfluss bei vielen oxidativen Vorgängen in der Zelle (Powell 2000), seine unterschiedliche Verteilung zwischen Kern und Cytoplasma während der Differenzierung und Proliferation (Chesters 1991), die Übertragung von Zink auf Apoproteine (Jacob et al. 1998, Jiang et al. 1998) sowie die Deaktivierung des Transkriptionsfaktors SP-1 durch Apometallothionein (Zeng et al. 1991) weisen darauf hin, dass es sich bei der Bindung von Zink an Enzyme und Transkriptionsfaktoren um einen regulativen zellulären Prozess handelt, der von Metallothionein gesteuert und moduliert wird. Wichtig ist in diesem Zusammenhang die Annahme, dass, trotz fehlender Redoxchemie von Zinkionen, die Zinkfreisetzung an den Redoxstatus der Zelle gekoppelt ist (Maret 2000). Da Metallothionein ein niedriges

Redoxpotential von  $E_0 = -340$  mV aufweist, können seine Thiolgruppen schon durch milde, in der Zelle vorhandene Oxidantien (z.B. Gluthationdisulfid) oxidiert werden. Die daraus resultierende Freisetzung von Zink aus MT (Maret 1994) kann im Gegensatz zur beschriebenen Oxidation auch durch S-nitrosylierung erwirkt werden (Kröncke et al. 1994).

Dies würde bedeuten, dass die Menge der zellulär verfügbaren Zinkionen von der Anzahl der in der Zelle vorhandenen oxidativen Agenzien abhängig und zu dieser direkt proportional ist.

## 2.5 Physiologische Funktionen von Zink

### 2.5.1 Toxizität von Zink

Da Zink in der Umwelt in sehr geringen Konzentrationen vorkommt, ist die Wahrscheinlichkeit einer Zinkvergiftung verschwindend gering. Es gibt nur wenige Literaturstellen, in der gesundheitliche Beeinträchtigungen durch das Einatmen von zinkhaltigem Rauch, dem/der sogenannten Metallrauch-Fieber/Metallrauch-Vergiftung (metal-fume-fever, MFF), aufgeführt werden (Mueller und Seger 1985). Diese Aufnahme durch die Luft kann aber zu einem der Atemnot sehr ähnlichem Krankheitsbild, kurz ARDS (acute respiratory distress syndrom) genannt, führen (Luhr et al. 1999). Da ARDS besonders durch kurzzeitige Exposition hoher Konzentrationen von Zink auftritt, wie sie bei der Zündung von Rauchbomben anzutreffen sind, beruhen die sich darauf beziehenden Daten auf medizinischen Untersuchungen der Kriegs- und Nachkriegszeit (Evans 1945), sowie auf Untersuchungen nach Unfällen mit Freisetzung von zinkchloridhaltigem Rauch (Macaulay and Mant 1964; Hjortsø et al. 1988).

Ebenfalls können Zinkvergiftungen aufgrund des in den USA gerade bei Kindern weit verbreiteten „swallowing coin problem“ auftreten. Hierbei handelt es sich um die orale Aufnahme von Geldstücken und der Freisetzung toxischer Mengen an Zink im Magen (Bennett et al. 1997).

### 2.5.2 Funktionen von Zink bei der Proliferation

Grummt et al. konnten 1986 zeigen, dass DNA-Synthese und Proliferation vom Zinkeinstrom abhängig sind und eine „second messenger“-Funktion von Zink während der Induktion der Mitogenese wurde postuliert. Basierend auf diesen Erkenntnissen konnte von Chesters (1991), gezeigt werden, dass ein zellulärer Wachstumsstop durch Zinkmangel detektiert werden kann, bereits dann wenn der zelluläre Zinkspiegel noch unverändert ist. Da zu diesem Zeitpunkt alle zinkhaltigen Enzyme noch metallgebunden vorliegen, wurde der Ursprung für die Proliferationsinhibition auf der Ebene der zinkmodulierten Genexpression gesucht. Chesters et al. (1990) konnten in Swiss-3T3-Zellen einen Rückgang der Thymidin-Kinase-mRNA beobachten, wenn diese vorher mit DTPA, einem nicht membranpermeablen Zinkchelator, behandelt wurden. Dieser Effekt konnte mit Zinkzugabe wieder aufgehoben werden und fünf Jahre später auch durch die zinkabhängige Bindung von Proteinen an die Promotorregion des Thymidin-Kinase-Gens erklärt werden (Chesters 1995). Somit fundiert der durch Zinkmangel ausgelöste zelluläre Wachstumsstop auf einer reduzierten DNA-Synthese.

### 2.5.3 Zinkwirkungen auf die Differenzierung

Petrie et al. konnten 1991 die Differenzierung von Myoblasten zu Muskelzellen stoppen, indem sie, ähnlich wie bei den oben erwähnten Versuchen von Grummt et al. (1986), den Einstrom von Zink unterbanden. Zink scheint hier aber möglicherweise nicht alleine einzugreifen, denn es wurde in allen bisher untersuchten Zelllinien eine Verschiebung von Metallothionein in den Kern beobachtet (Tsujiikawa et al. 1991, Apostolova et al. 1999, Schmidt und Beyersmann 1999). Sieht man als die Hauptaufgabe von MT die Übertragung von Zink auf Apoproteine an, so könnten diese Versuche zeigen, dass nicht der totale intrazelluläre Gehalt von Zink als Regulator von Proliferation und Differenzierung wichtig ist, sondern dessen intrazelluläre Verteilung. Auf diesen bestimmten Punkt wird auch später in diesem Kapitel nochmals eingegangen.

### 2.5.4 Antioxidative Wirkung von Zinkionen

Da Zink, aufgrund fehlender Redoxchemie, nicht direkt in Redoxprozesse eingreifen kann, beruht die in der Literatur beschriebene Wirkung als Antioxidans auf einem indirekten Mechanismus. Zum einen ist dies, die als chronische Zinkwirkung bezeichnete Expression von Genen wie Metallothionein, die dann als Antagonist zu reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) fungieren. Zum anderen existieren noch vier Möglichkeiten der akuten Zinkwirkung: die ersten drei beruhen auf dem Schutz einer oxidierbaren Thiolgruppe, entweder durch a) direkte Bindung, b) sterische Einflüsse durch Bindung in direkter Nähe oder c) Konformationsänderung nach Bindung in einer entfernteren Proteinregion. Die vierte und letzte Möglichkeit der akuten Zinkwirkung ist die direkte Konkurrenz um Bindungsstellen mit Übergangsmetallen wie Kupfer und Eisen. Verhindert Zink deren Bindung, ist zum einen der Schutz der direkten Umgebung gewährleistet und zum anderen wird der Export dieser Metalle gefördert (Powell 2000).

Der im Zusammenhang physiologischer Prozesse oft zitierte antioxidative Einfluss von Zink beruht meist auch auf der Wirkung der Superoxiddismutase (SOD), einem zinkhaltigen Enzym, das gerade bei körperlicher Aktivität vor der Zellschädigung durch freie Radikale schützt (Valle und Falchuk 1993, Lukaski 2000).

### 2.5.5 Zink und Zelltod

Obwohl eine Zinkvergiftung, wie oben diskutiert, sehr unwahrscheinlich ist, gibt es einige cytotoxische Prozesse an denen Zink beteiligt ist. An dieser Stelle soll die Zinkwirkung auf die beiden unterschiedlichen Wegen des nekrotischen und apoptotischen Zelltods diskutiert werden.

Die Nekrose wird als pathologischer Zelltod beschrieben und beinhaltet einen unkoordinierten, passiv ablaufenden Prozess, der durch physikalische, chemische oder osmotische Schädigung der Zelle hervorgerufen wird. Morphologisch lässt sich während des nekrotischen Zelltods ein Anschwellen der Zelle ausmachen, der durch das Zusammenbrechen des transmembranen Konzentrationsgradienten initiiert wird. Ist die Zelle geschädigt, zieht der Einstrom von Calcium- und Natrium-Ionen einen nachfolgenden Wassereinstrom mit sich, der die Zelle sowie deren Organellen durch Osmose zum Platzen bringt. Die somit erreichte Lyse der Zelle zieht einen Entzündungsprozess des umliegenden Gewebes und die Aktivierung reaktiver Makrophagen mit sich (Raff 1998). Ein Einfluss von Zink auf die Nekrose tritt erst bei sehr hohen Konzentrationen auf. Haase (2001) vermutete, dass Zink in der C6 Ratten Glioma Zelllinie ab einer extrazellulären Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  den nekrotischen Zelltod auslöst. Dieser Wert liegt ungefähr sechsmal höher als der für physiologische Umgebungen dieser Zelllinie angenommene Wert von ca. 50  $\mu\text{M}$ .

Viel interessanter, im Hinblick auf die Beteiligung von Zink am Zelltod, ist die Apoptose, der sogenannte „programmierte Zelltod“. Im Gegensatz zur Nekrose handelt es sich hier um einen aktiven, streng regulierten, biochemischen Vorgang, der es dem Gewebe erlaubt, sich von mutierten, überflüssigen und in ihrer Funktion gestörten Zellen zu entledigen, bevor diese die benachbarten Zellen, und damit den Aufgabe(n) des Gewebes, beeinträchtigen können. Auch morphologisch unterscheidet sich der apoptotische Zelltod grundlegend vom nekrotischen. Kommt es bei der Nekrose noch zu einem Anschwellen der betroffenen Zelle, so lässt sich bei der Apoptose ein deutliches Schrumpfen der Zellen ausmachen. Während die Plasmamembran auf ihrer Oberfläche Bläschen bildet, behalten alle anderen Zellorganellen ihre Funktion bei und im Zellkern kommt es zu einer Kondensation des Chromatins. Im späten Stadium der Apoptose fragmentiert das Chromatin und die Zelle „zerfällt“ in viele, sogenannte „apoptotische Körperchen“ (apoptotic bodies), die nichts anderes als Vesikel mit intakter Membran darstellen. Von benachbarten Zellen können diese Vesikel nun phagocytiert werden und die für den nekrotischen Zelltod charakteristische Entzündungsreaktion des Gewebes bleibt aus. Interessanterweise konnte eine Art „Konzentrationsfenster“ ausgemacht werden, innerhalb welchen Zink keinen Einfluss auf die Apoptose hat, bzw. eine pro-apoptotische Wirkung zeigt. Ebenfalls konnten Agenzien ausgemacht werden, die vor der apoptotischen Wirkung hoher Zinkkonzentrationen schützen, bzw. die apoptotische Wirkung hoher Zinkkonzentrationen noch unterstützten. Auf diese Vorgänge soll weiter unten genauer eingegangen werden.

Da die Apoptose als kontrollierte Selbstzerstörung in der Entwicklung und Erhaltung vielzelliger Organismen eine fundamentale Rolle spielt, lohnt sich eine genauere Betrachtung der Zinkwirkung auf den apoptotischen Zelltod.

#### 2.5.5.1 Zink und Apoptose

Die Apoptose lässt sich in zwei Phasen aufteilen. Erstens in die biochemischen Signale, die den apoptotischen Mechanismus initiieren und zweitens in den apoptotischen Zelltod an sich, der mit

den oben beschriebenen morphologischen Veränderungen einhergeht. Der ersten Phase liegen zwei biochemische Mechanismen zugrunde. Zum einen ist dies die Aktivierung der Caspasen (cystein aspartate-specific proteases), einer proteolytischen Enzymklasse, und zum anderen das Verhältnis von pro- (Bax) und antiapoptotischen (BC1-2-ähnlichen) Membranproteinen der Mitochondrien.

Wie der Name schon andeutet, sind Caspasen Cystein-Proteasen, die substratspezifisch nach bestimmten Asparaginsäureresten schneiden (Thornberry und Lazebnik 1998) und im Verlauf der Apoptose in regulierten Prozessen und in bestimmter Reihenfolge aktiviert werden (Cohen 1997). Diese Aktivierung erfolgt durch proteolytische Spaltung der kleinen (10 kDa) und der großen (20 kDa) Untereinheit der im Cytoplasma vorhandenen Procaspasen, den inaktiven Proenzymen der Caspasen (Earnshaw et al. 1999). Nach erfolgter Abspaltung der Prodomäne und Ausbildung einer neuen Proteinstruktur entsteht eine aktive Caspase durch Dimerisierung zweier aktivierter Procaspasen. Das so entstandene aktive Enzym sorgt nun, neben dem Schneiden des Substrats, durch Aktivierung anderer Procaspasen zur Vervielfältigung und Weiterleitung des apoptotischen Signals. Innerhalb dieser sogenannten Caspasekaskade, unterscheidet man Initiatorcaspasen und Effektorcaspasen anhand der Reihenfolge ihrer Aktivierung.

In der relativ komplexen Initiationsphase führen verschiedene apoptotische Ereignisse zur Aktivierung der Caspasen und der nachgeschalteten apoptotischen Signalwege. Eines der häufigsten dieser Ereignisse ist die Aktivierung des Fas-Rezeptors durch Binden des Fas-Liganden oder der Entzug von Wachstumshormonen. Wobei der Fas-Signalweg sehr gut untersucht ist, herrscht über die Induktion der nicht-Fas-abhängigen Apoptose noch Unklarheit (Anderson 1997, Cross et al. 2000). Ein Beispiel hierfür ist die Protein-Kinase C die von Kiziaki et al. (1989) als apoptoseinduzierend und im gleichen Jahr von McConkey et al. (1989) als apoptosehemmend beschrieben wurde. Zu allem Überfluss kommt es dann innerhalb der initiierten Phase der Apoptose auch noch zu modulierenden Wechselwirkungen verschiedener Signalwege (Lucas 2000), so dass als allgemeingültiges Induktionssignal der Apoptose nur die Erhöhung der intrazellulären freien Calciumkonzentration eindeutig identifiziert zu sein scheint (Trump und Berezsky 1995).

Die Initiatorcaspasen 8 und 9 leiten durch Aktivierung der Effektorcaspase 3 die folgende Effektorphase ein, deren Hauptaufgabe die Amplifikation des apoptotischen Signals ist. Die Effektorcaspase 3 schneidet das DNA-Reparaturenzym PARP, Strukturproteine und weitere Effektorcaspasen, wie die Procaspase 6. Die sich anschließende Degradationsphase wird von der proteolytischen Spaltung des DNase-Inhibitors ICAD durch die Caspase 3 bestimmt und macht damit den Weg frei für die Zerstörung der zellulären DNA (Enari et al. 1998). Durch eine von der Caspase 3 aktivierte Ca/Mg-abhängige Endonuklease kommt es zur Zerkleinerung der DNA. Diese Endonuklease spaltet die DNA in der internukleosomalen Linkerregion in Fragmente von 180-200 Basenpaaren oder einem Vielfachen dieser Größe (Wyllie 1998). Durch diese charakteristische Größe lässt sich die Apoptose in der Gelelektrophorese durch das



Auftreten einer sogenannten DNA-Leiter feststellen, in der die „Stufen“ durch die gespaltenen DNA-Fragmente gebildet werden (Nagata 2000). Es wurden bis heute 14 Caspasen identifiziert, die während des apoptotischen Zelltods über 100 verschiedene Proteine spalten.

Wie oben schon erwähnt, spielen neben den Caspasen auch die Mitochondrien eine wichtige Rolle im apoptotischen Zelltod. Green und Reed (1998) zeigten, dass während der Apoptose die sogenannte „permeability transition pore“ (PTP) in der Mitochondrienmembran irreversibel geöffnet wird. Diese Pore wird von Proteinen der Bcl-2-Familie reguliert. Die pro-apoptotischen Mitglieder dieser Familie Bax und Bad induzieren die Öffnung der PTP, während die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> deren Schließung veranlassen (Tsujiimoto und Shimizu 2000). Durch diese Öffnung der Pore während der Apoptose kommt es zum einen zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und zum anderen zum Austritt vom apoptoseinduzierenden Faktor (AIF) und weiteren pro-apoptotischen Substanzen, wie Cytochrom C, in das Cytosol (Cai et al 1998, Loeffler et al. 1999).

Wie oben erwähnt, haben verschiedene Konzentrationen an Zink unterschiedliche Auswirkungen auf apoptotische Prozesse. Zinkmangel wurde eindeutig als apoptoseauslösender Faktor identifiziert, da in Geweben zinkdefizienter Organismen und bei Zinkentzug in Zellkultur, Apoptose nachgewiesen werden konnte (Sunderman 1995). Der membranpermeable und spezifische Zinkchelator TPEN, der für die meisten Zinkentzugsexperimente verwendet wird, fördert seinerseits die apoptoseinduzierende Wirkung von Butyrat und Colchizin, die als Auslöser des programmierten Zelltods bekannt sind (Chai et al. 1999).

Neben der pro-apoptotischen Zinkwirkung werden aber auch biochemische Mechanismen diskutiert, die zu einer anti-apoptotischen Wirkung von Zink führen. So fanden Truong-Tran et al. (2000) eine Inhibition aller untersuchten Caspasen durch Zink. Während die Konzentration an Zinkionen, die zur halbmaximalen Inhibition der Caspase-3 nötig war, bei weniger als 10 nM lag und damit einen Wert im physiologischen Bereich repräsentiert (Perry et al. 1997, Maret et al. 1999) lagen alle anderen Zinkkonzentrationen, die verwendet wurden, um die restlichen Caspasen zu inhibieren, außerhalb der intrazellulär erreichbaren Werte.

Weitere anti-apoptotische Wirkungen werden der Bindung von Zink an das p53-Protein zugeschrieben. Die daraus resultierende Konformationsänderung dieses Transkriptionsfaktors schränkt seine DNA-Bindungsfähigkeit (Verhaeg et al. 1998) und damit die von ihm ausgeübte Kontrolle der Apoptose ein. Auch scheint der durch oxidativen Stress ausgelöste apoptotische Zelltod durch die antioxidative Wirkung von Zink aufgehoben zu werden. Fraker et al. (2000) beobachteten, dass Zink in der Lage ist, die Bindung von Glucocorticoiden an ihren Rezeptor zu unterbinden und damit eine Barriere in der Rezeptor-vermittelten Apoptose darstellt.

Weiterführend gab es auch über lange Zeit die Ansicht, dass die toxische Wirkung von hohen Zinkkonzentrationen im allgemeinen als nekrotisch und nicht apoptotisch anzusehen ist. Erste Anzeichen für eine apoptoseauslösende Zinkkonzentration gaben Paramanatham et al. (1997) und Kim et al. (1999a,b), nachdem sie zeigen konnten, dass die DNA-Fragmentierung durch Zink ausgelöst wurde. Haase et al. (2001) konnten dann zeigen, dass hohe Zinkkonzentrationen

in C6-Ratten-Gliomazellen apoptotisch wirkten und noch höhere Konzentrationen Nekrose auslösten. Interessanterweise konnte eine Art „Konzentrationsfenster“ ausgemacht werden, innerhalb welchem Zink keinen Einfluss auf die Apoptose hat, bzw. eine pro-apoptotische Wirkung zeigt. Dieser Konzentrationsrahmen erstreckt sich von ca. 50  $\mu\text{M}$  bis ca. 100  $\mu\text{M}$  extrazellulären Zinks. Außerhalb dieses Fensters, also bei Zinkmangel ( $< 50 \mu\text{M}$ ) und Zinküberschuss ( $> 100 \mu\text{M}$  aber  $< 300 \mu\text{M}$ ), war Zink in der Lage, in C6-Zellen Apoptose auszulösen (Haase et al. 2001). Ebenfalls konnten Agenzien ausgemacht werden, die vor der apoptotischen Wirkung hoher Zinkkonzentrationen schützen, wie z.B. Lanthan (Haase et al. 2001), bzw. die apoptotische Wirkung hoher Zinkkonzentrationen noch unterstützten, wie Phyrithion (Haase et al. 2001) und A23187 (Jansen et al. 2003). Im Falle des Calcium-Ionophors A23187 konnte gezeigt werden, dass leicht erhöhte Zinkkonzentrationen die per se nicht in der Lage waren apoptotischen Zelltod auszulösen, bei paralleler Gabe von A23187 mit geringer Konzentration, Apoptose auslösen konnten (Jansen et al. 2003).

#### 2.5.6 Zink und Sport

Da sich die täglich benötigte Menge an Zink, nach einer Studie des amerikanischen Forschungsrates (1989), auf 15 mg beläuft, wird Zink als Mikronährstoff eingeklassifiziert. Im Bezug auf sportliche Betätigung ist seine Rolle als katalytischer und struktureller Bestandteil einer großen Menge von Enzymen besonders wichtig, da diese sogenannten Zinkenzyme eine bedeutende Rolle im Metabolismus der Makronährstoffe und der Zellteilung spielen (Lukaski 2000). Zusätzlich sind diese Enzyme an Abläufen des Intermediärstoffwechsels beteiligt und nehmen dort, wie im Falle der Laktatdehydrogenase und der Carboanhydrase, Schlüsselpositionen ein.

Aus Experimenten an zinkdefizienten Tieren war bekannt, dass diese ein eingeschränktes Muskelwachstum, eine herabgesetzte Muskel-DNA Konzentration, eine schwächere Leistung der Skelettmuskulatur und eine herabgesetzte Widerstandsfähigkeit gegenüber Ermüdungszuständen aufwiesen (Isaacson et al. 1978, Richardson et al. 1979, McDonald et al. 1988). Aufgrund dieser Daten wurde ein positiver Einfluss von Zink auf regenerative Prozesse, wie die der Muskeln und der allgemeinen Leistungsfähigkeit sowie auf das Immunsystem, angenommen. Folgende Versuche, die den Sachverhalt von Zinkaufnahme und dessen Wirkung auf körperliche oder sportliche Betätigung untersuchen sollten, lieferten unterschiedliche Ergebnisse mit verschiedenen Erklärungsansätzen. Aufgrund der Komplexität der Ergebnisse sowie der Versuchsparameter, sollen hier nur die wichtigsten zusammengefasst werden.

Allgemein lassen sich die Experimente zum Einfluss von Zink auf die körperliche und sportliche Leistungsfähigkeit in zwei verschiedene Ansätze unterteilen: zum einen in Untersuchungen zur Veränderung des Serum- bzw. Plasma-Zinkgehalts und zum anderen zur Veränderung des Zinkgehalts im Urin bzw. Schweiß, vor, während und nach erhöhter körperlicher Tätigkeit.

Dressendorfer und Sockolov (1980) konnten zeigen, dass Langstreckenläufer einen geringeren Serum-Zinkgehalt aufwiesen, als Männer gleichen Alters, die sich nicht sportlich betätigten. Innerhalb dieser Gruppe der Langstreckenläufer war der Serum-Zinkgehalt umgekehrt proportional zur im Training gelaufenen Distanz und die Autoren mutmaßten, dass ein Zusammenhang zwischen gelaufener Strecke und der dabei durch Schweiß verlorenen Menge an Zink besteht. Die gleichen Beobachtungen machte Haralambie (1981) mit dem Zusatz, dass die Gruppe der von ihm untersuchten Sportlerinnen im Verhältnis zur Gruppe mit sporttreibenden Männern, einen geringeren Serum-Zinkgehalt aufwies. Diese Erkenntnis wurde zum Teil dadurch begründet, dass Frauen im allgemeinen weniger essen als Männer und sie somit weniger Zink aufnehmen. Neuere Untersuchungen von Lukaski et al. (1990) und Buchman et al. (1998) ließen wiederum keinen Unterschied im Serum-Zinkgehalt von sporttreibenden Frauen im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe erkennen, und zeigten einmal mehr, dass nicht körperliche Aktivität *per se* den Serum-Zinkgehalt senkt, sondern dies oftmals nur an den Ernährungsgewohnheiten der Individuen liegt. So lässt sich also schlussfolgern, dass sich durch die Untersuchung des Serum-Zinkgehalts Individuen mit Zinkdefizienz identifizieren lassen, dass diese aber nicht unbedingt durch sportliche Aktivität hervorgerufen wurde. Für eindeutige Untersuchungen muss also die Zinkaufnahme durch die Ernährung sowie durch Nahrungsergänzungstoffe der Probanden- sowie der Kontrollgruppe streng kontrolliert werden, damit überhaupt aussagekräftige und untereinander vergleichbare Daten generiert werden können.

Aus den oben genannten Experimenten sowie Folgeuntersuchungen konnte eine wichtige Erkenntnis hinsichtlich der Zinkverteilung im Körper gewonnen werden: sportliche Betätigung ist in der Lage, im Körper zirkulierende Zinkkonzentrationen zu verändern. Leichte, intensive und andauernde Ausdauerbelastung erhöhen Plasma- und Serum-Zinkkonzentrationen direkt nach Beginn der Belastung (Hetland et al. 1975, Lukaski et al. 1984, Mundie und Hare 2001). Die Größe dieser Zunahme aufgrund sportlicher Belastung hängt von der Intensität der Belastung ab: je höher die Belastung, desto größer der Anstieg im Plasma-Zinkspiegel (Mundie und Hare 2001). Diese messbare Zunahme an Zink kann nicht der Blutkonzentration allein zugeschrieben werden (Lukaski et al. 1984), sondern kommt wahrscheinlich durch den Abzug von Zink aus der kontrahierenden Skelettmuskulatur und den Transport in die extrazelluläre Flüssigkeit aufgrund von Muskelermüdung und -überanstrengung zustande (Karlson et al. 1968, Mundie und Hare 2001). Nach Beendigung der Belastung fällt der Plasma-Zinkspiegel meistens wieder sehr schnell ab und es wird angenommen, dass dieser Abfall mit einer gesteigerten Zinkausscheidung über den Urin und einer, von Cytokinen gesteuerten Neuverteilung von Zink, vom Plasma in die Leber einhergeht (Hackman et al. 1986, McDonald et al. 1988). Durch sportliche Betätigung hervorgerufenen Gewebetrauma lässt ebenfalls die Zinkkonzentration des Plasmas absinken (Singh et al. 1991) und ist mit einem gleichzeitigen Anstieg der Interleukin-6-Konzentration im Plasma verbunden (Singh et al. 1999). Der molekulare Zusammenhang scheint hier zu sein, dass die Reduktion des Plasma-Zinkspiegels in erster Linie durch eine

Neuverteilung von Zink in die Leber aufgrund von Interleukin-6-stimulierter Metallothionein-Synthese zustande kommt.

Neben den Veränderungen im Plasma- und Serum-Zinkspiegel wurde ebenfalls die Zinkausscheidung über den Urin untersucht. Anderson et al. (1984) zeigten, dass nur an Belastungstagen mehr Zink ausgeschieden wurde und dass am folgenden Tag die Ausscheidung zurückgegangen war. Weiterführend zeigten Van Rij et al. (1986), dass die Zinkexkretion an Tagen leichter und andauernder Belastung um 50-60% höher war, als an Tagen, an denen kein Sport getrieben wurde. Diese Ergebnisse führten zu der Mutmaßung, dass die sofortige Erhöhung des Zinkgehalts im Urin nach einmaliger Belastung auf eine homöostatische Regulation zurückzuführen sei. Bei täglich wiederholter sportlicher Betätigung oder anstrengender körperlicher Arbeit über einen Zeitraum von einem Monat, stieg der Zinkgehalt im Urin nach einer Woche nochmals signifikant an und blieb auf diesem erhöhten Niveau bis zur Beendigung dieser Zeitspanne, gleichzeitig fiel der Serum-Zinkspiegel leicht ab (Miyamura et al. 1987). Untersuchungen von Dressendorfer et al. (2003) während intensiven Trainings und Wettkämpfen von Profi-Radfahrern zeigten jedoch keine Veränderung der Zinkabgabe über den Urin. Daher kann vermutet werden, dass es zu einer Anpassung des Zinkmetabolismus bei täglicher intensiver Belastung kommt.

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Sporttreiben oder körperliche Arbeit in einer heißen Umgebung zu einer erhöhten Zinkexkretion über den Schweiß führt (Jacob et al. 1981). Diese Erhöhung war aber nur von temporärer Natur und nach einer Probanden-abhängigen Akklimatisierungsphase, fiel die Menge des über den Schweiß abgegebenen Zinks wieder annähernd auf die Normalwerte bei bekannter Umgebungstemperatur ab (Consolazio 1983). Neue Untersuchungen von DeRuisseau et al. (2002) an 17 Radfahrern beider Geschlechter zeigen, sogar dass es innerhalb einer Belastungszeit von zwei Stunden zu einer Anpassung der Zinkabgabe über die Körperoberfläche kommt. Während am Anfang dieser Belastungsspanne noch eine starke Zinkexkretion über den Schweiß auszumachen war, nahm diese über den Zeitraum hinweg deutlich ab. Dieser aufgeführte Verlauf der Zinkabgabe über die Haut wurde auch nicht durch zusätzliche Zinkgabe verändert. Der von den Autoren gemessene Zinkverlust über den Schweiß beläuft sich in diesem zweistündigen Zeitraum körperlicher Belastung auf 8% bzw. 9% der maximalen täglichen Zinkaufnahme für Frauen und Männer (DeRuisseau et al. 2002).

#### 2.5.6.1 Zink als Nahrungsergänzungsmittel beim Sport

Versuchsreihen, die sich mit der gezielten Gabe von Zink als Nahrungsergänzungsmittel und dessen Einfluss auf die sportliche Leistungsfähigkeit und Muskelfunktion befassen, sind selten. Krotkiewski et al. (1982) untersuchte die Auswirkung von einer täglichen Dosis von Zink (135 mg) auf die Muskelkraft und die Ausdauer an 16 Frauen über einen Zeitraum von 14 Tagen. Probanden, die mit Zink supplementiert wurden, zeigten im Vergleich zum Placebo eine deutlich verbesserte Sprungkraft und isometrische Ausdauer, was die Autoren zu der Schlussfolgerung

fürhte, dass zusätzliche Zinkgabe für Sportarten von Nutzen sein könnte, die hauptsächlich die schnell kontrahierenden Muskelfasern (FT-Muskulatur, fast twitch Muskulatur) beanspruchen. Da vor Versuchsbeginn der Zinkstatus dieser Probandengruppe nicht ermittelt wurde, bleibt die Frage offen, inwieweit ein akutes Zinkdefizit die durchgeführten Experimente beeinflusst hätte, bzw. ob der gewählte Zeitraum von zwei Wochen ein solches Defizit hätte ausgleichen können. Trotz dieser Einschränkung scheint die Grundaussage der oben aufgeführten Studie von Rodriguez et al. (1996) bestätigt worden zu sein: die Untersuchung von 34 Profisportlerinnen und Profisportlern ergab, dass jene Probanden einen höheren Zinkspiegel im Plasma aufwiesen, die schnellkraftorientierte Sportarten mit hauptsächlich anaerober Energiebereitstellung ausübten (Judo und Fechten) gegenüber denen, die ausdauerorientierte Sportarten mit hauptsächlich aerober Energiebereitstellung tätigten (Radfahren, Langstreckenlauf). Der Zinkgehalt im Plasma war bei beiden Sportlergruppen aber deutlich höher als der Zinkspiegel der Kontrollgruppe. Bedenkt man, dass anaerobe Sportarten aufgrund der benötigten Kraft- und Schnellkraftkomponente hauptsächlich die FT-Muskulatur ansprechen, und dass aerobe Sportarten anhand der Ausdauerkomponente fast ausschließlich die langsam kontrahierenden Muskelfasern (ST-Muskulatur, slow twitch) benötigen, so könnte sich die Aussage von Krotkiewski et al. (1982) unter Umständen bewahrheiten. In großer Höhe, wie sie zum Beispiel beim Bergsteigen erreicht wird, scheint eine zusätzliche Zinksupplementierung vor einem Abfall der Plasma-Zinkkonzentration zu schützen (Rawal et al. 1999). Die Autoren mutmaßten, dass der durch Sauerstoffarmut induzierte Stress dazu führt, dass zirkulierendes Zink im Blutplasma mit steigender Höhe und länger andauernder Hypoxie in die Organe transportiert wird (Rawal et al. 1999).

Eine generelle Aussage über Schaden und Nutzen einer einseitigen Erhöhung des Zinkkonsums ist aufgrund vieler Wechselwirkungen nicht zu treffen. Zink erschwert die Aufnahme von Kupfer aus der Nahrung, auch wenn es außerhalb der Mahlzeiten eingenommen wird (Van den Hammer et al. 1984). Eine Supplementierung von 50 mg Zink pro Tag führt bei Erwachsenen sogar zu Kupfer-Defizienz (Fischer et al. 1984). Eine längere Einnahme von Zinkkonzentrationen, die über der maximalen täglichen Aufnahmemenge von 15 mg liegen, führen zu einer Absenkung des HDL-Cholesterins um 8-9% (Hooper et al. 1980, Freeland-Graves et al. 1982), wobei eine Konzentration von 17-50 mg Zink am Tag ausreicht, die durch sportliche Betätigung hervorgerufene Erhöhung des HDL-Cholesterinspiegels wieder auszugleichen.

Aus Gründen der unterschiedlichen Ansprüche des jeweilig vorliegenden Zinkstatus' und der Ernährungsgewohnheiten, sollte die einseitige Erhöhung der Zinkaufnahme über die täglich empfohlene Menge von 15 mg mit Vorsicht betrachtet werden (Goodwin et al. 1985, Peake et al 2003). Meistens ist es ratsamer, bei erhöhtem Bedarf ein moderat dosiertes Kombinationspräparat aller Mineralien und Spurenelemente zu sich zu nehmen, als sich auf die einseitige Einnahme eines einzelnen Wirkstoffes zu beschränken. Da alle Mineralien und Spurenelemente auf der einen oder anderen Ebene miteinander wechselwirken, lässt sich die Gesamtheit dieser Nährstoffgruppe als eine Art Orchester darstellen – und ein Orchester spielt nicht besser bzw. lauter wenn nur einseitig die Anzahl der Pauken und Trompeten erhöht wird, sondern nur, wenn alle Instrumente im gleichen Verhältnis zueinander verstärkt werden.

## 2.5.7 Der Einfluss von Zink auf neuronale Prozesse

### 2.5.7.1 Zink als Neuromodulator

Im Gehirn von Säugetieren liegt eine Konzentration von ungefähr 10  $\mu\text{M}$  Zink (Frederickson 1989) vor, wovon ein kleiner Teil zwar proteingebunden vorliegt, der weitaus größere Teil aber ist chelatierbares Zink, das besonders im Hippocampus und im Neocortex anzufinden ist (Szerdahelyi und Kasa 1984, Danscher et al. 1985, Frederickson et al. 1987). Zink findet man zusammen mit Glutamin in präsynaptischen Vesikeln des Hippocampus. Gebildet werden diese Transportbläschen im Golgi Apparat und die Beladung mit Zink mittels des ZnT-3-Proteins findet auf dem Weg zur präsynaptischen Membran statt. Diese Vesikel können eine Konzentration von bis zu 1.4 mM Zink enthalten (Frederickson et al. 2000) und akkumulieren damit 5-10% aller in den „mossy fibers“ des Hippocampus vorhandenen Zinkionen. Elektrische oder durch Zugabe von Kalium bzw. Kainate hervorgerufene Depolarisation neuronaler Zellen führt zur Ausschüttung von Glutamat und Zink (Sensi et al. 1999b). Im Synaptischenspalt kommt es dadurch zu Zinkkonzentrationen von 10-100  $\mu\text{M}$ , obwohl bei mehrmaliger Stimulation auch Konzentrationen von 300  $\mu\text{M}$  (Choi und Koh 1998) und mehr (Peters et al. 1987) gemessen werden können. Obwohl die physiologische Rolle von Zink in Neuronen noch nicht vollständig geklärt ist, scheint Zink bei der Stabilisation von vesikulärem Glutamat beteiligt zu sein, sowie einen Einfluss auf postsynaptische Rezeptor-/Ionenkanäle zu haben (Zatta et al. 2003). Assaf und Chung (1984) konnten zeigen, dass vesikuläres Zink als Neuromodulator von Glutamat- und NMDA-Rezeptoren wirkt und später zeigten Peters et al. (1987), dass steigende Konzentrationen von Zink die NMDA-Toxizität vermindern, bzw. unterdrücken. In *in vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass Zink die Wirkung der NMDA-Subklasse der Glutamatrezeptoren vermindert (Peters et al. 1987, Westbrook und Mayer 1987), die Wirkung der AMPA-Glutamatrezeptoren aber verstärkt (Hori und Galeno 1987). Da Zink ebenfalls GABA- und strychninsensitive Rezeptoren bei den gleichen Konzentrationen beeinflusst (Choi und Koh 1998), ist davon auszugehen, dass Zink eine Rolle in der Erregbarkeit neuronaler Membranen spielt (Zatta et al. 2003).

### 2.5.7.2 Zink und Neurodegeneration

Obwohl die oben beschriebenen hohen Konzentrationen von zum Teil über 300  $\mu\text{M}$  Zink in den Synaptischenspalt ausgeschüttet werden, ist während normaler Hirnfunktion keine Neurodegeneration auszumachen. Es gibt auch sonst keine Anzeichen für eine Beteiligung von Zink an neurodegenerativen Krankheiten im Menschen, obwohl eine eindeutige Verlangsamung im Fortschreiten der Alzheimer Krankheit durch Zinkentzug nachgewiesen worden ist (Potocnik et al. 1997). Im Gegensatz zu anderen Metallen ist der homöostatische Regelmechanismus für zelluläre Zinkaufnahme und -abgabe so effizient, dass keine neuronale Störung hinsichtlich exzessiver Zinkansammlung beobachtet werden konnte (Vallee und Falchuk 1993). In klinischen Studien hingegen wurde Zink als neurotoxisch beschrieben (Zatta et al. 2003). Auch

Untersuchungen an kortikalen Mausneuronen unter Verwendung hoher Zinkkonzentrationen (300-600  $\mu\text{M}$ ) zeigten nekrotischen Zelltod (Yokoyama et al. 1986). Unter Verwendung verschiedener Chelatoren, sowie Blocker von Ionenkanälen, konnten sechs zelluläre Angriffspunkte für zinkinduzierte Neurotoxizität identifiziert, bzw. ausgeschlossen werden: 1) der NMDA-Rezeptor sowie seine angeschlossenen Calciumkanäle sind nicht beteiligt, da der NMDA-Blocker MK-801 keinen Einfluss auf die Toxizität hatte; 2) die Aktivierung des AMPA-Rezeptors ist notwendig für die Induzierung von Toxizität, da der AMPA-antagonist CNQX in der Lage war die Toxizität zu unterdrücken; 3) Membrandepolarisation induziert ebenfalls Toxizität, wie Untersuchungen mit  $\text{K}^+$  zeigten; 4) extrazelluläre Konzentrationen an  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen sind für die Toxizität notwendig, da Chelatoren wie EDTA und EGTA in der Lage waren, die toxischen Effekte zu unterdrücken; 5) für neurotoxische Wirkungen ist eine Aktivierung von L-type-Calciumkanälen und ein folgender Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen notwendig, da eine Blockierung dieser Kanäle mit Diltiazem und Nimidopine eine protektive Wirkung hatte; 6) der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen initiiert dann die Neurodegeneration (Weiss et al. 1993, Zatta et al. 2003). Für diesen Einstrom von Zink machten Sensi et al. (1997) ebenfalls einen Ionenaustauscher verantwortlich, der fast identisch dem  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ist. Als mögliche Mechanismen der Zinktoxizität werden eine Schädigung der Mitochondrien mit nachfolgender Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (Sensi et al. 1999a, b, Kim et al. 1999a,b) oder eine Inhibition des Energiestoffwechsels (Sheline et al. 2000) angenommen. Diese, zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse hinsichtlich der Neurotoxizität von Zink zeigen unter anderem den Umstand, dass Zink andere Metalle wie Aluminium, Eisen oder Kupfer ersetzen kann, die dann wiederum ihre toxische Wirkung entfalten (Zatta et al. 2003). Viel wahrscheinlicher als der schädliche Einfluss von hohen Zinkkonzentrationen in neuronalen Abläufen ist die Zinkdefizienz, die mit gestörter visueller Wahrnehmung sowie dem eingeschränkten Riech- und Tastsinn in Beziehung gebracht wird (Taylor et al. 1996, Taylor et al. 1997).

### 2.5.7.3 Zink und Epilepsie

Eine Konsequenz von epileptischen Anfällen sind neuronale Schädigungen und Neurodegenerationen in Gehirnarealen, in denen hohe Zinkkonzentrationen vorkommen. Es konnte gezeigt werden, dass eine intracerebroventrikuläre Gabe von  $\text{Zn}^{2+}$  (0.3  $\mu\text{M}/10 \mu\text{L}$ ) epileptische Anfälle in Ratten induziert (Itho und Ebadi 1982). In einem Modell wurde gezeigt, dass epileptische Mäuse in bestimmten Arealen des Hippocampus eine signifikant geringere Menge an Zink aufwiesen als Mäuse ohne Epilepsie (Fukahori 1988). Durch zinkangereicherte Ernährung konnte dieser Unterschied ausgeglichen werden und die Anzahl der epileptischen Anfälle ging zurück, bzw. Anfälle blieben komplett aus (Fukahori 1990). Der umgekehrte Effekt wurde beobachtet, wenn Zink nicht der Nahrung zugeführt wurde (Fukahori 1990). Gegensprüchliche Ergebnisse, die von erhöhter Zinkneurotoxizität bei epileptischen Anfällen ausgehen, können erklärt werden, wenn man davon ausgeht, dass diese Toxizität ein sekundäres

Ereignis nach akuter Verletzung neuronaler Zellmembranen und daraus hervorgehenden Veränderungen in der Phospholipidstruktur ist. Unter diesen Umständen kann davon ausgegangen werden, dass neuronale Verletzungen, die durch epileptische Anfälle hervorgerufen wurden, mit Zink verknüpft sind, da Neuronen nach Beschädigung und anschließender Degeneration der Phospholipidschicht eine abnormale Permeabilität für Metallionen aufweisen (Sensi et al. 1999a, b, Zatta et al. 2003).

#### 2.5.7.4 Down Syndrome (DS) und Epilepsie

Die klinische Verbindung dieser beiden Krankheiten liegt darin, dass Patienten mit Down Syndrome ein höheres Risiko aufweisen an Epilepsie zu erkranken als Menschen ohne DS. Down Syndrome, auch bekannt als Trisomie 21, ist eine Überexpression des 21. Chromosoms. Aufgrund des Umstandes, dass die meisten Enzyme auf dem zusätzlichen Chromosom aktiv transkribiert werden, kommt es zu einer Überexpression dieser Enzyme und damit zu einem überhöhten Verbrauch von Substraten und einer Überproduktion von Endprodukten (Thiel und Fowkes 2004). Ein Beispiel hierfür ist die Superoxid-Dismutase (SOD), deren SOD-1-Gen auf dem 21. Chromosom um ungefähr 50% überexprimiert wird (Sinet 1982, Anneren und Edman 1993). Hierdurch kommt es zu einer mengenmäßigen Abnahme von Superoxid und zu einer Überproduktion von Wasserstoffperoxid. Der Körper versucht diese primären Effekte der Gen-Überexpression durch sekundäre metabolische Anpassungen, wie homöostatische Regelmechanismen, zu kompensieren. Im Falle der SOD kommt es aufgrund der Abnahme an Superoxid unter anderem zu veränderten Konzentrationen an Stickstoffmonoxid, Peroxinitrat, und Stickstoffmonoxid-Synthetase wodurch die Produktion von Neurotransmittern beeinträchtigt wird (Thiel und Fowkes 2004).

Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass DS-Patienten einen unterdurchschnittlichen Zinklevel im Blutplasma aufweisen (Purice et al. 1988, Sherman 1992, Hamilton 1994, Kadrobova et al. 1996) und es scheint Anhaltspunkte dafür zu geben, dass Zinksupplementierung in DS-Patienten mit niedrigem Zinklevel zu einer gesteigerten DNA-Synthese führt (Stabile et al. 1991). Andere Experimente zeigen, dass Zink in der Lage ist, die TSH-Konzentration in hypothyroiden DS-Patienten um 34% zu senken und es wird spekuliert, dass Zinkmangel ein Grund für subklinischen Hypothyroidismus in Kindern mit DS ist (Bucci et al. 1999). Zusätzliche Untersuchungen mit DS-positiven Kindern ergaben, dass ab dem Alter von einem Jahr, eine Defizienz an dem zinkhaltigen insulinähnlichen Wachstumsfaktor vom Typ 1 (IGF-1) auftritt, die durch Zinksupplementation ausgeglichen werden kann. Gleichzeitig vermag diese zusätzliche Gabe von Zink an Kindern mit DS das im normalen Krankheitsverlauf stockende Körperwachstum anzuregen (Napolitano et al. 1990). Obwohl Zink ein Bestandteil der cytosolischen SOD ist, vermag eine zusätzliche Gabe von Zink den SOD-Level in weiblichen DS-negativen Probanden zu senken (Adalla und Samman 1993). Da SOD, wie oben erwähnt, in DS-Patienten zu 50% überexprimiert ist, scheint eine Nahrungsergänzung mit Zink unter Umständen für eine Abschwächung der SOD- und wasserstoffperoxidinduzierten Störung des Zellmetabolismus verantwortlich zu sein (Thiel und Fowkes 2004).



## 2.5.8 Der Einfluss von Zink auf Signaltransduktionswege

Aufgrund der oben aufgeführten Möglichkeiten des regulatorischen Einflusses freier intrazellulärer Zinkkonzentrationen, wuchs in den letzten Jahren das Interesse an der Rolle von Zink in der eukariotischen Signaltransduktion beträchtlich (Beyersmann und Haase 2001). Die Feststellung, dass extrazellulär erhöhte Zinkkonzentrationen eine intrazelluläre calciumabhängige Signalkaskade über den sogenannten „Zinc-sensing Receptor“ (ZnR) auslösen (Hershinkel et al. 2001) und dass die Ursache für die durch extrazelluläre Zinkkonzentrationen hervorgerufene Aktivierung von zahlreichen Kinasen, wie MAPK, JNK, p70S6K, noch nicht geklärt ist, erhebt zum einen die mechanistische Frage über die Art und Weise der Wechselwirkung von  $Zn^{2+}$  mit seinem mutmaßlichen Rezeptor. Zum anderen konnten *in vitro*-Studien zwar zeigen, dass gewisse Kinasen von mikromolaren Zinkkonzentrationen aktiviert werden, nur sind diese Konzentrationen um mindestens drei Größenordnungen höher als die in den Zellen erreichbaren. Da außerdem gezeigt werden konnte, dass Zink ganze Signalwege wie die vom EGF (Wu et al. 1999) und Insulin aktiviert, und im Falle des Insulins auch noch im Stande ist dessen Wirkung zu imitieren (Tang und Shay 2001, Haase und Maret 2003), scheint ein Einfluss von Zink weit oben in den Signalkaskaden wahrscheinlich zu sein, denn Aktivierung einzelner Enzyme weiter unten hätte kaum die beschriebene Effizienz.

Die regulatorische Funktion von Zink ist besonders bedeutend, da die Konzentration an freiem intrazellulärem Zink fluktuiert und damit als eine dynamische, nicht konstante Größe angesehen werden muss. Wie weiter oben beschrieben, hat der proteingebundene Anteil des intrazellulären Zinks meist Cystein-Thiolgruppen als Liganden und Zink kann daher durch Oxidation dieser Thiole freigesetzt werden. Auf diese Weise könnte der Redoxstatus der Zelle die Menge an freien Zinkionen durch oxidative Freisetzung aus Zinkspeicherproteinen, wie Metallothionein, beeinflussen (Maret und Vallee 1998). Veränderungen in diesem Redoxpotential durch Hormone wie EGF (Bae et al. 1997), Insulin (Mahadev et al. 2001) oder TNF- $\alpha$  (Gag und Aggarwal 2002) könnten die Verfügbarkeit von intrazellulärem Zink regulieren und damit indirekt in die folgende, durch Zink modulierte, Signaltransduktion eingreifen.

### 2.5.8.1 Zinkeinfluss auf die Phosphorylierung des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

Die Familie der Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosin-Kinasen besteht aus vier Mitgliedern: ErbB1, ErbB2, ErbB3 und ErbB4 (Wells 1999). ErbB1 wird aufgrund ihres häufigen Auftretens als EGFR bezeichnet und ist ein 170 kDa großes Glycoprotein, das in den meisten Säugetierzellen exprimiert wird. Es besteht aus einer Liganden-bindenden-, einer Transmembran- und einer Tyrosin-Kinase-Domäne sowie einem carboxyterminalen Abschnitt, der Tyrosinreste enthält, die bei Aktivierung des Rezeptors auto- und transphosphoryliert werden. Die Aktivierung des EGFR geschieht im Falle von EGF durch Binden dieses Liganden an die extrazelluläre Domäne und die dadurch hervorgerufene Dimerisation zweier EGFR-Moleküle zu einem Homodimer, bzw. Heterodimer, wenn ein anderes Mitglied der Erb-Familie

beteiligt ist (Earp et al. 1995). Diese Dimerisierung führt zur Aktivierung der intrinsischen Tyrosin-Kinase-Aktivität und damit zur Kreuzphosphorylierung an den Autophosphorylierungsstellen der Rezeptormoleküle. Es gibt im EGFR mindestens fünf Tyrosine, die als Autophosphorylierungsstellen dienen und die wiederum in drei Primärstellen („Hauptstellen“) (Tyrosine 1068, 1173 und 1148) und zwei Sekundärstellen („Nebenstellen“) (Tyrosine 992 und 1086) aufgeteilt werden (Hackel et al. 1999). Zusätzlich haben Biscardi et al. (1999) noch weitere Tyrosine als Transphosphorylierungsstellen anderer Kinasen identifiziert. Das Präsentieren von Phosphotyrosinen an diesen Phosphorylierungsstellen initiiert die SH2-vermittelte Bindung von verschiedenen Proteinen an den Rezeptor und eine nachfolgende Signalweiterleitung stromabwärts (Wells 1999, Bogdan und Klambt 2001).

Von Wu et al. (1999) konnte gezeigt werden, dass  $Zn^{2+}$ -Ionen die EGFR-Phosphorylierung verursachen und damit eine EGFR-abhängige Signalweiterleitung induzieren, die eine Ras- und MAPK-Aktivierung mit sich ziehen. Um Anhaltspunkte für den genauen Mechanismus zu bekommen mit dem Zinkionen die EGFR-Aktivierung induzieren, soll hier chronologisch die Wirkung von Zink auf die Dimerisierung, Phosphorylierung und die Aktivierung der Kinase in der Lungenzelllinie A431 aufgezeigt werden. Interessanterweise sind Zinkionen weder im Zelllysats noch in intakten Zellen in der Lage eine EGFR-Dimerisierung auszulösen. Aber auch in Abwesenheit von diesen EGFR-Dimeren induziert Zink die Phosphorylierung mehrerer Phosphorylierungsstellen im EGFR-Molekül. Weitere Versuche zeigten ebenfalls, dass diese Phosphorylierungen unabhängig von der EGFR-Kinase-Aktivität sind. Da zusätzlich die durch Zink hervorgerufene Phosphorylierung von Cbl, einem Substrat der EGFR-Kinase, nicht von der EGFR-Kinase-Aktivität abhängig ist, kann aus  $Zn^{2+}$ -induzierter EGFR-Phosphorylierung eine funktionierende, stromabwärts gerichtete Signalweiterleitung resultieren. Diese Daten sprechen dafür, dass zinkinduzierte, EGFR-abhängige Signalwege durch Transaktivierung des EGFR initiiert werden (Samet et al. 2003). Die Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinase c-Src phosphoryliert den EGFR an dem selben Tyrosinrest (Tyr845) wie Zink (Biscardi et al. 1999) und ein Inhibitor (PP2) dieser Kinase vermag die  $Zn^{2+}$ -induzierte Phosphorylierung an Tyr845 und Tyr1068 zu unterbinden. Dieser Umstand, zusammen mit der Erkenntnis, dass die Zugabe von Zink die Menge an aktivierter c-Src erhöht, zeigt, dass die durch Zink hervorgerufene EGFR-Phosphorylierung von der c-Src-Aktivität abhängig ist. Die Suche nach Zinkeffekten, die weiter stromabwärts vom EGFR liegen, zeigte, dass Zink ERK1/2-Phosphorylierung durch einen EGFR-Kinase-abhängigen Mechanismus induziert. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die zinkinduzierte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors an mehreren Phosphorylierungsstellen und in Abwesenheit von Dimerisierung der EGFR-Moleküle, sowie ohne Mitwirkung der EGFR-Kinase-Aktivität, aber unter Aktivierung der c-Src-Kinase geschieht (Samet et al. 2003). Auf die Möglichkeit, dass die  $Zn^{2+}$ -induzierte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors ein sekundärer Prozess zu einer primär hervorgerufenen Inhibition der Rückreaktion, also der Dephosphorylierung durch Tyrosin-Phosphatasen, ist, soll im nächsten Abschnitt genauer eingegangen werden.

### 2.5.8.2 Zinkeinfluss auf den Insulin-Signalweg

Wie oben erwähnt ist Zink in der Lage, ganze Signalwege zu aktivieren. Im Falle des insulinmimetischen Effektes scheint Zink die Rezeptoren für Insulin und den insulin-like growth factor-1 (IGF-1) zu beeinflussen und dadurch entsprechende Signalwege zu aktivieren. An insulinsensitiven Gliazellen konnte von Haase und Maret (2003) nachgewiesen werden, dass Zink, genau wie Insulin, die Phosphorylierung der drei aktivierenden Tyrosine in der autokatalytischen Region des Insulin-Rezeptors erhöht. Der große Unterschied im Wirkungsmechanismus des an einen extrazellulären Rezeptor bindenden Insulins ist, dass Zink erst in die Zellen eindringen muss, um seine Wirkung zu entfalten. Weitere Untersuchungen brachten die Erkenntnis, dass Zink nicht, wie angenommen, die Phosphorylierung des Rezeptors und damit die Kinase-Aktivität beeinflusst, sondern die Dephosphorylierung durch Phosphotyrosinphosphatasen. *In vivo* ist das Substrat der beiden Phosphatasen PTP 1B und SHP-2 in erster Linie das Insulin und der IGF-1-Rezeptor. So konnte durch enzymkinetische Messungen an Rekombinanten dieser Phosphatasen gezeigt werden, dass nanomolare Zinkkonzentrationen ausreichen, um Phosphotyrosinphosphatasen zu inhibieren. Zusätzlich zu dieser Erkenntnis konnte gezeigt werden, dass Chelatierung der eingesetzten  $Zn^{2+}$ -Ionen durch apo-Metallothionein diese Inhibition wieder aufhebt. In C6- Ratten-Gliomazellen kann eine von Insulin und IGF-1 ausgelöste Tyrosinphosphorylierung durch Chelatierung der intrazellulären Zinkionen mittels des spezifischen und membranpermeablen Zinkchelator TPEN vollständig unterdrückt werden und zeigt damit, dass endogene Zinkkonzentrationen ausreichen, um eine Inhibition von Phosphotyrosinphosphatasen hervorzurufen (Haase und Maret 2003). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass Zink einen Einfluss auf die zelluläre Signaltransduktion hat und weiterführende Untersuchungen müssen zeigen, ob es sich bei den festgestellten Zinkwirkungen unter Umständen um die Wirkungen eines „second messenger“-Moleküls handelt.

### 2.5.8.3 Ca/Zn-Crosstalk

Auf der Ebene der Nahrungsmittel sind Wechselwirkungen zwischen Calcium und Zink schon seit längerem bekannt. So verhindert durch die Nahrung aufgenommenes Calcium zum Beispiel die Zinkabsorption (Oberleas et al. 1966). Auch wird bei Zinkmangelerkrankungen der erste limitierende Schritt in der Zinkaufnahme einem Defekt in der Calciumaufnahme über die Plasmamembran zugeschrieben (O'Dell 2000). Es ist dann auch nicht verwunderlich, dass diese beschriebenen Wechselwirkungen sich bis auf die molekulare Ebene fortpflanzen. So beeinflussen intrazelluläre Calciumkonzentrationen die Zinkverteilung in der Zelle, da eine Mobilisierung von Calcium die Produktion von Stickstoffmonoxid induziert, welches dann, wie oben beschrieben, Zink aus Metallothionein freisetzt (Pearce et al. 2000).

#### 2.5.8.4 Der „Zinc-sensing Receptor“ (ZnR)

Eine gänzlich andere Verknüpfung des Ca/Zn-Crosstalks fanden Hershinkel et al. (2001) bei Untersuchungen an humanen Dickdarmkrebszellen (HT29-Cl). Sie konnten zeigen, dass mikromolare Konzentrationen an extrazellulärem Zink eine massive Calcium-Freisetzung aus Thapsigargin- und ATP-sensitiven, intrazellulären Speichern hervorrufen. Diese Calcium-Freisetzung konnte durch den spezifischen PLC-Inhibitor U73122, sowie durch die Blockierung des IP<sub>3</sub>-Rezeptors mit Diphenylborsäure-2-aminoethylester (2-APB) unterbunden werden. Hierdurch konnte belegt werden, dass die Bildung von 1,4,5-triphosphat für die Zink-abhängige Calcium-Freisetzung erforderlich ist. Da ein Zinkeinstrom in die Zelle dabei nicht detektiert wurde, musste das extrazellulär vorhandene Zink die Freisetzung hervorgerufen haben. Außerdem zeigten dann weitere Versuche, dass die intrazelluläre Calcium-Freisetzung zinkspezifisch war und durch kein anderes verwendetes Metall (Mn, Fe, Cu, Ni) ausgelöst werden konnte. Da diese Calcium-Freisetzung auch nicht durch die Verwendung von Pertussis Toxin initiiert werden konnte, wurde eine Beteiligung von G<sub>o</sub>- und G<sub>i</sub>-Proteinen an diesem Prozess ausgeschlossen.

Diese Ergebnisse wiesen auf einen G<sub>q</sub>-Protein gekoppelten Zinc-sensing Receptor (ZnR) hin, der Veränderungen in der extrazellulären Zinkkonzentration wahrnimmt und anschließend die Freisetzung von intrazellulärem Calcium veranlasst.

Abschließende Versuche konnten zeigen, dass der Calcium-sensing receptor nicht durch Zink aktiviert werden konnte, wodurch diese beiden Rezeptoren als strukturell und funktional unterschiedlich angesehen werden können. Ebenfalls konnte der ZnR in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden, darunter normale und immortalisierte Keratinozyten sowie Speicheldrüsenzellen. Die durch die ZnR-vermittelte Ca<sup>2+</sup>-Ausschüttung hervorgerufene Ansäuerung des Cytosols, wird durch eine gesteigerte Aktivität des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauschers ausgeglichen.

Durch die gezeigten Eigenschaften könnte dem ZnR die Rolle des „missing link“ zwischen extrazellulären Zinkkonzentrationen und fundamentalen zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Wachstum zukommen. Obwohl von Hershinkel et al. (2001) in diesem Fall kein Zinkeinstrom in das Cytosol detektiert wurde, könnte Zink natürlich durch die Membran gelangen und im Cytoplasma durch Kontrolle der Phosphorylierung (siehe 5.8.1 und 5.8.2) seine Wirkung auf Proteine entfalten. Damit bleibt die Frage, ob Zink an sich der Träger eines biologischen Signals ist. Wenn Zink ein solches Potential hätte, bräuchte es ein System, das seine extra- und intrazellulären Konzentrationen kontrolliert. Proteine und Mechanismen, die den Zinktransport, die Zinkverteilung und die Zinkspeicherung übernehmen, wurden weiter oben bereits ausführlich diskutiert. Die Forschungsergebnisse der folgenden Jahre werden zeigen, ob Zink die Kapazität eines Signalmoleküls hat und ob seine Wechselwirkungen mit anderen Metallionen, mit dem Redox-Metabolismus verbunden sind (Maret 2001, Burdette und Lippard, 2003).

### 2.5.9 Zinkeinfluss auf das Immunsystem

Fast ein Viertel der vorhandenen Literatur über Zink befasst sich mit dessen Wirkung auf das Immunsystem und zeigt damit die physiologische Bedeutung dieses Metalls. Von Rink und Gabriel (2000, 2001) konnte gezeigt werden, dass zahlreiche immunologische Funktionen von der freien Verfügbarkeit von Zinkionen im Plasma abhängen bzw. beeinflusst werden. Daher spielt der im vorherigen Abschnitt beschriebene Einfluss von Zink auf die Signaltransduktion, oder dessen mögliche Funktion als second messenger, gerade im Bezug auf Leukozyten, eine tragende Rolle. Für die Medizin sind die Auswirkungen von Zinkmangel bei *Acrodermatitis enteropatica*, einer autosomal rezessiv vererbten Störung der Zinkaufnahme, von größtem Interesse. Bei dieser Krankheit, die unbehandelt innerhalb weniger Jahre zum Tod führt, kommt es zu einer hohen Anfälligkeit für virale-, bakterielle- und Pilzinfektionen, die aber durch Verabreichung von Zink vollständig unterdrückt werden können (Nelder und Hambidge 1975). Arbeiten, die als Ziel die Identifikation der durch Zink beeinflussten Zelltypen hatten, konnten zeigen, dass Monozyten durch Zink aktiviert werden (Driessen et al. 1994, 1995a). weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Interleukin-1 (IL-1) abhängige T-Zell-Stimulation (Wellinghausen et al. 1997) und die allogene T-Zell-Reaktion durch Zink inhibiert werden (aCampo et al. 2001). Im Bezug auf Monozyten konnte in systematischen Studien der letzten Jahre gezeigt werden, dass es durch die Zugabe von Zink in der Zellkultur zu einer Stimulation von Monozyten unter Beteiligung von Insulin und Cyclonukleotid-Signalen kommt und dadurch nachgeschaltete Zelltypen aktiviert werden (Wellinghausen et al. 1996a,b,c). Im Einzelnen kam es nach Zink-Inkubation von Monozyten zu einer Verstärkung der Interleukin-1-, Interleukin-6- und TNF $\alpha$ -Ausschüttung, was in gemischten Kulturen dann zu einer Stimulation von Lymphozyten und damit zu einer Sekretion von Interferon- $\gamma$  und löslichem Interleukin-2-Rezeptors führt. Das Ausmaß der zinkinduzierten Aktivierung von Monozyten wird durch die Konzentration und die Zusammensetzung des Mediums beeinflusst (Driessen et al. 1995b).

### 2.5.10 Zink und Alzheimer's Disease

Alzheimer's Disease (AD) ist die am weitesten verbreitete alterungsabhängige neurodegenerative Störung und der häufigste Grund für Gedächtnisverlust überhaupt. Auf der ganzen Welt sind 10% aller Menschen über 60 Jahren davon betroffen und in den Vereinigten Staaten sind dies über 4 Millionen Amerikaner (Bush und Tanzi, 2002). Alzheimer wird durch Amyloid-Ablagerungen (A $\beta$ ) im neokortikalen Parenchym und im Durchblutungssystem des Gehirns charakterisiert. Der Hauptbestandteil dieser, überwiegend extrazellulären, Ansammlungen ist das A $\beta$ -Protein. A $\beta$  wird vom ubiquitär exprimierten Vorgänger-Protein, dem amyloid precursor protein (APP), einem integralen Glycoprotein der Membran vom Typ 1, abgespalten. Es gibt begründete Hinweise dafür, dass die Zinkhomöostase in Alzheimer-Patienten empfindlich gestört ist,

und dass es gleichzeitig zu einer anomal hohen intrazellulären Mobilisation von Zink kommt (Huang et al. 2000).

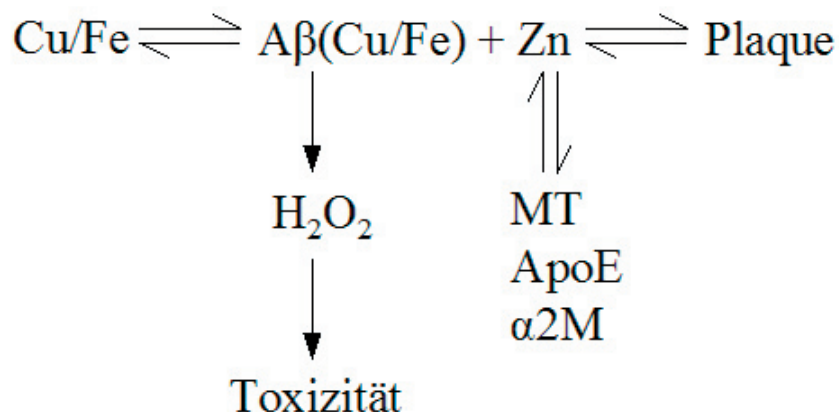
Nachdem Seubert et al. (1992) zeigten, dass es sich bei A $\beta$  um einen löslichen Bestandteil von biologischen Flüssigkeiten handelt, fällten Bush et al. (1994a,b) das A $\beta$ -Protein *in vitro* mit physiologisch vorkommenden Zinkkonzentrationen zu proteaseresistenten amyloidähnlichen Aggregaten aus. Der Histidinrest 13 ist der eigentliche Angriffspunkt bei dieser zinkvermittelten Aggregation im Menschen (Liu et al. 1999). In Ratten und Mäusen ist dieser spezielle Histidinrest durch einen Argininrest substituiert und es kommt unter physiologischen Bedingungen nicht zur zinkinduzierten Fällung von A $\beta$  (Bush et al. 1994b). Dieser Umstand könnte auch erklären, warum es in Ratten und Mäusen nicht zur Einlagerung cerebraler A $\beta$ -Amyloiden kommt (Vaughan und Peters 1981).

Obwohl Zink das einzige physiologisch vorhandene Metallion ist, das bei pH 7.4 in der Lage ist, A $\beta$  auszufällen, erreichen Cu $^{2+}$  (welches eine sehr hohe Affinität zu A $\beta$  aufweist) und Fe $^{3+}$  (welches eine sehr geringe Affinität zu A $\beta$  aufweist) ebenfalls eine leichte Aggregation von A $\beta$ , die durch azide Umgebungen verstärkt werden kann (Atwood et al. 1998, 2000). Durch selektive Bindungsstellen ist A $\beta$  in der Lage Zn $^{2+}$  und Cu $^{2+}$  gleichzeitig zu binden. Bei einer Parallelinkubation mit diesen beiden Metallionen kommt es zu einer zinkinduzierten Inhibition, der durch Kupfer vermittelten H $_2$ O $_2$ -Produktion und der A $\beta$ -Toxizität (Lovell et al. 1999, Cuajungco 2000). Trotz der hohen Zinkkonzentrationen in A $\beta$ -Aggregaten von ca. 1 mM (Lovell et al. 1998) ist die Menge an, durch Oxidation hervorgerufenen, Basensubstitutionen anormal erhöht. Dieser Umstand zeigt, dass die durch Zink inhibierte H $_2$ O $_2$ -Produktion nicht ausreicht, um eine Schädigung des Gewebes zu verhindern (Cuajungco 2000). Die durch Zink induzierte Fällung von synthetischem A $\beta$  *in vitro* kann durch Chelatierung der Metallionen vollständig rückgängig gemacht werden (Huang et al. 1997b, Atwood et al. 1998). Durch Entzug von Zn $^{2+}$  und Cu $^{2+}$  aus Homogenisaten von Alzheimer-positiven Hirnzellen lösen sich bereits gebildete A $\beta$ -Ablagerungen auf (Cherny et al. 1999).

Obwohl A $\beta$  ubiquitär im gesamten Gehirn produziert wird, kommt es nur im Neocortex zu A $\beta$ -Ablagerungen. Auf der histologischen Ebene zeigt sich, dass diese Ablagerungen mit Synapsen und der cerebrovaskulären Lamina verbunden sind. Diese Erkenntnisse deuten auf spezielle und ausgeprägte chemische Interaktionen hin, die nur in diesen Mikroregionen eine Einlagerung von A $\beta$  zulassen. Die extrazelluläre Konzentration an Zink kann hier während der synaptischen Transmission bis zu 300  $\mu$ M erreichen (siehe 5.7.1) und ist damit weit höher als in jedem anderen extrazellulären Bereich im Körper (Frederickson und Bush (2001).

Lee et al. (2002) berichten von einer auffallend starken Abnahme der A $\beta$ -Ablagerungen in Gehirnen von transgenen Mäusen, denen der synaptische Zinktransporter ZnT3 fehlt (siehe 3.1). Mit dieser Erkenntnis liefern sie den Beweis dafür, dass die für Alzheimer charakteristische Amyloid-Neuropathologie hauptsächlich durch Zinkfreisetzung während der Neurotransmission ausgelöst wird. Im Speziellen scheint der durch Zink hervorgerufene Niederschlag von A $\beta$  durch die Inhibition eines energieabhängigen Mechanismus initiiert

zu werden, der im gesunden Gehirn dafür sorgt, dass ausgeschüttete Zinkionen wieder in die Synapse aufgenommen werden (Howell et al. 1981). Ebenfalls konnten in weiblichen transgenen Ratten verstärkte Ansammlungen von Amyloiden gefunden werden, die auf einer altersabhängig gesteigerten Menge von synaptischem Zink beruhen (Lee et al. 2002). Diese Ergebnisse könnten in der Zukunft zur Klärung der Frage beitragen, warum Frauen, auch nach Korrektur der Lebenserwartung, deutlich häufiger an Alzheimer erkranken als Männer. Auch ist in weiblichen Patienten die altersabhängige Hyperaktivität des ZnT3-Transporters, welche zu einer exzessiven Zinkfreisetzung führt, deutlich höher als in männlichen (Lovell et al. 1998). In Alzheimer-Patienten scheint eine Kombination mehrerer Faktoren die Zinkkonzentration im extrazellulären Raum zu erhöhen. So wurde von Anomalitäten in der Menge an Metallothioneinen in Alzheimer-Patienten berichtet, die zu einer Ansammlung von extrazellulären Metallionen führen (Frederickson und Bush 2001). Besonders Metallothionein III tritt speziell in ZnT3-positiven Neuronen auf (Masters et al. 1994) und ist in Alzheimer-Patienten mengenmäßig merklich reduziert (Uchida et al. 1991). Zusätzlich wird Zink durch den Einfluss von  $H_2O_2$  vom Apolipoprotein E (ApoE) (Moir et al. 1999) und dem  $\alpha$ -2-macroglobulin ( $\alpha$ 2M) (Du et al. 1997) sequestriert, was wiederum zur erhöhten extrazellulären Zinkansammlung beiträgt. All diese Erkenntnisse über den Einfluss von Zink auf die Bildung von  $\beta$ -Amyloid-Plaques lassen sich in einem Schema gemeinsam darstellen:



**Abb. 2.5.10: Faktoren in der Bildung von  $\beta$ -Amyloid-Plaques.** Ablagerungen existieren in einem konzentrationsabhängigen Gleichgewicht zwischen freiem  $Zn^{2+}$  und löslichem  $A\beta$  ( $A\beta$  kann zu einem gewissen Teil auch an  $Cu^{2+}$  und  $Fe^{3+}$  gebunden werden). Faktoren, die die Zinkkonzentration beeinflussen, sind dargestellt. Zinkionen werden durch synaptische Aktivität der glutamergen Fasern und des corticofugalen Systems, das bei Frauen eine verstärkte Aktivität aufweist, freigesetzt. Zink wird dann durch einen energieabhängigen Aufnahmeprozess in das Neuron re-assimiliert. Zusätzlich kann  $Zn^{2+}$  von Apolipoprotein E (ApoE),  $\alpha$ -2-macroglobulin ( $\alpha$ 2M) und Metallothioneinen (MT) sequestriert werden. Der oxidative Einfluss des von  $A\beta$  generierten Überschusses an  $H_2O_2$  inhibiert die Fähigkeit verschiedener biochemischer Faktoren, die freie Konzentration an Zinkionen zu senken. Während des Alterungsprozesses steigen ebenfalls die Cu- und Fe-Level und bei Frauen kommt es zusätzlich zu einer gesteigerten synaptischen Zinkfreisetzung (verändert nach: Bush und Tanzi 2002).

Erste Erfolge in dem Versuch Alzheimer zu heilen bzw. das Krankheitsbild in einem frühen Stadium zu arretieren, wurden nun, zumindest in Mäusen, durch den membranpermeablen Zinkchelator Clioquinol (CQ) erzielt. Doch die Aussagen über seinen genauen Wirkungsmechanismus bzw. seine Angriffspunkte im Heilungsprozess sind noch nicht bekannt. Während Cherny et al. (2001) in Tg2576-Mäusen von einem deutlichen Rückgang der A $\beta$ -Ablagerungen um 49% nach neunwöchiger oraler Gabe von Clioquinol sprechen, in denen gleichzeitig eine deutliche Verbesserung des Gesundheitszustandes auftrat, ergaben Untersuchungen von Nitzan et al. (2003) an CD-1-Mäusen, dass eine orale Gabe zumindest nicht die chelatierbaren Zink-Pools beeinflusst. Erst die intraperitoneale Injektion von Clioquinol zeigte eine dramatische Reduktion an chelatierbarem Zink (Nitzan et al. 2003). Ob ein positiver Effekt auf den Verlauf der Krankheit von CQ mit der Chelatierung von Zink zusammenhängt, oder ob hier ein grundsätzlich anderer Mechanismus zu Grunde liegt, müssen weitere Untersuchungen in der Zukunft klären.

#### 2.5.11 Zink und Alterung

Der Einfluss des essenziellen Spurenelements Zink auf den physiologischen Alterungsprozesses, bzw. dessen direkte Beteiligung daran, wurde in der Vergangenheit fast ausschließlich in der Immunologie untersucht. Obwohl die Aktivierung einzelner, für den physiologischen Alterungsprozess wichtige, Signalwege nach Inkubation mit Zink von vielen Arbeitsgruppen untersucht wurde, fehlt immer noch eine Übersicht der betroffenen Signalkaskaden. Vielen dieser Ergebnisse wurde bis jetzt eine fast ausschließlich toxische Bedeutung zugesprochen. Neuere Studien zeigen jedoch, dass das intrazelluläre freie Zink mit großer Wahrscheinlichkeit ein notwendiger Bestandteil der Signaltransduktion ist (Haase und Maret 2003, Samet et al. 2003). Während des physiologischen Alterungsprozesses kommt es im Gehirn, basierend auf der „Free radical theory of aging“, zu einer Anhäufung reaktiver Sauerstoff Spezies (ROS) und zu einer erhöhten Anfälligkeit für oxidativen Stress (Poon et al. 2004). Die Konzentration an freiem zellulärem Zink ist nicht konstant, sondern fluktuiert. Der proteingebundene Teil des zellulären Zinks kann durch Oxidation freigesetzt werden und es wurde gezeigt, dass auf diese Weise der Redoxstatus der Zelle den Gehalt an freiem Zink aus dem Zink-Speicherproteinen Metallothionein (MT) reguliert (Berendji et al. 1997, Turan et al. 1997, Maret und Vallee 1998, Pearce et al. 2000). Die Fluktuation an freiem Zink ist aufgrund einer zunehmenden Überexpression von MT III in jungen Zellen weitaus ausgeprägter als in adulten- bzw. seneszenten Zellen (Mocchegiani et al. 2000, Giacconi et al. 2003, Poon et al. 2004). Als eine der wohl wichtigsten Verbindungen im Hinblick auf den physiologischen Alterungsprozess in Hirnzellen könnte sich das Vorhandensein des Zinc-sensing Receptor erweisen. Aktiviert durch neuronale Konzentrationen von Zink, löst der ZnR eine intrazelluläre Freisetzung von Calciumionen aus, für die eine Modulation des zellulären Redoxstatus und ein Einfluss auf den



physiologischen Alterungsprozess bekannt ist (Pearce et al. 2000, Hershinkel et al. 2001).

Auf diesen Punkt soll, bedingt durch die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse, unter 4.4 genauer eingegangen werden.

## 2.6 Fragestellung

Die vorherigen Abschnitte haben einen Überblick der zahlreichen Funktionen von Zink vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass der zelluläre Zinkgehalt nicht nur stark reguliert wird, sondern an einer großen Menge von Signalprozessen beteiligt ist. Aus diesem Grund soll die vorliegende Arbeit einen Beitrag zum besseren Verständnis der an der Zinkhomöostase beteiligten intrazellulären Signalwege leisten. Eine vollständige Untersuchung der Zink-modulierten Signaltransduktion würde jedoch den Rahmen dieser Arbeit überschreiten, somit wurden hauptsächlich Signalwege untersucht, für die sich eine Beteiligung an der Zinkhomöostase, aufgrund vorliegender Literatur, vermuten lässt. Anhand der folgenden Punkte soll zum einen die Beteiligung von Zink an grundlegenden, zellulären Signalprozessen geklärt werden. Zum anderen sollen ebenfalls Signalprozesse untersucht werden, die den zellulären Zinktransport und damit die Zinkhomöostase beeinflussen.

- 1) Es sollen in dieser Arbeit Signalwege untersucht werden, die den zellulären Zinkgehalt regulieren. Aus diesem Grund soll zuerst die Zinkaufnahme in C6-Zellen in Bezug auf die extrazelluläre Konzentration und Dauer der Zinkinkubation gemessen werden.
- 2) Basierend auf 1) soll untersucht werden, in welchen Konzentrationen Zink in C6-Zellen cytotoxisch wirkt und ob die Konzentration durch Einsatz von Ionophoren beeinflusst wird.
- 3) Im Mittelpunkt weiterer Versuche stehen Signalwege, für die Anhaltspunkte einer regulatorischen Funktion in der Zinkhomöostase existieren. Der Fokus liegt hier auf dem Cyclonucleotid-Stoffwechsel sowie ausgesuchten Enzyme. Im speziellen sollen die cGMP/PKG- und cAMP/PKA-Signalwege sowie die PLC, PKC und die Enzymklasse der Cyclonucleotid-Phosphodiesterasen untersucht werden. Außerdem soll in weiteren Experimenten festgestellt werden, ob Gliomazellen über den „Zinc-sensing Receptor“ verfügen und damit ein direkter Zusammenhang zwischen extrazellulären Zinkkonzentrationen und intrazellulärer Calcium-Freisetzung besteht.
- 4) Abschließend soll der Einfluss der Translation sowie der Histon-Acetylierung auf den Gesamtzinkgehalt untersucht werden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Cytotoxizität von $\text{ZnCl}_2$

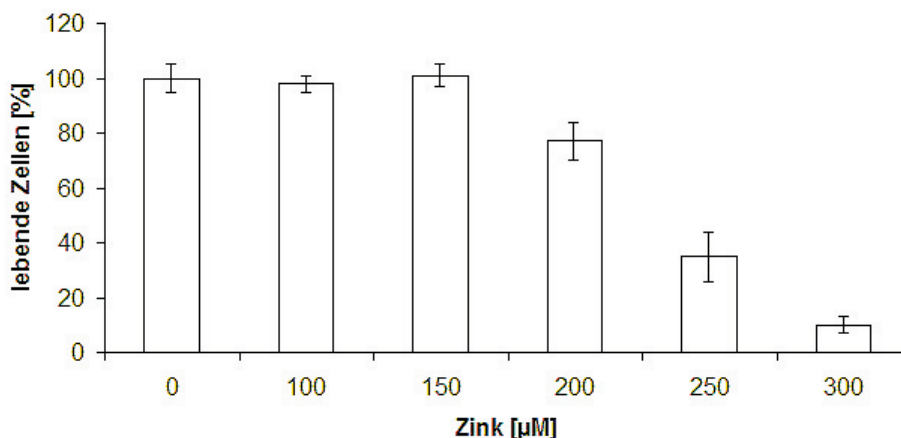
Um optimale Versuchsbedingungen für alle folgenden Experimente zu gewährleisten wurde in diesem Versuch die cytotoxische Wirkung von Zinkchlorid untersucht. Es wurden damit gleichzeitig die in der Literatur für Experimente mit C6-Zellen verwendeten Zinkkonzentrationen überprüft. Zinkkonzentrationen die bei chronischer Exposition über 24h den apoptotischen Zelltod auslösen, wirken bei den weitaus kürzeren Inkubationsversuchen dieser Arbeit zwar nicht akut cytotoxisch, stellen aber einen Stressfaktor dar, auf den die Zellen reagieren müssen um sich vor der Langzeittoxizität zu schützen. Damit solche Schutzmechanismen keinen, oder nur einen geringen, Einfluss auf die hier durchgeführten Inkubationsversuche haben, ist eine genaue Untersuchung dieses Sachverhaltes vonnöten und es wurden zwei verschiedene Wege zur Bestimmung der chronischen Cytotoxizität von Zink gewählt.

Zur Untersuchung der toxischen Wirkung von extrazellulärem Zink wurde die Überlebensrate von C6-Zellen mit den in Tab. 5.2.2.1a und 5.2.2.1b angegebenen Zinkchloridkonzentrationen und Zeiträumen gemessen.

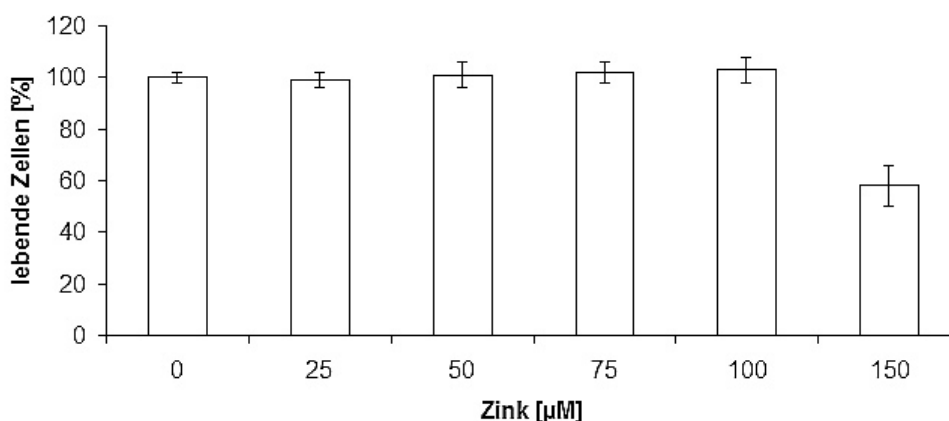
##### 3.1.1 Neutralrottest

Bei einer ein- und zweistündigen Inkubation mit  $500 \mu\text{M ZnCl}_2$  konnte keine cytotoxische Wirkung von Zinkchlorid festgestellt werden. Die Anzahl der überlebenden Zellen lag nach einer einstündigen Inkubation mit der oben genannten Zinkchloridkonzentration bei 110% und nach zweistündiger Inkubation bei 103%. Erst eine Verlängerung der Inkubationszeit auf drei Stunden, zeigt eine cytotoxische Wirkung von  $\text{ZnCl}_2$  oberhalb einer Konzentration von  $150 \mu\text{M}$ . Die Ergebnisse in Abb. 3.1.1a zeigen, dass bei einer  $\text{ZnCl}_2$ -Konzentration von  $200 \mu\text{M}$  die Überlebensrate nur noch bei 77% liegt.

Eine Verlängerung der Inkubationszeit von zwei auf drei Stunden hatte eine Verschiebung der verträglichen Zinkkonzentration von  $500 \mu\text{M}$  auf  $150 \mu\text{M}$  ergeben. Jedoch brachte eine deutliche Verlängerung der Inkubationszeit auf 24 Stunden nur noch eine geringe Verschiebung in Richtung noch niedrigerer Konzentrationen. Wie die Ergebnisse in Abb. 3.1.1b zeigen, vermag eine Zinkkonzentration von  $100 \mu\text{M}$  keinen Schaden innerhalb einer 24-stündigen Inkubationsperiode anzurichten, erst eine Konzentration von  $150 \mu\text{M}$  lässt die Überlebensrate der C6-Zellen auf 58% absinken.



**Abb. 3.1.1a: Cytotoxizität von Zinkchlorid nach dreistündiger Inkubation.** Dargestellt ist die durch einen Neutralrottest ermittelte Überlebensrate von C6-Zellen. Die verwendeten Konzentrationen sind angegeben, und die Inkubationszeit betrug jeweils drei Stunden. Die dargestellten Balken geben die mittlere intrazelluläre Zinkkonzentration unter Berücksichtigung des Standardfehlers aus jeweils neun Messungen ( $n=9$ ) an.



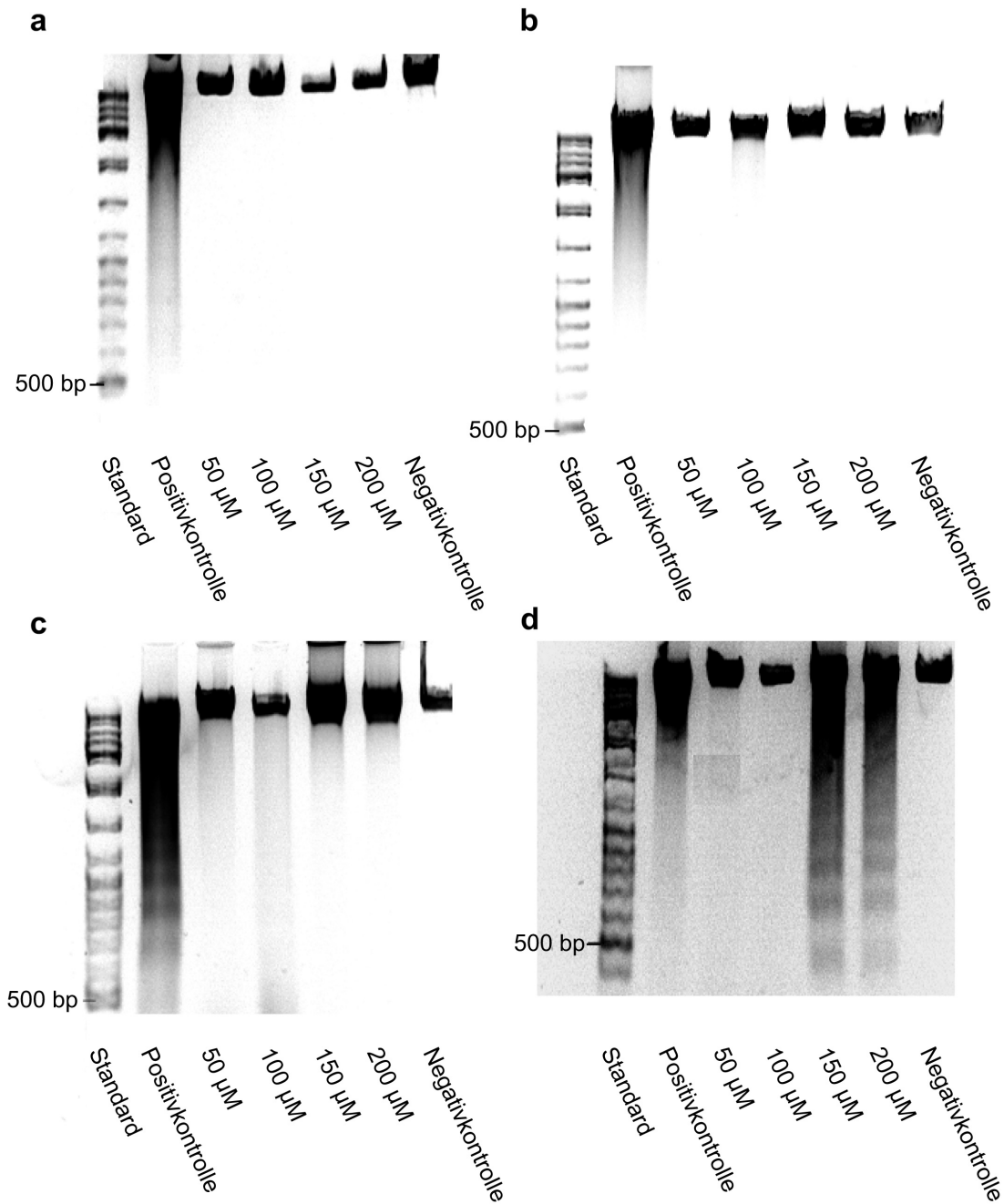
**Abb. 3.1.1b: Cytotoxizität von Zinkchlorid nach 24-stündiger Inkubation.** Dargestellt ist die durch einen Neutralrottest ermittelte Überlebensrate von C6-Zellen. Die verwendeten Konzentrationen sind angegeben, und die Inkubationszeit betrug jeweils 24 Stunden. Die dargestellten Balken geben die mittlere intrazelluläre Zinkkonzentration unter Berücksichtigung des Standardfehlers aus jeweils neun Messungen ( $n=9$ ) an.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine zeit- und konzentrationsabhängige cytotoxische Wirkung von Zinkchlorid existiert. Hohe Konzentrationen von 500  $\mu\text{M}$  werden über kurze Zeiträume von ein bis zwei Stunden vertragen, aber nach drei Stunden sinkt die höchste verträgliche Konzentration auf 150  $\mu\text{M}$  ab. Diese Konzentration verschiebt sich dann aber bei deutlich längerer Inkubationsdauer nur noch gering und liegt nach 24 Stunden bei 100  $\mu\text{M}$ .

### 3.1.2 DNA-Fragmentierung

Bei einer Inkubationsdauer von 4, 12 und 24 Stunden ließ sich bei den eingesetzten Zinkkonzentrationen (50, 100, 150, 200  $\mu\text{M}$ ) keine apoptosecharakteristische DNA-Fragmentation detektieren. Ausschließlich der Einsatz von Wasserstoffperoxid (500  $\mu\text{M}$ ) als Positivkontrolle lieferte das charakteristische Bandenmuster (Abb. 3.1.2a, 3.1.2b und 3.1.2c). Während auch bei einer Inkubationsdauer von 48 Stunden die beiden niedrigen Zinkkonzentrationen von 50 und 100  $\mu\text{M}$  ohne DNA-Leiter-Muster bleiben, finden sich bei den beiden hohen eingesetzten Zinkkonzentrationen von 150 und 200  $\mu\text{M}$  apoptosecharakteristische DNA-Fragmente. Wie erwartet liefert auch hier der Einsatz von Wasserstoffperoxid (500  $\mu\text{M}$ ) ein positives Ergebnis (Abb. 3.1.2d).

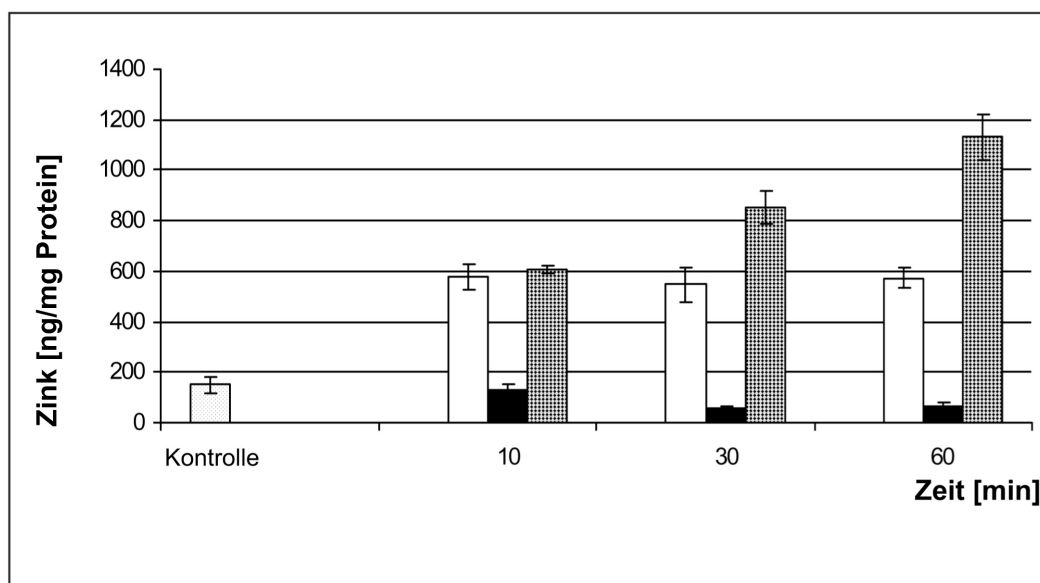
Die kleinste chronische Zinkkonzentration liegt bei der DNA-Fragmentierung, im Gegensatz zu den Ergebnissen des Neutralrottests, bei 150  $\mu\text{M}$  extrazellulär zugegebenem Zink und liegt damit ebenfalls höher als die in der Literatur angegebenen Werte (Haase und Beyersmann 1999). Die Unterschiede der Zinkverträglichkeit liegen in diesem Fall aller Wahrscheinlichkeit nach am Subklon der verwendeten C6-Zelllinie. Für die meisten der in dieser Arbeit durchgeführten Inkubationsversuche wurde daher eine extrazelluläre Konzentration von 150  $\mu\text{M}$  Zink gewählt, um einen Stimulus für den verstärkten Zinkexport zu setzen. Die durchschnittliche physiologische Konzentration an freiem Zink im Medium liegt bei den hier verwendeten C6-Zellen bei ca. 50  $\mu\text{M}$ . Insofern zeigen auch die oben aufgeführten Ergebnisse der Gelelektrophorese, wie erwartet, keine Wirkung dieser Zinkkonzentration auf die DNA-Fragmentation. Ebenfalls keine proapoptotische Wirkung hatte eine Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Zink im Medium. Da in diesem Fall aber im Neutralrottest sowie in der Literatur ein gegensätzliches Ergebnis vorliegt, muss diese Zinkkonzentration als Grenzwert aufgefasst werden und eignet sich daher nicht als physiologische Referenz zur Inkubation dieser Zelllinie. Da in den folgenden Inkubationsversuchen die gewählten Inkubationszeiten zum größten Teil zwischen 30 Sekunden und 90 Minuten liegen, ist selbst bei der Verwendung einer hohen Zinkkonzentration von 150  $\mu\text{M}$  nicht von einer akuten Induktion der Apoptose auszugehen. Ebenfalls ergibt sich für diese Zinkkonzentration eine physiologische Relevanz in Gliazellen, bedenkt man, dass während der interneuronalen Signaltransduktion Konzentrationen von 300  $\mu\text{M}$  Zink im Synaptischenspalt auftreten (Frederickson 2000).



**Abb. 3.1.2a-d: Cytotoxizität von Zinkchlorid.** Dargestellt ist die durch Agarose-Gelelektrophorese ermittelte DNA-Fragmentation in C6-Zellen. Die verwendeten Konzentrationen sind angegeben. (a) Inkubationszeit von 4 Stunden, (b) Inkubationszeit 12 Stunden, (c) Inkubationszeit von 24 Stunden, (d) Inkubationszeit von 48 Stunden. Als Negativkontrolle diente isolierte DNA aus unbehandelten Zellen, bei der Positivkontrolle handelt es sich um die isolierte DNA aus Zellen, die 48 Stunden mit 500 µM 30%iger  $H_2O_2$ -Lösung inkubiert wurden. Die dargestellten Gele sind exemplarisch für drei, voneinander unabhängige, durchgeführte Aufarbeitungen.

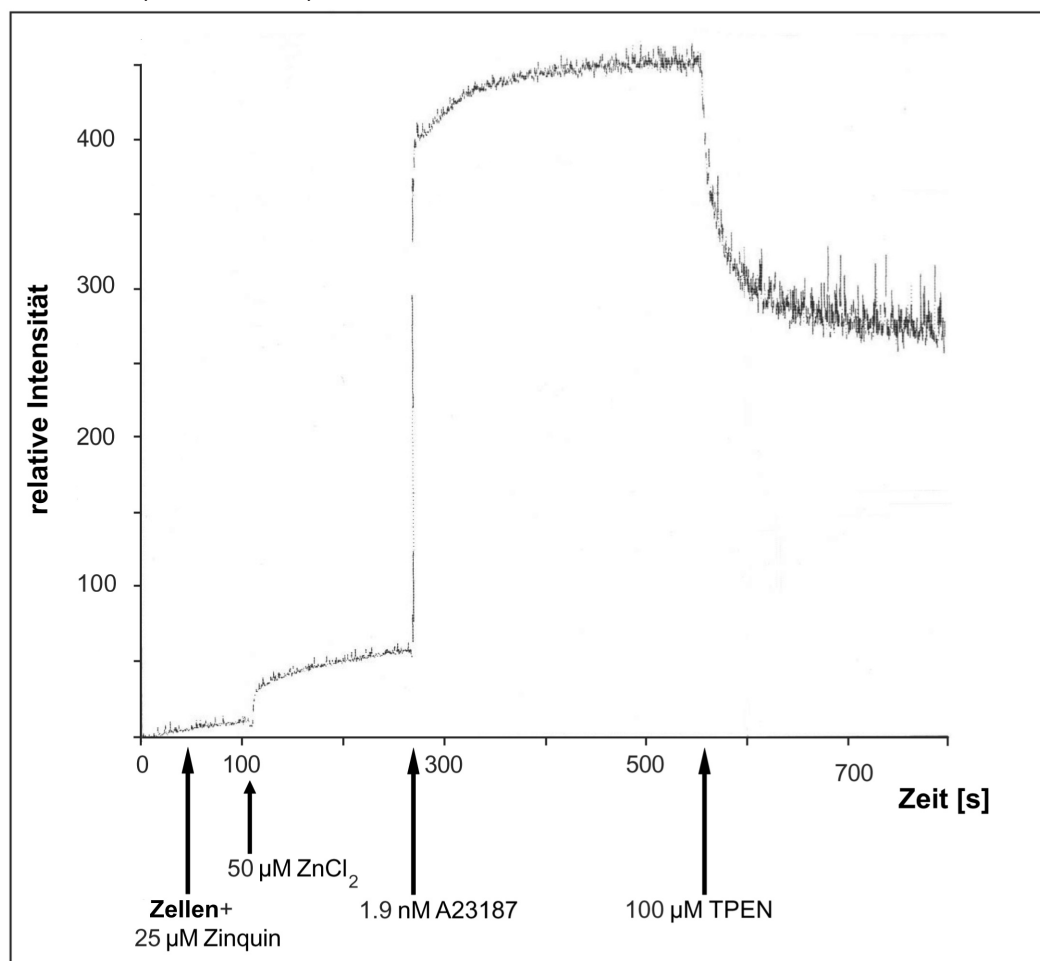
### 3.1.3 Einfluss des Calcium Ionophors A23187 auf die zinkinduzierte Apoptose

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, ist bekannt, dass gewisse Agenzien den durch hohe Zinkkonzentrationen ausgelösten programmierten Zelltod positiv sowie negativ beeinflussen können. Da in dieser Arbeit ebenfalls ein möglicher Crosstalk zwischen Zink und Calcium sowie der jeweilig aktivierten Signalwege untersucht werden sollte, wurde vorausgehend die Wirkung des Ca-Ionophors A23187 auf den Zink Influx untersucht. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass A23187 auch in der Lage, ist Zink und Mangan zu transportieren (Erdahl et al. 1996). Ob der Transport von Zink durch A23187 aber ausreicht, um mit sonst nicht-toxischen Zinkkonzentrationen Apoptose auszulösen, ist nicht bekannt. Die in der Literatur verwendeten Konzentrationen an A23187 lieferten die Obergrenze für die hier durchgeführten Inkubationsversuche (Erdahl et al. 1996, Matkovich und Woodcock 2000, Morelli et al. 2000). Um festzustellen ob A23187 in der Lage ist, den Gesamtzinkgehalt von C6-Zellen zu erhöhen, wurden diese mit 150  $\mu\text{M}$  Zink und 1.9 nM A23187 inkubiert und mit Hilfe der Atomabsorption analysiert. Abb. 3.1.3a zeigt, dass bereits nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten der Gesamtzinkgehalt der parallel mit A23187 und Zink behandelten Zellen signifikant höher ist als die Kontrolle, die nur mit Zink inkubiert wurde. Dieses Ergebnis ist nach 60 Minuten noch deutlich verstärkt (Abb. 3.1.3a).



**Abb. 3.1.3a: Einfluss von A23187 auf den zellulären Zinkgehalt.** Dargestellt ist der Gesamtzinkgehalt von C6-Zellen nach Inkubation mit 150  $\mu\text{M}$  ZnCl<sub>2</sub> (weiße Balken), 1.9 nM A23187 (schwarze Balken) und einer Kombination von 150  $\mu\text{M}$  ZnCl<sub>2</sub> und 1.9 nM A23187 (graue Balken). Die dargestellten Balken geben die mittlere intrazelluläre Zinkkonzentration unter Berücksichtigung des Standardfehlers aus jeweils neun Messungen ( $n=9$ ) an. Die Kontrolle blieb ohne Zugabe von Zink. Die dargestellten Ergebnisse sind exemplarisch für drei, voneinander unabhängig, durchgeführte Versuche.

Um festzustellen ob A23187 auch in der Lage ist das freie intrazelluläre Zink zu erhöhen, wurden fluorimetrische Untersuchungen mit der zinkspezifischen intrazellulären Sonde Zinquin-E durchgeführt. Die für diese Messung verwendeten Zellen wurden, wie unter 5.2.3.1 beschrieben, inkubiert und aufgearbeitet. Nach Zugabe von 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  lässt sich, durch Bindung von Zink an die Fluoreszenzsonde Zinquin, eine Verstärkung der intrazellulären Fluoreszenzintensität ausmachen (Abb. 3.1.3b). Die weitere Zugabe von 1.9 nM A23187 führt zu einem sprunghaften Anstieg der zinkspezifischen Fluoreszenzintensität (Abb. 3.1.3b). Durch den signifikanten Rückgang der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  TPEN, einem spezifischen, intrazellulären Zink-Chelator, konnte gezeigt werden, dass es sich hier tatsächlich um intrazelluläre, zinkspezifische Fluoreszenz handelt (Abb. 3.1.3b). Da TPEN eine höhere Affinität zu Zink hat als Zinquin, es aber nicht vermag Zink aus seiner Proteinbindungsstelle zu entziehen, handelt es sich bei den beobachteten Veränderungen um Schwankungen im Gehalt des freien Zinks (Abb. 3.1.3b).

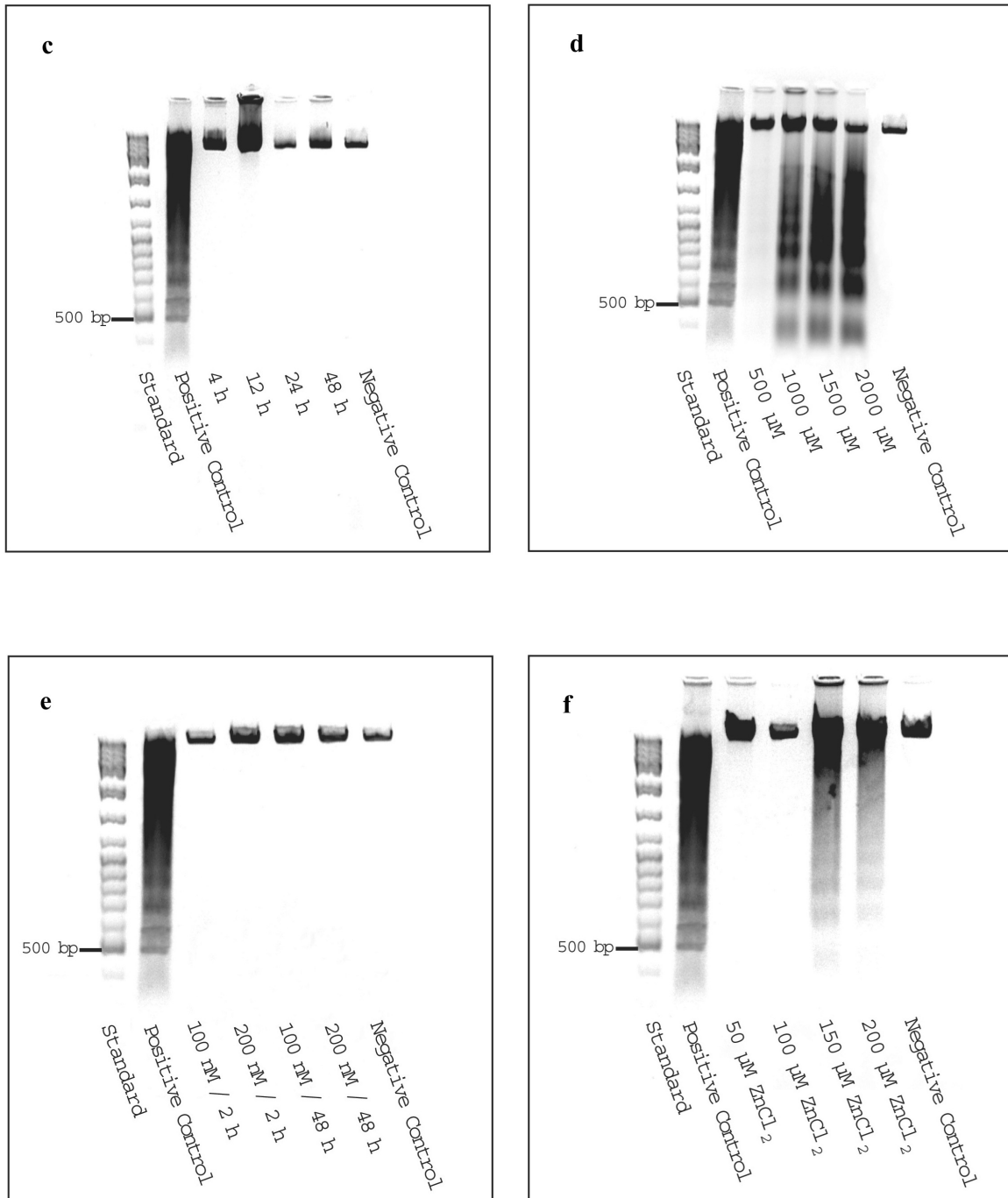


**Abb. 3.1.3b: Einfluss von A23187 auf den freien Zinkgehalt.** Dargestellt ist die fluorimetrische Messung des labilen Zinkgehalts in C6-Zellen nach Inkubation mit 25  $\mu\text{M}$  Zinquin und Zugabe von 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , 1.9 nM A23187 und 100  $\mu\text{M}$  TPEN. Die Zugabe der Reagenzien und die Aufarbeitung der Zellen erfolgte wie im Text beschrieben und unter 5.2.3.1 angegeben. Die dargestellte Messung ist exemplarisch für drei, voneinander unabhängige, durchgeführte Versuche.



Nachdem gezeigt werden konnte, dass A23187 einen Einfluss auf den Gesamtzinkgehalt sowie auf den Gehalt des freien Zinks in C6-Zellen hat, sollte nun dieser Einfluss hinsichtlich der möglichen Auslösung von Apoptose untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Zellen, wie unter 5.2.4 beschrieben, mit verschiedenen Konzentrationen an Zink, Ionophor und  $\text{H}_2\text{O}_2$  sowie einer Kombination aus Zink und Ionophor inkubiert und aufgearbeitet. Die extrahierte DNA dieser Zellen wurde dann mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese getrennt (Abb. 3.1.3c). Um der unter 3.1.2 angedeuteten Möglichkeit eines Subklons mit veränderter Zinktoleranz Rechnung zu tragen, wurden zuerst Untersuchungen zur Zink- und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Toleranz durchgeführt. Konzentrationen von 50, 100, 150, 200 und 250  $\mu\text{M}$  Zink waren über einen Zeitraum von 4 bis 48 Stunden nicht in der Lage, Apoptose auszulösen. Aufgrund der fehlenden Aussagekraft dieser Ergebnisse, soll hier nur das Agarose-Gel mit der höchsten Zinkkonzentration abgebildet werden (3.1.3.c). Im Hinblick auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Toleranz zeigte sich, im Gegensatz zu Ergebnissen von Wätjen (2001) der in gleichen Zelllinie die kleinste apoptoseauslösende Konzentration bei 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  fand, ein deutliches Bandenmuster ab einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  und einer Inkubationsdauer von 48 Stunden (3.1.3.d). Eine Inkubation mit 100 bzw. 200 nM A23187 für wiederum 48 Stunden war, wie schon die unter 3.1.3.c getesteten Zinkkonzentrationen, nicht in der Lage Apoptose auszulösen (3.1.3.e). Die parallele Gabe von jeweils 100 nM A23187 und 50, 100, 150 sowie 200  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  für 48 Stunden löst hingegen ab einer Konzentration von 150  $\mu\text{M}$  Zink die apoptosebedingte DNA-Fragmentation aus (3.1.3.f).

Während weder Konzentrationen von 100 nM A23187 noch von 150  $\mu\text{M}$  Zink in der Lage sind, bei einer alleinigen Inkubation über einen Zeitraum von 48 Stunden programmierten Zelltod auszulösen, so wird bei paralleler Gabe dieser Konzentrationen Apoptose initiiert (Jansen et al. 2003). Die aus 3.1.3 erlangten Kenntnisse zeigen ebenfalls, dass weder A23187 noch Zink mit den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen in der Lage sind, programmierten Zelltod auszulösen.



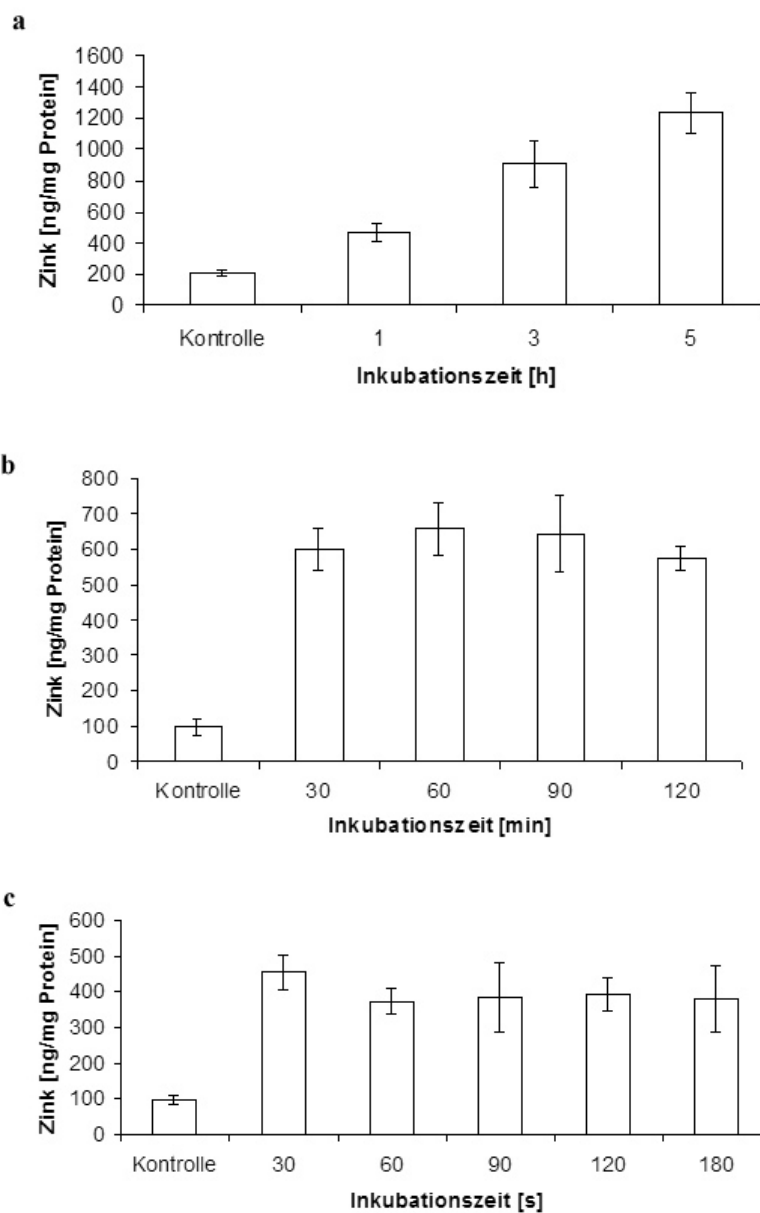
**Abb. 3.1.3c-f:** Untersuchungen zur Rolle von A23187 in der zinkinduzierten Apoptose. Dargestellt ist die durch Agarose-Gelelektrophorese ermittelte DNA-Fragmentation in C6-Zellen. Die verwendeten Konzentrationen und Inkubationszeiten sind angegeben. (c) Inkubation mit  $250 \mu\text{M ZnCl}_2$ , (d) Inkubation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  für 48 Stunden, (e) Inkubation mit A23187, (f) Parallele Inkubation mit  $100 \text{ nM A23187}$  und Zink für 48 Stunden. Als Negativkontrolle diente isolierte DNA aus unbehandelten Zellen. Bei der Positivkontrolle handelt es sich um die isolierte DNA aus Zellen, die 48 Stunden mit  $1000 \mu\text{M}$  30%iger  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung inkubiert wurden. Die dargestellten Gele sind exemplarisch für drei, voneinander unabhängige, durchgeführte Aufarbeitungen.

### 3.2 Zinkaufnahme in C6-Zellen

Um die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche auf eine möglichst kurze Inkubationsdauer zu beschränken, wurde, nach vorausgehender Klärung der cytotoxischen Zinkkonzentration (siehe 3.1), die zeitliche Aufnahme von Zink mittels Atom-Absorptionsspektrometrie untersucht. Da bei Applikation von hohen Zinkkonzentrationen und paralleler Gabe von Aktivatoren bzw. Inhibitoren nicht ausgeschlossen werden kann, dass bei andauernder Einwirkung weitaus mehr Signalwege beeinflusst werden als die zu untersuchenden, soll hier gezeigt werden, wie schnell C6-Zellen in der Lage sind, Zink aufzunehmen. Der aus diesen Versuchen resultierende kürzest mögliche Zeitraum soll dann, unter Berücksichtigung des Wirkungszeitraumes parallel eingesetzter Agenzien, die zeitliche Grundlage für die folgenden Inkubationsversuche bilden. Ebenfalls kann nicht ausgeschlossen werden, dass, wie aus den Ergebnissen der Cytotoxizität von Zink deutlich wurde, ein Subklon der verwendeten Zelllinie u.U. eine zeitlich veränderte Zinkaufnahme zeigt. Somit wurden die Zellen, die die im folgenden dokumentierte Aufnahme von Zink zeigen, für alle weiteren, in dieser Arbeit durchgeführten Inkubationsversuche verwendet. Für diese Untersuchungen wurde die Methode der Atom-Absorptionsspektrometrie verwendet, die es im Vergleich zur Fluoreszenzspektrometrie vermag, die Menge des Gesamtzinkgehalts zu bestimmen und nicht nur die Menge an freiem (labilem) Zink. Dieser Umstand ist in diesem Zusammenhang wichtig, da der größte Teil an intrazellulären Zink proteingebunden vorliegt (siehe Einleitung). Dieser Anteil stellt eine Art Zinkpuffer dar, der auf fluorimetrischem Wege, bedingt durch die geringen Affinitätskonstanten von zinkspezifischen Fluoreszenzsonden zu proteingebundenem Zink, nicht detektiert würde (siehe 2.4.1.2). Die folgenden Untersuchungen zur zeitlichen Zinkaufnahme in C6-Zellen wurden mit einer extrazellulären Zinkkonzentration von 150  $\mu\text{M}$  durchgeführt, wie sie auch für alle weiteren Inkubationsversuche verwendet wurde. Da es sich hier um richtungsweisende Vorversuche handelt, sind die jeweiligen Zahlenwerte des gemessenen intrazellulären Gesamtzinkgehalts nicht von vorrangigem Interesse, sondern dienen vielmehr zur Orientierung.

Eine Inkubation über den Zeitraum von fünf Stunden zeigte einen kontinuierlichen Anstieg des intrazellulären Zinkgehalts (Abb. 3.2a). Die Menge an pro Milligramm proteingebundenen Zink's betrug nach einer Stunde ca. 480 ng, nach fünf Stunden waren es ca. 1240 ng. Da nach einer Stunde bereits ein signifikanter Unterschied zum Zinklevel der Kontrollexperimente auszumachen war, wurden zeitlich kürzere Intervalle bei der Bestimmung des intrazellulären Zinkgehalts gewählt. Die Ergebnisse des stündlich bestimmten Zinklevels lieferten fast identische Verläufe und sollen aus diesem Grund hier nicht graphisch abgebildet werden (Tab. 3a). Auch Versuche mit 30minütigen Messabständen zeigen das Auftreten eines Plateaus im Gesamtzinkgehalt nach dem ersten Intervall (Abb. 3.2b). Hier lag der Zinkgehalt nach 30 Minuten bei 600 ng pro Milligramm Protein und blieb danach relativ konstant. Ebenso verhielten sich Messungen mit 10-, 5- und 2-minütigen Messintervallen (Tab. 3a). Die Grenze der Durchführbarkeit dieses Versuches wurde mit einem Intervall von 30 Sekunden erreicht.

Auch hier zeigte sich, dass ein Hauptteil des extrazellulär applizierten Zinks nach 30 Sekunden bereits aufgenommen wurde und bei ca. 455 ng pro Milligramm Protein lag (Abb. 3.2c).



**Abb. 3.2a-c: Zeitliche Zinkaufnahme in C6-Zellen.** Dargestellt ist der intrazelluläre Gesamtzinkgehalt von C6-Zellen nach Inkubation mit  $150 \mu\text{M ZnCl}_2$  für die angegebenen Zeiträume und einem Messintervall von (a) 2 Stunden, (b) 30 Minuten und (c) 30 Sekunden. Die dargestellten Balken geben die mittlere intrazelluläre Zinkkonzentration unter Berücksichtigung des Standardfehlers aus jeweils neun Messungen ( $n=9$ ) an. Die Kontrolle blieb ohne Zugabe von Zink. Die dargestellten Ergebnisse sind exemplarisch für drei, voneinander unabhängige, durchgeführte Versuche.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach 30 Sekunden Inkubationszeit schon ein Großteil an Zink aufgenommen ist. Leichte Schwankungen im Zinkgehalt ergeben sich einerseits, trotz vorausgegangener Bestimmung, durch eine leicht unterschiedliche Zellzahl und andererseits durch eine unterschiedliche Menge an zinkbindenden Proteinen, wie z.B. Metallothionein.

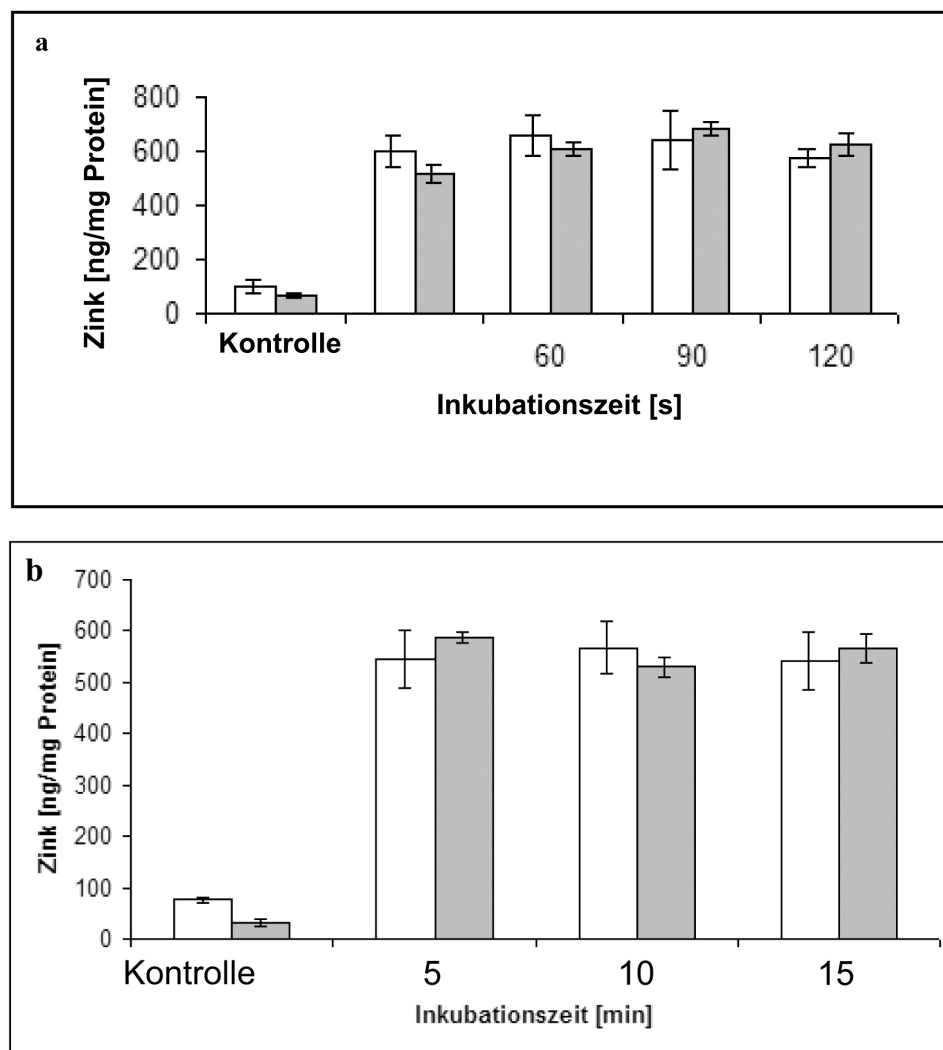
Es wird oft argumentiert, dass ein gewisser Anteil des Zinks möglicherweise extrazellulär an die Membranoberfläche der Zellen bindet. Wenn dies der Fall wäre, würde es sich hier um einen relativen Fehler handeln, der bei allen Messungen auftritt und damit das Verhältnis der Messwerte einer Versuchsreihe nicht beeinflusst. Ebenfalls war es möglich, den schnellen Zinkeinstrom in C6-Zellen mit Hilfe der zinkspezifischen, intrazellulären Fluoreszenzsonde Zinquin zu bestätigen, wie an späterer Stelle gezeigt werden soll (Abb. 3.3.1a).

Auch waren die erlangten Ergebnisse im Einklang mit der Literatur (Reyes 1996) und bilden somit die Grundlage aller folgenden Inkubationsversuche dieser Arbeit.

### **3.3 Modulation des cGMP-PKG Signalwegs**

#### **3.3.1 Der Einfluss von NO auf den intrazellulären Zinkgehalt**

Die Guanylat Cyclase ist ein intrazelluläres Enzym, welches GTP in cGMP umwandelt und durch die Bindung von Stickstoffmonoxid an das Häm-Eisen, und der daraus resultierenden Konformationsänderung, aktiviert wird (Stamler 1994). Ein erhöhter intrazellulärer cGMP-Level, wie er durch Aktivierung mittels NO hervorgerufen wird, zeigt in allen bisher untersuchten Zelllinien einen Einfluss auf die Zinkaufnahme (Haase und Beyersmann 1999, Wätjen et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit soll mit Hilfe spezifischer NO-Donoren ein möglicher Einfluss von cGMP auf den zellulären Im- bzw. Export von Zink in C6-Zellen untersucht werden. Da unter 3.2 gezeigt werden konnte, dass die Zinkaufnahme ein schnell ablaufender Prozess ist, konnten die Inkubationszeiten in den folgenden Experimenten relativ kurz gehalten werden, und die weitreichenden Einflüsse von NO auf weitere zelluläre Signaltransduktionswege beschränkten sich somit auf ein nötiges Minimum. Der Einfluss von NO auf den Gesamtzinkgehalt wurde mit den häufig verwendeten S-Nitroso-Verbindungen SNOC und SNOG mittels AAS durchgeführt. Die in der Literatur verwendeten Konzentrationen an SNOC lieferten die Obergrenze für die hier durchgeführten Inkubationsversuche (Pearce et al. 2000, Haase et al. 2001). Der Vergleich von Zellen die ausschließlich mit 150  $\mu$ M Zink behandelt wurden, mit Zellen, die eine kombinierte Inkubation mit 150  $\mu$ M Zink und 250  $\mu$ M SNOC erfuhren, zeigt keine Unterschiede im Gesamtzinkgehalt (Abb. 3.3.1a). Ein ähnliches Ergebnis wurde nach der parallelen Inkubation von Zellen mit 150  $\mu$ M Zink und 250  $\mu$ M SNOG erzielt (Abb. 3.3.1b).



**Abb. 3.3.1a-b: Der Einfluss von SNOC und SNOG auf den Gesamtzinkgehalt.** Dargestellt ist der intrazelluläre Gesamtzinkgehalt von (a) C6-Zellen nach Inkubation mit 150  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  (weiße Balken) im Vergleich zu Zellen die parallel mit 150  $\mu\text{M}$  Zink und 250  $\mu\text{M}$  SNOC inkubiert wurden (graue Balken) und (b) C6-Zellen nach Inkubation mit 150  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  im Vergleich zu Zellen die parallel mit 150  $\mu\text{M}$  Zink und 250  $\mu\text{M}$  SNOG inkubiert wurden. Die Inkubationszeiten sind angegebenen. Die dargestellten Balken geben die mittlere intrazelluläre Zinkkonzentration unter Berücksichtigung des Standardfehlers aus jeweils neun Messungen ( $n=9$ ) an. Die Kontrolle blieb ohne Zugabe von Zink. Die dargestellten Ergebnisse sind exemplarisch für drei, voneinander unabhängig, durchgeführte Versuche.

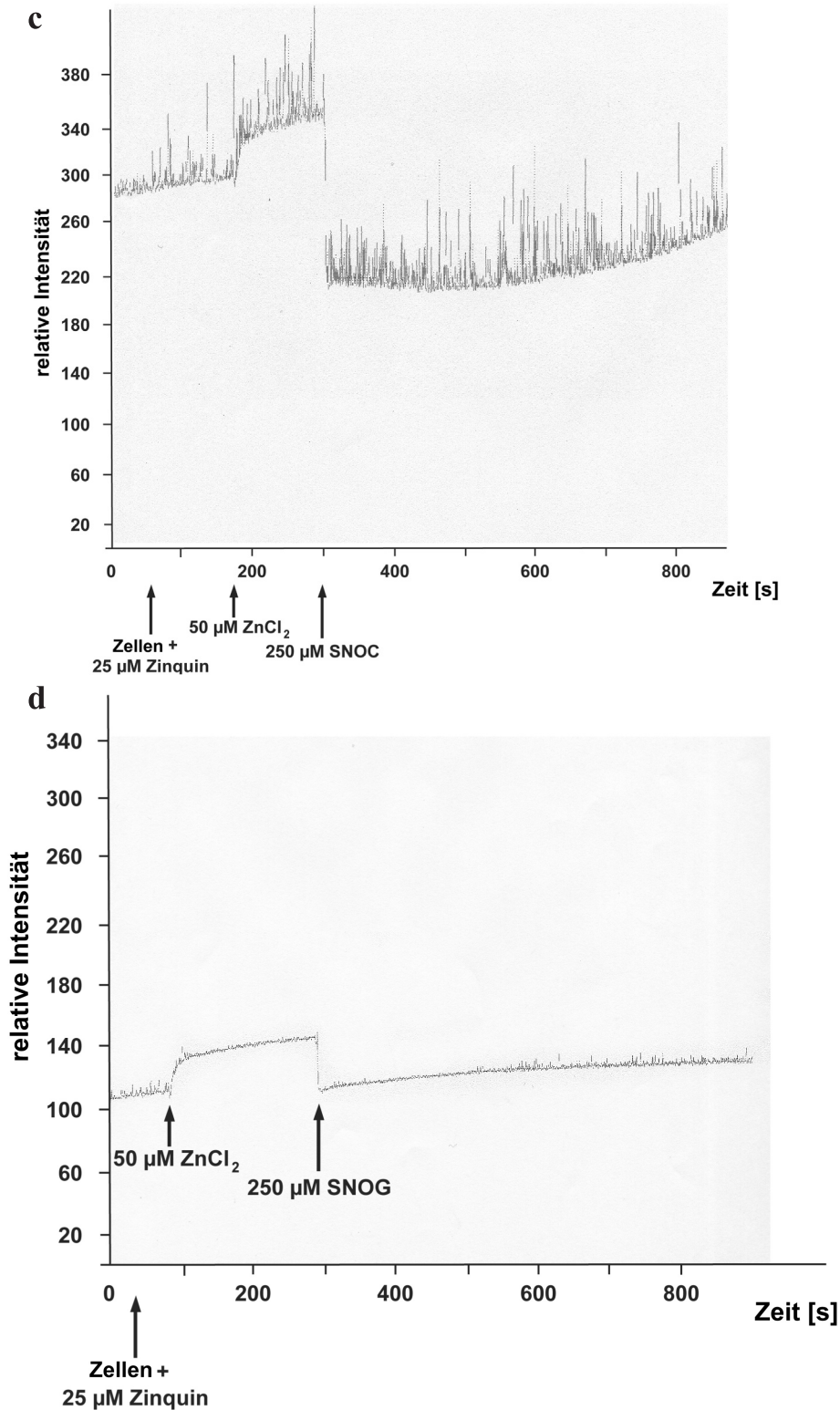
Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die eingesetzten NO-Donoren keinen Einfluss auf den intrazellulären Gesamtzinkgehalt in den hier eingesetzten C6-Zellen haben. Die in Abb. 3.3.1a-b dargestellten Resultate einer Parallelinkubation ändern sich, auch bei der Durchführung einer Vorinkubation, entweder mit Zink oder SNOC unter Verwendung der angegebenen Konzentrationen sowie für unterschiedliche Inkubationszeiten, kaum. Aufgrund der fehlenden

Aussagekraft dieser Ergebnisse sollen sie hier nicht graphisch dargestellt werden, eine Auflistung dieser Resultate findet sich in Tab. 3b.

Ob die eingesetzten NO-Donoren, im Gegensatz zum Gesamtzinkgehalt, einen Einfluss auf den Gehalt an freiem zellulärem Zink haben, soll durch Hilfe einer fluorimetrischen Messung mit Zinquin E festgestellt werden. Die Fluoreszenzintensität mit der Sonde beladenen C6-Zellen, die, wie unter 5.2.3.1 beschrieben, aufgearbeitet und vermessen wurden, steigt nach Zugabe von 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  durch die Bindung von  $\text{Zn}^{2+}$  an Zinquin an (Abb. 3.3.1c). Die folgende Zugabe von 250  $\mu\text{M}$  SNOC lässt die zinkspezifische intrazelluläre Fluoreszenzintensität abfallen (Abb. 3.3.1c). Über einen Zeitraum von ca. 300 Sekunden lässt sich ein Wiederanstieg der Fluoreszenz ausmachen (Abb. 3.3.1c).

Ein grundsätzlich ähnliches Ergebnis lässt sich, bei gleicher Versuchsdurchführung, durch die Zugabe von 250  $\mu\text{M}$  SNOG erzielen (Abb. 3.3.1d). Nach Zugabe von 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  steigt die zinkspezifische Fluoreszenzintensität, wie erwartet, an (Abb. 3.3.1d). Die folgende Zugabe von 250  $\mu\text{M}$  SNOG lässt die intrazelluläre Fluoreszenzintensität abfallen (Abb. 3.3.1d). Und auch hier steigt die Fluoreszenz, wenn auch bedeutend langsamer und weniger steil wie nach Zugabe von SNOC, über einen Zeitraum von ca. 500 Sekunden wieder an (Abb. 3.3.1d).

Diese Beobachtungen legen einen, u.U. kurzzeitigen, Einfluss von SNOC und SNOG auf den Gehalt des freien zellulären Zinks nahe. Doch es ergab sich nach Durchführung dieser Versuche eine Einschränkung hinsichtlich der Glaubwürdigkeit der erlangten Ergebnisse. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, hat der proteingebundene Teil des zellulären Zinks meist Cystein-Thiolgruppen als Liganden und kann durch Oxidation dieser Thiole aus seiner Proteinbindungsstelle freigesetzt werden. Es wurde gezeigt, dass auf diese Weise der Redoxstatus der Zelle den Gehalt an freiem Zink durch oxidative Freisetzung aus Zinkspeicherproteinen, hauptsächlich Metallothionein (MT), beeinflusst (Maret und Vallee 1998). Durch Manipulation des zellulären Redoxstatus mittels Disulfiden (Turan et al. 1997) oder Stickstoffmonoxid (Berendji et al. 1997) werden Fluktuationen im zellulären freien Zink ausgelöst, die im Falle von Stickstoffmonoxid zur Freisetzung aus MT führten (Pearce et al. 2000). Es hätte also erwartet werden können, dass nach Zugabe von NO-Donoren, ein Anteil des proteingebundenen Zinks durch Stickstoffmonoxid freigesetzt wird und an die Sonde bindet, woraus ein Anstieg der Fluoreszenzintensität resultiert hätte. Da eine entgegengesetzte Entwicklung beobachtet wurde, muss von einer anderen Reaktion als Ursache für den beobachteten Abfall der Fluoreszenz ausgegangen werden. Eine Erklärung wäre, dass Zinkionen an die Cystein-Thiolgruppen von L-Cystein und L-Glutathion, die die jeweiligen Proteinkomponenten von SNOC und SNOG darstellen, binden. Ebenfalls ist nicht bekannt ob Stickstoffmonoxid mit der Zinksonde Zinquin, oder mit dem nach Bindung von  $\text{Zn}^{2+}$  gebildeten Zink/Zinquin-Komplex, reagiert. Beide Möglichkeiten könnten u.U. zu dem beobachteten Abfall der Fluoreszenzintensität und damit zur Missinterpretation der unter 3.3.1c-d erlangten Ergebnisse führen.

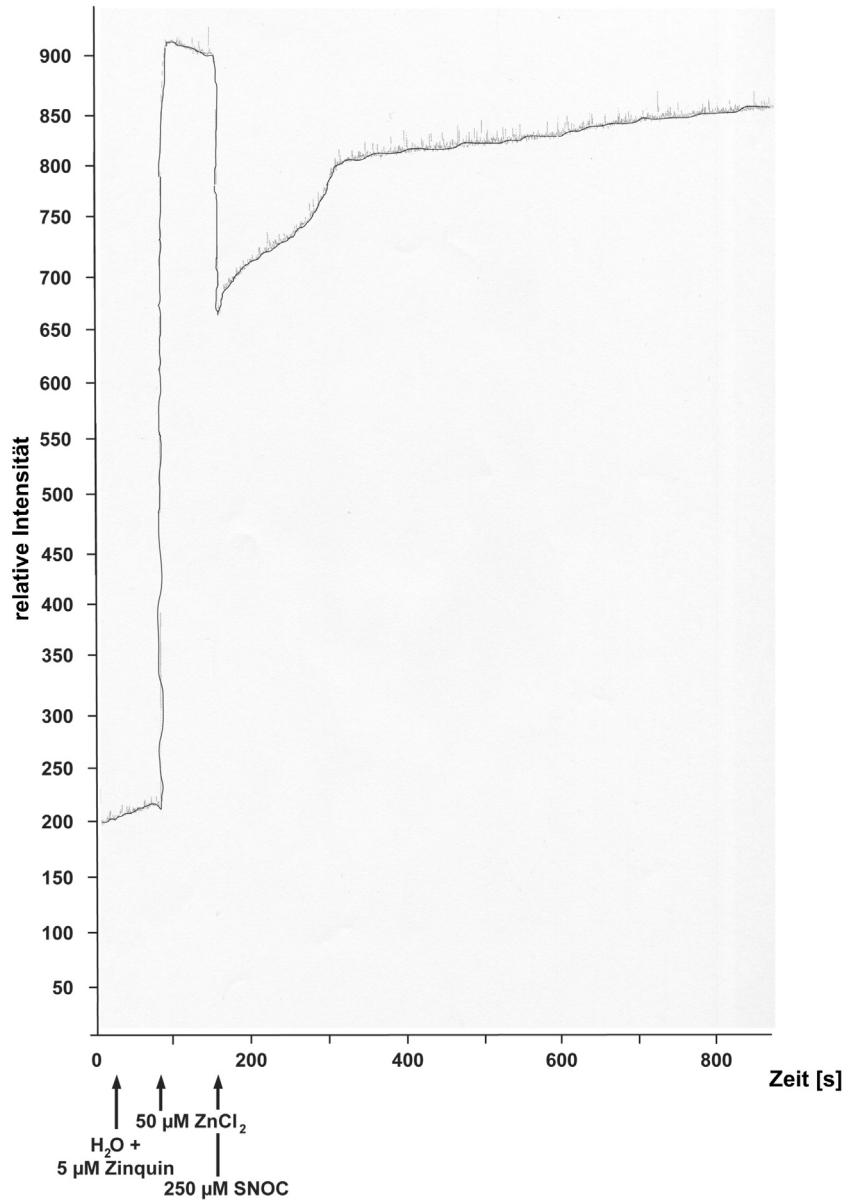


**Abb. 3.3.1c-d:** Einfluss von SNOC und SNOG auf den freien Zinkgehalt. Dargestellt ist die fluorimetrische Messung des labilen Zinkgehalts in C6-Zellen nach Inkubation mit 25  $\mu\text{M}$  Zinquin und Zugabe von 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , sowie (c) 250  $\mu\text{M}$  SNOC und (d) 250  $\mu\text{M}$  SNOG. Die Zugabe der Reagenzien und die Aufarbeitung der Zellen erfolgte wie im Text beschrieben und unter 5.2.3.1 angegeben. Die dargestellten Messungen sind exemplarisch für jeweils drei, voneinander unabhängig, durchgeführte Versuche.

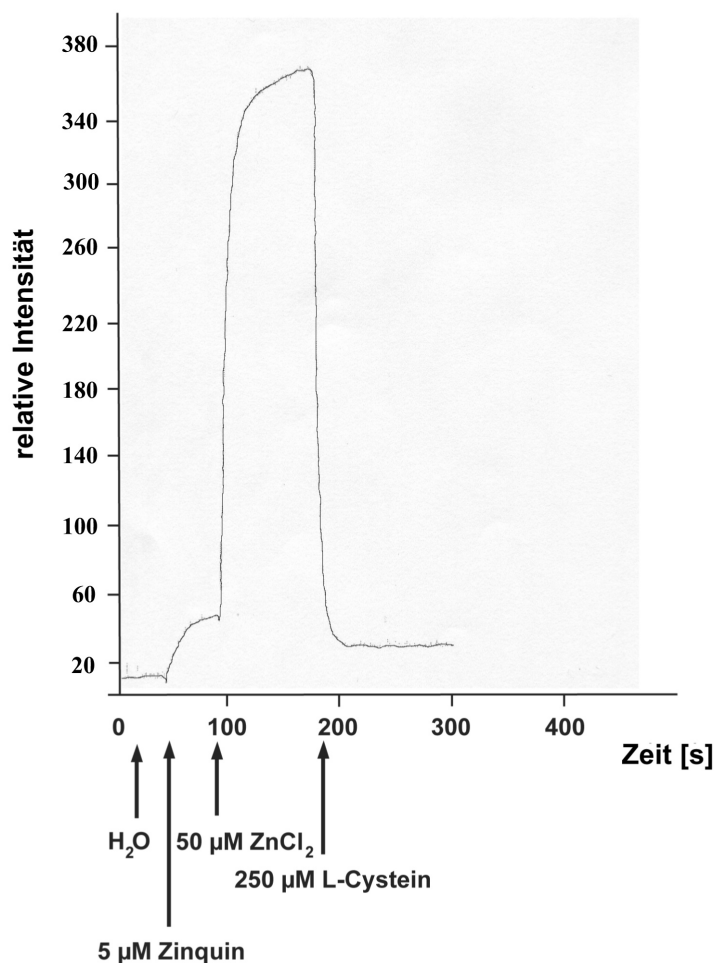


Da weder L-Cystein noch L-Glutathion noch Natriumnitrit eine Eigenfluoreszenz bei den verwendeten Wellenlängen emittierten, wurde der unter 3.3.1c durchgeführte Versuch in einem zellfreien System wiederholt. Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit der verwendeten NO-Donoren muss davon ausgegangen werden, dass die chemische Reaktion, die zum Abfallen der Fluoreszenzintensität führt, für beide NO-Donoren identisch ist. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, wird in den folgenden Experimenten ausschließlich SNOC verwendet. Für die Versuche in einem zellfreien System wurde immer jeweils ein Versuch in Messpuffer sowie bidestilliertem Wasser durchgeführt, um parallel eine Erkenntnis über Einfluss des pH-Wertes auf die beobachtete Reaktion zu erlangen. Nach Zugabe von 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  zu einer gepufferten Suspension aus Messpuffer und 5  $\mu\text{M}$  Zinquin A (siehe 5.2.3.1), kann ein Anstieg der zinkspezifischen Fluoreszenzintensität beobachtet werden (Abb. 3.3.1e). Nach Zugabe von 250  $\mu\text{M}$  SNOC erfolgt ein rapider Abfall der Fluoreszenz, die über einen Zeitraum von ca. 650 Sekunden wieder ansteigt und bei Beendigung des Versuches wieder ungefähr 75% der maximal erreichten Fluoreszenzintensität ausmacht (Abb. 3.3.1e). Identische Versuche in bidestilliertem Wasser verhielten sich ähnlich.

Der in Abb. 3.3.1e dargestellte Verlauf der Fluoreszenz ist im Allgemeinen identisch mit dem Ergebnis, das durch Zugabe von SNOC zu C6-Zellen erlangt wurde (Abb. 3.3.1c). Diese Erkenntnis legt nahe, dass das umgebende System sowie der pH-Wert keinen Einfluss auf den beobachteten Effekt hat. Um festzustellen ob SNOC, oder einer seiner Inhaltsstoffe bzw. NO, den beobachteten Abfall der Fluoreszenzintensität hervorruft, wurde mit der gleichen Versuchsdurchführung der jeweilige Einfluss von Natriumnitrit und L-Cystein auf die zinkspezifische Fluoreszenz untersucht. Während  $\text{NaNO}_2$  keinen Effekt zeigte, wurde mit 250  $\mu\text{M}$  L-Cystein der charakteristische Abfall der Fluoreszenzintensität erreicht (Abb. 3.3.1f).



**Abb. 3.3.1e: Einfluss von SNOC auf die Zink/Zinquin-Fluoreszenz.** Dargestellt ist die Fluoreszenz von in Messpuffer gelöstem Zinquin A ( $5 \mu\text{M}$ ) und deren Veränderung nach Zugabe von  $50 \mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , sowie  $250 \mu\text{M}$  SNOC. Die Zugabe der Reagenzien und die Aufarbeitung der Zellen erfolgte wie im Text beschrieben und unter 5.2.3.1 angegeben. Die dargestellte Messung ist exemplarisch für mindestens drei, voneinander unabhängig, durchgeführte Versuche.



**Abb. 3.3.1f: Einfluss von L-Cystein auf die Zink/Zinquin-Fluoreszenz.** Dargestellt ist die Fluoreszenz von in bidestilliertem Wasser gelösten Zinquin A ( $5 \mu\text{M}$ ) und deren Veränderung nach Zugabe von  $50 \mu\text{M ZnCl}_2$ , sowie  $250 \mu\text{M L-Cystein}$ . Die Zugabe der Reagenzien und die Aufarbeitung der Zellen erfolgte wie im Text beschrieben und unter 5.2.3.1 angegeben. Die dargestellte Messung ist exemplarisch für mindestens drei, voneinander unabhängige, durchgeführte Versuche.

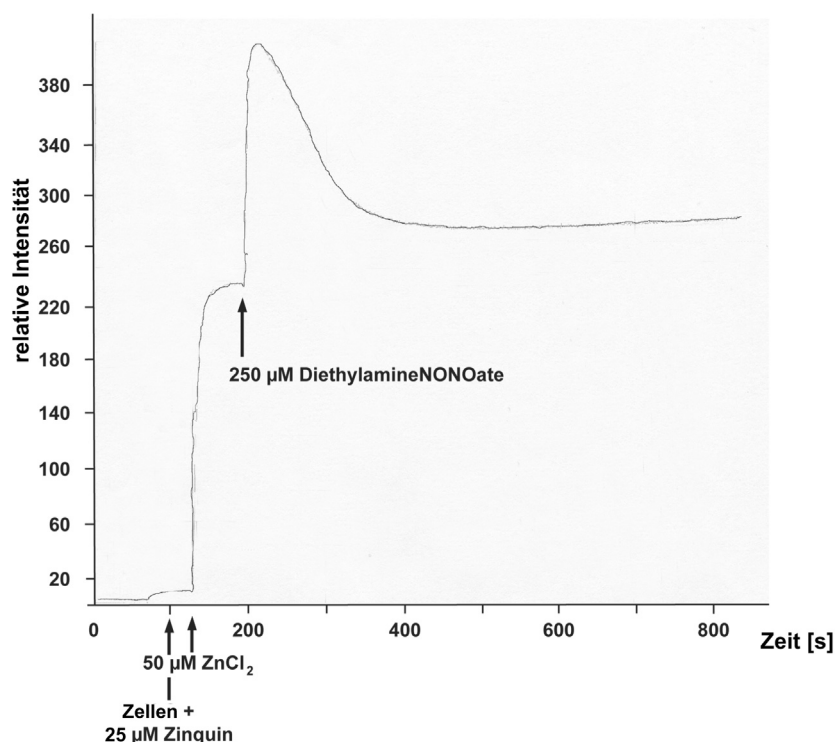
Identische Untersuchungen mit Zellen bestätigen ebenfalls die beschriebenen Ergebnisse im zellfreien System. Der beobachtete Abfall der zinkspezifischen Fluoreszenzintensität scheint damit auf der alleinigen Wirkung von L-Cystein zu beruhen. Da, wie bereits erwähnt, Zink über Cystein- und Histidin-Reste mit Proteinen bindet, kann davon ausgegangen werden, dass L-Cystein über seine SH-Gruppen mit Zink interagiert und in der Lage ist,  $\text{Zn}^{2+}$  aus dem sich bereits gebildeten Zink/Zinquin-Komplex zu lösen. Um die mögliche Bildung von Zink/Cystein-Komplexen zu untersuchen, wurde der Einfluss von starken Oxidationsmitteln auf die zinkspezifische Fluoreszenz geprüft. Oxidationsmittel sind in der Lage, durch die Bildung von Disulfidbrücken den Anteil an freiem L-Cystein drastisch zu senken. Die daraus resultierende Freisetzung von  $\text{Zn}^{2+}$  aus Zink/L-Cystein-Komplexen führt somit wieder zum fluoreszierenden Komplex mit Zinquin. In der Tat führt die Zugabe von entweder  $100 \mu\text{M}$  Kaliumpermanganat

oder  $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  in einem, wie unter 3.3.1f beschriebenen, Versuch zu einem Wiederanstieg der zinkspezifischen Fluoreszenzintensität, wodurch von der Beteiligung von Thiolgruppen bei dieser Reaktion ausgegangen werden kann. Da Zink als  $d^{10}$ -System vorzugsweise tetraedische oder octaedische Komplexe mit seinen Liganden bildet, binden zwei Zinquin-Moleküle ein Zinkion. Nach Spaltung des Zink/Zinquin-Komplexes durch Zugabe von L-Cystein wird  $\text{Zn}^{2+}$ , bedingt durch seine hohe Affinitätskonstante von  $K = 1.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  (Martell et al. 1974), aller Wahrscheinlichkeit nach zwei L-Cystein-Moleküle über Thiolgruppen binden.

Wie gezeigt werden konnte, kommt es zu einem Wiederanstieg der zinkspezifischen Fluoreszenz nach Reaktion des Zink/Zinquin-Komplexes mit SNOC (Abb. 3.3.1c und 3.3.1e), wobei nach Zugabe von L-Cystein dieser Anstieg nicht beobachtet werden kann (Abb. 3.3.1f). Das Phänomen des Wiederanstiegs der Fluoreszenzintensität in Versuchen an denen NO beteiligt ist, beruht auf der Fähigkeit von Stickstoffmonoxid Zink-Schwefel-Bindungen zu zerstören (Kröncke et al. 1994) und erklärt damit ebenfalls die gleichbleibende Fluoreszenz nach Zugabe von L-Cystein (Abb. 3.3.1f). Um festzustellen ob Stickstoffmonoxid die Zinkbindung an Zinquin beeinflusst, wurde der Versuch mit dem SH-Gruppen-freien NO-Donor Diethylamine NONOate (Jacke et al. 2000, Hempelmann et al. 2001, Allen et al. 2002) wiederholt. Nach der Zugabe von  $250 \mu\text{M}$  Diethylamine NONOate zum bereits gebildeten Zink/Zinquin-Komplex kommt es zu einem sprunghaften Anstieg der zinkspezifischen Fluoreszenzintensität, gefolgt von einem moderaten Abfall der Fluoreszenz (Abb. 3.3.1g).

NO initiiert die Oxidation von Sulfhydrylgruppen und damit die Abgabe von locker gebundenem Zink aus Metallothionein und anderen zellulären Proteinen (Kröncke et al. 1994, Berendji et al. 1997). Der anfängliche Anstieg der Fluoreszenzintensität ist somit durch den höheren Anteil an freiem Zink zu erklären, der dann von Zinquin gebunden wird (Abb. 3.3.1g). Da NO instabil ist, werden die gebildeten Disulfide durch das reduzierende Potential des Cytosols gespalten, und es kommt in zinkbindenden Proteinen wieder zu einer Bildung von Sulfhydrylgruppen. Bedingt durch ihre höhere Affinität, reassoziieren diese SH-Gruppen mit Zinkionen. Als Konsequenz werden den Zink/Zinquin-Komplexen die  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen entzogen und die Fluoreszenzintensität fällt, wie in Abb. 3.3.1g zu beobachten ist, ab.

Die Summe der durch Fluoreszenzspektrometrie erlangten Ergebnisse umfasst zwei voneinander unabhängige Effekte auf die Zinquin-Fluoreszenz. Zum einen ist dies der schnelle Abfall, der durch die Zugabe von SNOC, SNOG und L-Cystein hervorgerufen wird und auf der Zerstörung des Zink/Zinquin-Komplexes durch Sulfhydrylgruppen beruht. Zum anderen ist es der Anstieg der Fluoreszenzintensität, der durch Zugabe des SH-Gruppen-freien NO-Donors Diethylamine NONOate hervorgerufen wird.

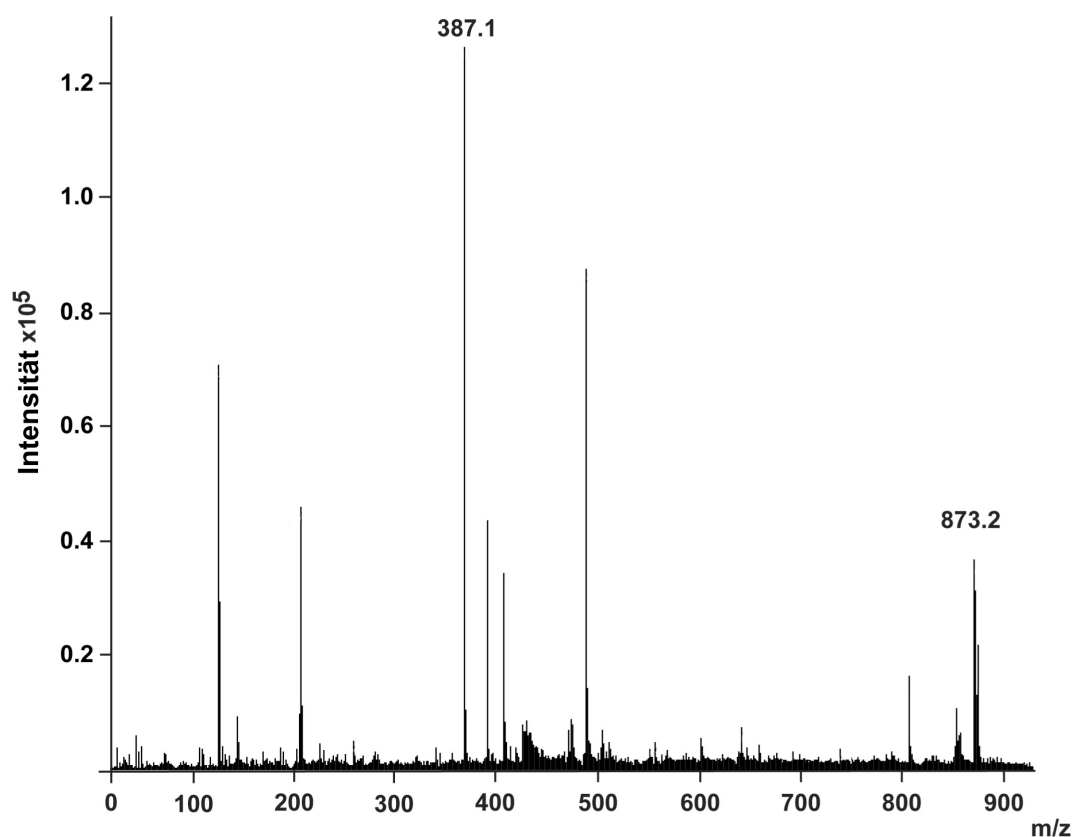


**Abb. 3.3.1g: Einfluss von Diethylamine NONOate auf die Zink/Zinquin-Fluoreszenz.** Dargestellt ist die fluorimetrische Messung des labilen Zinkgehalts in C6-Zellen nach Inkubation mit 25  $\mu\text{M}$  Zinquin und Zugabe von 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , sowie 250 Diethylamine NONOate. Die Zugabe der Reagenzien und die Aufarbeitung der Zellen erfolgte wie im Text beschrieben und unter 5.2.3.1 angegeben. Die dargestellte Messung ist exemplarisch für mindestens drei, voneinander unabhängig, durchgeführte Versuche.

Um die Modifikationen von Zinkkomplexen während der Reaktion von L-Cystein mit dem Zink/Zinquin-Komplex zu untersuchen, wird die Methode der Elektrospray-Massenspektrometrie eingesetzt. Ziel ist es, die Interaktionen von L-Cystein mit dem Zink/Zinquin-Komplex unter verschiedenen Bedingungen, und unabhängig von Puffer, zu untersuchen. Aufgrund des charakteristischen Isotopenmusters von Zink ( $^{64}\text{Zn}$ , relative Häufigkeit: 48.6%;  $^{66}\text{Zn}$ , relative Häufigkeit: 27.9%;  $^{68}\text{Zn}$ , relative Häufigkeit: 18.8%) wird die Detektion von zinkspezifischen Änderungen in den zu beobachtenden Massen-Peaks des Spektrums sehr vereinfacht.

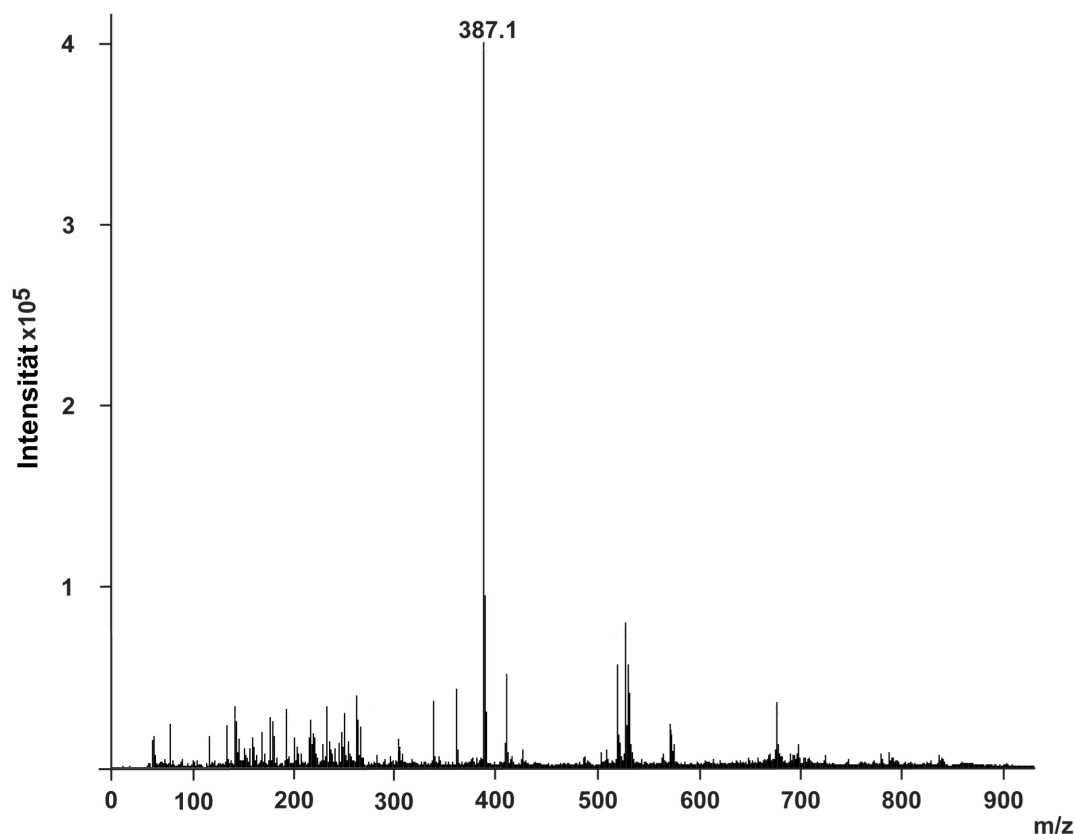
Wie erwartet, zeigt das positive Massenspektrum von L-Cystein einen Peak bei  $m/z$  122.1 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) und das negative Ionenspektrum bei  $m/z$  120.0 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ). Das positive und negative Massenspektrum von Zinquin A zeigt einen Peak bei  $m/z$  387.0 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) bzw. bei  $m/z$  385.1 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ). Die Messung der Kombination aus Zink und Zinquin A zeigt im positiven Ionenspektrum einen Peak mit  $m/z$  387.1 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) der durch Zinquin hervorgerufen wird, sowie einen Peak von  $[\text{Zinquin}+\text{Zn}+\text{H}_2\text{O}+\text{Na}]^+$  mit  $m/z$  873.2 (Abb. 3.3.1h). Diese Beobachtung wird im negativen Massenspektrum bestätigt: hier findet sich ein Peak bei  $m/z$

385.0 ( $[M-H]^-$ ) für Zinquin A, sowie ein Peak bei  $m/z$  871.0 ( $[M-H]^-$ ) für den Zink/Zinquin-Komplex. Zeitabhängige Messungen dieses Versuches zeigen darüber hinaus die Bildung des Zink/Zinquin-Komplexes anhand der Intensitätszunahme des korrespondierenden Peaks, bei gleichzeitigem Intensitätsabfall des zu Zinquin A gehörigen Maximums.



**Abb. 3.3.1h: Analyse der Bildung des Zink/Zinquin-Komplexes durch Massenspektrometrie.** Dargestellt ist das ESI-MS-Spektrum einer Messung von  $50 \mu\text{M ZnCl}_2$  und  $5 \mu\text{M Zinquin A}$ . Die Behandlung und Vorbereitung der Probe erfolgte wie im Text beschrieben und unter 5.2.10.1b angegeben. Das Spektrum zeigt ein Maximum für Zinquin A ( $[M+H]^+$ ) bei  $m/z$  387.1 und ein Maximum das zum Zink/Zinquin-Komplex gehört ( $[Zinquin+Zn+H_2O+Na]^+$ ) bei  $m/z$  873.2. Die dargestellte Messung ist exemplarisch für mindestens neun, voneinander unabhängig, durchgeführte Versuche.

Abb. 3.3.1i zeigt das positive Massenspektrum einer Kombination aus Zinquin A,  $\text{Zn}^{2+}$  und L-Cystein. Man erkennt eine hohe Konzentration an freiem Zinquin A bei  $m/z$  387.1 ( $[M+H]^+$ ) und keinen zum Zink/Zinquin-Komplex gehörigen Peak. Das flächige Auftreten vieler nicht identifizierbarer Maxima mit und ohne Zink-Isotopenmuster führt wahrscheinlich zu dem Umstand, dass die Menge an Zink/L-Cystein-Komplexen so gering ist, dass sie aufgrund ihrer niedrigen Intensität nicht getrennt von anderen Peaks ausgemacht werden können (Abb. 3.3.1i).



**Abb. 3.3.1i: Untersuchung der Wirkung von L-Cystein auf den Zink/Zinquin-Komplex mittels Massenspektrometrie.** Dargestellt ist das ESI-MS-Spektrum einer Messung von 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , 5  $\mu\text{M}$  Zinquin A und 250  $\mu\text{M}$  L-Cystein. Die Behandlung und Vorbereitung der Probe erfolgte wie im Text beschrieben und unter 5.2.10.1b angegeben. Das Spektrum der Kombination aus Zink, Zinquin und L-Cystein zeigt ein Maximum für Zinquin A ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  387.1) und kein Maximum, das zum Zink/Zinquin-Komplex gehört ( $[\text{Zinquin}+\text{Zn}+\text{H}_2\text{O}+\text{Na}]^+$ ,  $m/z$  873.2). Die dargestellte Messung ist exemplarisch für mindestens neun, voneinander unabhängig, durchgeführte Versuche.

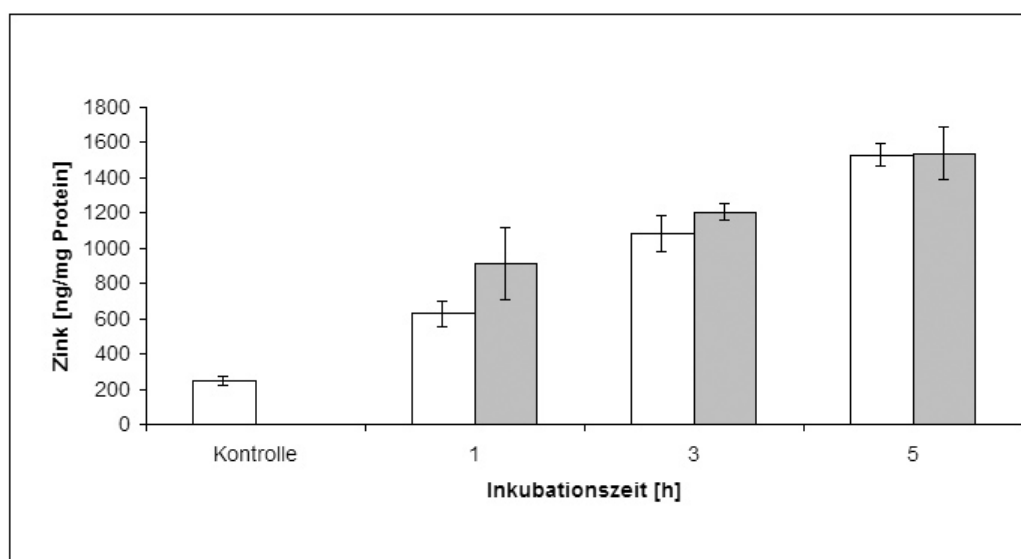
Die in Abb. 3.3.1i dargestellten Ergebnisse werden im negativen Massenspektrum bestätigt. Dort ergibt sich ein Maximum für freies Zinquin A bei  $m/z$  385.0 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) und kein zum Zink/Zinquin-Komplex gehöriger Peak. Auch hier führt das flächige Auftreten vieler nicht identifizierbarer Maxima mit und ohne Zink-Isotopenmuster dazu, dass kein Peak von Zink/L-Cystein-Komplexen ausgemacht werden kann. Viele der neu auftretenden Komplexe können Verunreinigungen zugeschrieben werden, die sich aus Kunststoff-Reaktionsgefäßen lösen und mit den in der zu untersuchenden Probe enthaltenen Molekülen komplexieren. Diese Verunreinigungen lassen sich selbst trotz jahrelanger Erfahrung so gut wie gar nicht ausschließen und werden durch die hohe Sensibilität der Messinstrumente erst zum Problem. Für weitere fluorimetrische Untersuchungen mit Zinquin und L-Cystein-enthaltenden NO-Donoren in dieser Arbeit - und im Allgemeinen - ist es wichtig, den hier beobachteten

Auswirkungen Rechnung zu tragen (Jansen et al. 2004a).

Es kann zu dem Schluss gekommen werden, dass eine Aktivierung der Guanylat Cyclase mit Hilfe von Stickstoffmonoxid in den hier verwendeten C6-Zellen, keinen Einfluss auf den zellulären Gesamtzinkgehalt hat. Zusätzlich lässt sich feststellen, dass NO in der Lage ist, eine Fluktuation im freien, intrazellulären Zinklevel auszulösen.

### 3.3.2 Der Einfluss der Inhibition der GC auf den intrazellulären Zinkgehalt

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Aktivierung der Guanylat Cyclase mittels NO keinen Einfluss auf den zellulären Zinkgehalt hat, soll zur Absicherung dieser Befunde, die Auswirkung einer Inhibition der GC auf den Zinkspiegel untersucht werden. Der Vergleich von Zellen die ausschließlich mit 150  $\mu\text{M}$  Zink behandelt wurden, mit Zellen, die eine kombinierte Inkubation mit 150  $\mu\text{M}$  Zink und 1.6  $\mu\text{M}$  des spezifischen GC-Inhibitors LY83583 erfuhren, zeigen keine Unterschiede im Gesamtzinkgehalt (Abb. 3.3.2a). Die in der Literatur verwendeten Konzentrationen an LY83583 lieferten die Obergrenze für die hier durchgeführten Inkubationsversuche (Haase et al. 2001, Wang et al. 2001).



**Abb. 3.3.2: Der Einfluss von LY83583 auf den Gesamtzinkgehalt.** Dargestellt ist der intrazelluläre Gesamtzinkgehalt von C6-Zellen nach Inkubation mit 150  $\mu\text{M}$  ZnCl<sub>2</sub> (weiße Balken) im Vergleich zu Zellen die parallel mit 150  $\mu\text{M}$  Zink und 1.6  $\mu\text{M}$  LY83583 inkubiert wurden (graue Balken). Die verwendeten Zellen wurden für diese AAS-Messung, wie unter 5.2.5.1 beschrieben, behandelt und aufgearbeitet. Die Inkubationszeiten sind angegebenen. Die dargestellten Balken geben die mittlere intrazelluläre Zinkkonzentration unter Berücksichtigung des Standardfehlers aus jeweils neun Messungen ( $n=9$ ) an. Die Kontrolle blieb ohne Zugabe von Zink. Die dargestellten Ergebnisse sind exemplarisch für drei, voneinander unabhängige, durchgeführte Versuche.



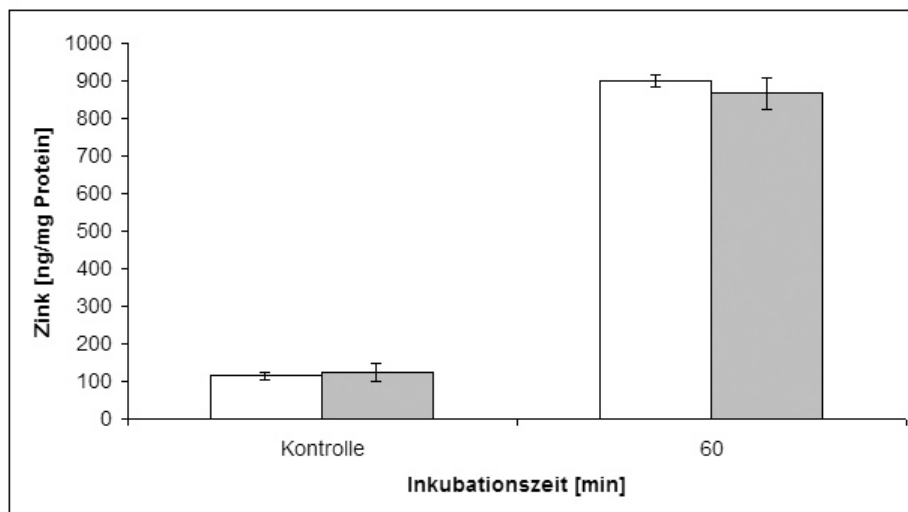
Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass der eingesetzte Inhibitor der Guanylat Cyclase keinen Einfluss auf den intrazellulären Gesamtzinkgehalt in den hier eingesetzten C6-Zellen hat. Die in Abb. 3.3.2a dargestellten Resultate einer Parallelinkubation ändern sich auch bei der Durchführung einer Vorinkubation, entweder mit Zink oder LY83583 und unter Verwendung der angegebenen Konzentrationen sowie für unterschiedliche Inkubationszeiten, kaum. Aufgrund der fehlenden Aussagekraft dieser Ergebnisse sollen sie an dieser Stelle nicht graphisch dargestellt werden. Eine Auflistung dieser Resultate findet sich in Tab. 3b.

Ob die eingesetzten GC-Inhibitoren, im Gegensatz zum Gesamtzinkgehalt, einen Einfluss auf den Gehalt an freiem zellulären Zink haben, soll durch Hilfe einer fluorimetrischen Messung mit Zinquin E festgestellt werden. Die Fluoreszenzintensität mit der Sonde beladenen C6-Zellen, die, wie unter 5.2.3.1 beschrieben, aufgearbeitet und vermessen wurden, steigt nach Zugabe von 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  durch die Bindung von  $\text{Zn}^{2+}$  an Zinquin an. Die folgende Zugabe von 1.6  $\mu\text{M}$  LY83583 verändert die zinkspezifische intrazelluläre Fluoreszenzintensität nicht (Tab. 3b).

Im Einklang mit den Ergebnissen aus 3.3.1 kann zu dem Schluss gekommen werden, dass eine Inhibition der Guanylat Cyclase mit Hilfe von LY83583 und ein damit einhergehender theoretischer Abfall der intrazellulären cGMP-Konzentration, in den hier verwendeten C6-Zellen, weder einen Einfluss auf den zellulären Gesamtzinkgehalt noch auf den Anteil an freiem intrazellulärem Zink hat.

### 3.3.3 Der Einfluss eines cGMP-Analogons auf den zellulären Zinkgehalt

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die Menge an cGMP, die durch die Aktivierung der GC durch NO erreicht wird, zu gering ausfällt um die Zinkaufnahme zu beeinflussen, wird im Folgenden das PDE-resistente cGMP-Analogon Sp-8-pCPT-cGMPS eingesetzt. Sp-8-pCPT-cGMPS ist gleichzeitig ein spezifischer Aktivator der PKG und besitzt sehr gute Membranpermeabilität (Schwede et al. 2000). Dosis-Wirkung-Experimente mit verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten zeigten keinen Einfluss auf den zellulären Gesamtzinkgehalt der verwendeten C6-Zellen (Tab. 3b). Die in der Literatur verwendeten Konzentrationen an Sp-8-pCPT-cGMPS lieferten die Grundlage für die hier durchgeführten Dosis-Wirkung-Experimente (Bonkale et al. 1997, Marienfeld et al. 2001, Yan et al. et al. 2001). Abb. 3.3.3a zeigt exemplarisch den Vergleich von Zellen, die ausschließlich mit 150  $\mu\text{M}$  Zink behandelt wurden, mit Zellen, die eine kombinierte Inkubation mit 150  $\mu\text{M}$  Zink und 100  $\mu\text{M}$  Sp-8-pCPT-cGMPS erfuhren. Die in Abb. 3.3.3a dargestellten Resultate einer Parallelinkubation ändern sich auch bei der Durchführung einer Vorinkubation, entweder mit Zink oder Sp-8-pCPT-cGMPS und unter Verwendung der in Tab. 3b angegebenen Konzentrationen und Inkubationszeiten, kaum.



**Abb. 3.3.3: Der Einfluss von Sp-8-pCPT-cGMPS auf den Gesamtzinkgehalt.** Dargestellt ist der intrazelluläre Gesamtzinkgehalt von C6-Zellen nach Inkubation mit  $150 \mu\text{M ZnCl}_2$  (weiße Balken) im Vergleich zu Zellen die parallel mit  $150 \mu\text{M ZnCl}_2$  und  $100 \mu\text{M Sp-8-pCPT-cGMPS}$  inkubiert wurden (graue Balken). Die verwendeten Zellen wurden für diese AAS-Messung, wie unter 5.2.5.1 beschrieben, behandelt und aufgearbeitet. Die Inkubationszeit betrug 60 min. Die dargestellten Balken geben die mittlere intrazelluläre Zinkkonzentration unter Berücksichtigung des Standardfehlers aus jeweils neun Messungen ( $n=9$ ) an. Die Kontrolle blieb ohne Zugabe von Zink. Die dargestellten Ergebnisse sind exemplarisch für drei, voneinander unabhängig, durchgeführte Versuche.

Ob Sp-8-pCPT-cGMPS, im Gegensatz zum Gesamtzinkgehalt, einen Einfluss auf den Gehalt an freiem zellulärem Zink hat, soll durch Hilfe einer fluorimetrischen Messung mit Zinquin E festgestellt werden. Die Fluoreszenzintensität von mit der Sonde beladenen C6-Zellen, die, wie unter 5.2.3.1 beschrieben, aufgearbeitet und vermessen wurden, steigt nach Zugabe von  $50 \mu\text{M ZnCl}_2$  durch die Bindung von  $\text{Zn}^{2+}$  an Zinquin an. Die folgende Zugabe von  $100 \mu\text{M Sp-8-pCPT-cGMPS}$  verändert die zinkspezifische intrazelluläre Fluoreszenzintensität nicht (Tab. 3b).

Als Fazit der Ergebnisse aus 3.3 lässt sich feststellen, dass weder eine Aktivierung noch eine Inhibition der Guanylat Cyclase mit Hilfe von NO bzw. LY83583 einen Einfluss auf den zellulären Gesamtzinkgehalt und auf den Anteil an freiem intrazellulärem Zink der hier verwendeten C6-Zellen hat. Auch ein ausgeprägter Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration bei gleichzeitiger Aktivierung der PKG mittels des PDE-resistenten cGMP-Analogons Sp-8-pCPT-cGMPS, hat weder Auswirkungen auf den Gesamtzinkgehalt der Zellen noch auf den Anteil an labilem Zink.

### 3.4 Modulation des cAMP-PKA Signalwegs

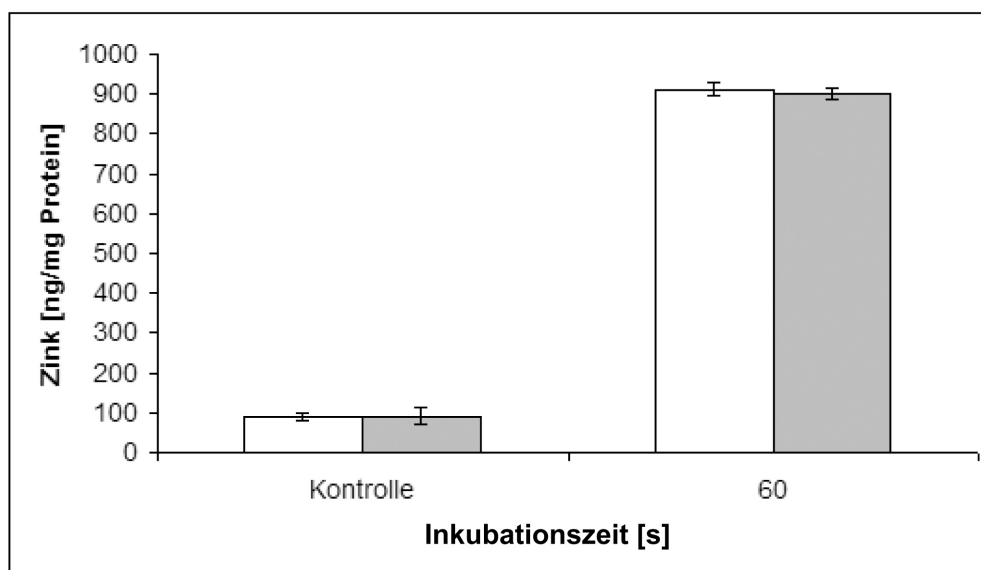
Aufgrund des engen Crosstalks zwischen cGMP und cAMP (Schwede et al. 2000) soll im Folgenden der Einfluss von cAMP-Analoga auf den zellulären Zinkgehalt untersucht werden. Im Falle von cAMP wurde von einer Aktivierung und Inhibition der AC abgesehen und der direkte Weg über das Signalmolekül gewählt.

#### 3.4.1 Der Einfluss von Sp-5,6-DCI-cBIMPS auf den zellulären Zinkgehalt

Um den Einfluss eines erhöhten zellulären cAMP-Gehaltes auf den Gesamtzinkgehalt zu untersuchen, wird im Folgenden das PDE-resistente cAMP-Analogon Sp-5,6-DCI-cBIMPS eingesetzt. Sp-5,6-DCI-cBIMPS ist gleichzeitig ein spezifischer Aktivator der PKA und besitzt sehr gute Membranpermeabilität (Schwede et al. 2000). Dosis-Wirkung-Experimente mit verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten zeigten keinen Einfluss auf den zellulären Gesamtzinkgehalt der verwendeten C6-Zellen (Tab. 3b). Die in der Literatur verwendeten Konzentrationen an Sp-5,6-DCI-cBIMPS lieferten die Grundlage für die hier durchgeführten Dosis-Wirkung-Experimente (Cheng et al. 1997, Cantrell et al. 1999, Motzkus et al. 2000). Abb. 3.4.1a stellt exemplarisch den Vergleich von Zellen, die ausschließlich mit 150  $\mu\text{M}$  Zink behandelt wurden, mit Zellen, die eine kombinierte Inkubation mit 150  $\mu\text{M}$  Zink und 100  $\mu\text{M}$  Sp-5,6-DCI-cBIMPS erfuhren dar. Die in Abb. 3.4.1 dargestellten Resultate einer Parallelinkubation ändern sich auch bei der Durchführung einer Vorinkubation, entweder mit Zink oder Sp-5,6-DCI-cBIMPS und unter Verwendung der in Tab. 3b angegebenen Konzentrationen und Inkubationszeiten, kaum.

Ob Sp-5,6-DCI-cBIMPS, im Gegensatz zum Gesamtzinkgehalt, einen Einfluss auf den Gehalt an freiem zellulärem Zink hat, soll durch Hilfe einer fluorimetrischen Messung mit Zinquin E festgestellt werden. Die Fluoreszenzintensität von mit der Sonde beladenen C6-Zellen, die, wie unter 5.2.3.1 beschrieben, aufgearbeitet und vermessen wurden, steigt nach Zugabe von 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  durch die Bindung von  $\text{Zn}^{2+}$  an Zinquin an. Die folgende Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Sp-5,6-DCI-cBIMPS verändert die zinkspezifische intrazelluläre Fluoreszenzintensität nicht (Tab. 3b).

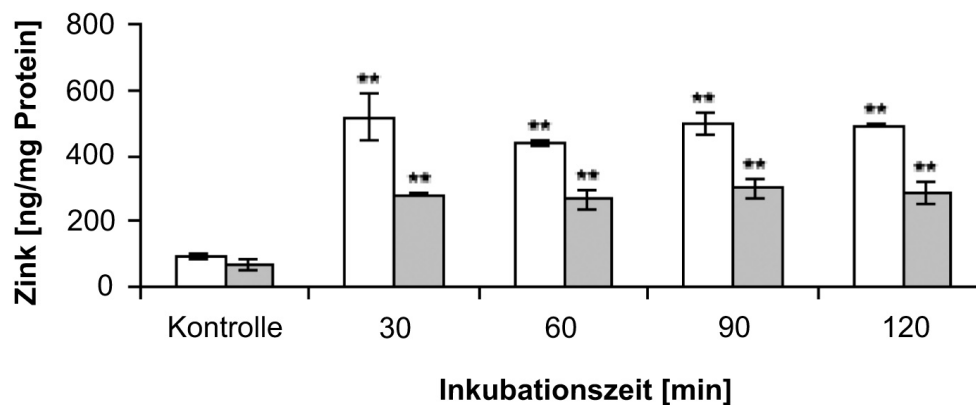
Es lässt sich feststellen, dass ein ausgeprägter Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration bei gleichzeitiger Aktivierung der PKA mittels des PDE-resistenten cAMP-Analogons Sp-5,6-DCI-cBIMPS, weder Auswirkungen auf den Gesamtzinkgehalt der Zellen, noch auf den Anteil an labilem Zink hat. Da unter PKA-Aktivatoren eine Isoenzympezifität besteht und das verwendete Sp-5,6-DCI-cBIMPS nur PKA I aktiviert (Schwede et al. 2000), soll der Einfluss eines weiteren Aktivators der PKA, mit differenzierter Isoenzympezifität, untersucht werden.



**Abb. 3.4.1: Der Einfluss von Sp-5,6-DCl-cBIMPS auf den Gesamtzinkgehalt.** Dargestellt ist der intrazelluläre Gesamtzinkgehalt von C6-Zellen nach Inkubation mit  $150 \mu\text{M ZnCl}_2$  (weiße Balken) im Vergleich zu Zellen, die parallel mit  $150 \mu\text{M}$  Zink und  $100 \mu\text{M}$  Sp-5,6-DCl-cBIMPS inkubiert wurden (graue Balken). Die verwendeten Zellen wurden für diese AAS-Messung, wie unter 5.2.5.1 beschrieben, behandelt und aufgearbeitet. Die Inkubationszeit betrug 60 min. Die dargestellten Balken geben die mittlere intrazelluläre Zinkkonzentration unter Berücksichtigung des Standardfehlers aus jeweils neun Messungen ( $n=9$ ) an. Die Kontrolle blieb ohne Zugabe von Zink. Die dargestellten Ergebnisse sind exemplarisch für drei, voneinander unabhängig, durchgeführte Versuche.

### 3.4.2 Der Einfluss von 8-Bromo-cAMP auf den zellulären Zinkgehalt

Um den Einfluss eines erhöhten zellulären cAMP-Gehaltes, kombiniert mit einer spezifischen Aktivierung der PKA I und II, zu untersuchen, wurde im folgenden das gut membranpermeable 8-Bromo-cAMP eingesetzt (Schwede et al. 2000). Die in der Literatur verwendeten Konzentrationen an 8-Bromo-cAMP lieferten die Grundlage für die hier durchgeführten Untersuchungen (Musgrave et al. 1993, Hechtenberg 1997, Yan et al. et al. 2001). Der Vergleich von C6-Zellen, die ausschließlich mit  $150 \mu\text{M}$  Zink behandelt wurden, mit Zellen, die eine kombinierte Inkubation mit  $150 \mu\text{M}$  Zink und  $1 \text{ mM}$  8-Bromo-cAMP erfuhren, zeigen eine Abnahme des zellulären Gesamtzinkgehalts (Abb. 3.4.2). Die in dieser Abbildung dargestellten Resultate einer Parallelinkubation mit 8-Bromo-cAMP und  $\text{ZnCl}_2$  ändern sich auch bei der Durchführung einer Vorinkubation entweder mit Zink oder 8-Bromo-cAMP, kaum.



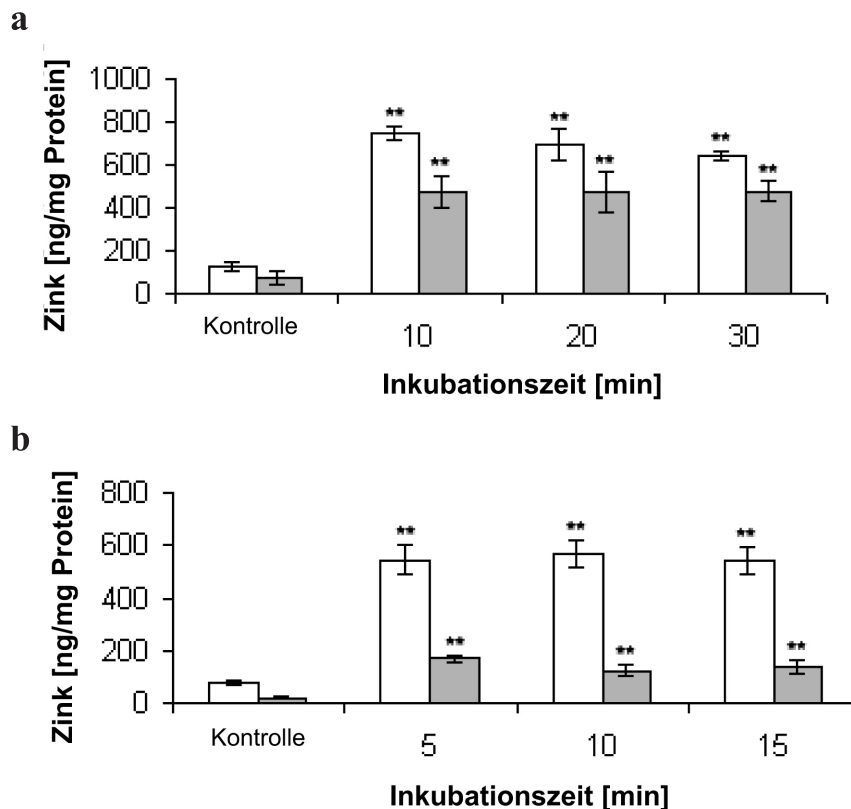
**Abb. 3.4.2: Der Einfluss von 8-Bromo-cAMP auf den Gesamtzinkgehalt.** Dargestellt ist der intrazelluläre Gesamtzinkgehalt von C6-Zellen nach Inkubation mit  $150 \mu\text{M ZnCl}_2$  im Vergleich zu Zellen, die parallel mit  $150 \mu\text{M}$  Zink (weiße Balken) und  $1 \text{ mM}$  8-Bromo-cAMP inkubiert wurden (graue Balken). Die verwendeten Zellen wurden für diese AAS-Messung, wie unter 5.2.5.1 beschrieben, behandelt und aufgearbeitet. Die Inkubationszeiten sind angegeben. Die dargestellten Balken geben die mittlere intrazelluläre Zinkkonzentration unter Berücksichtigung des Standardfehlers aus jeweils neun Messungen ( $n=9$ ) an. Die Kontrolle blieb ohne Zugabe von Zink. Die dargestellten Ergebnisse sind exemplarisch für drei, voneinander unabhängige, durchgeführte Versuche. \*\*:Signifikant ( $p < 0.01$ ) unterschiedlich von den Kontrollen.

Im Falle von 8-Bromo-cAMP konnte gezeigt werden, dass ein ausgeprägter Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration mit gleichzeitiger Aktivierung der PKA I und II mittels 8-Bromo-cAMP den Gesamtzinkgehalt der verwendeten C6-Zellen senkt. Da ein solcher Abfall zwangsweise eine, wenn u.U. auch nur kurzzeitige, Veränderung des freien Zinks mit sich zieht, wurde aus Zeitgründen von fluorimetrischen Untersuchungen abgesehen. Vergleicht man die Ergebnisse aus 3.4.1 und 3.4.2 kann nur gemutmaßt werden, ob für den beobachteten Abfall im Gesamtzinkgehalt die Aktivierung der PKA II ausreicht, oder ob gleichzeitig ein erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel vorliegen muss.

### 3.5 Der Einfluss der Inhibition der Cyclonukleotid Phosphodiesterasen auf den zellulären Zinkgehalt

Ein wichtiger Knotenpunkt in der intrazellulären Signaltransduktion stellt die Enzymklasse der Phosphodiesterasen dar, die cyclische Nukleotide in Mononukleotide umwandeln. Um zu untersuchen, ob an diesem Punkt eine Regulation des zellulären Zinkgehaltes stattfindet, wurde der Einfluss des starken, aber unspezifischen, PDE-Inhibitors IBMX auf den Gesamtzinkgehalt untersucht. Die in der Literatur verwendeten Konzentrationen an IBMX lieferten die Grundlage

für die hier durchgeführten Experimente (Bonkale et al. 1997, Slamon und Pentreath 2000). Abb. 3.5 zeigt den Vergleich von C6-Zellen, die ausschließlich mit  $150 \mu\text{M ZnCl}_2$  inkubiert wurden, mit Zellen, die einer kombinierten Inkubation mit  $150 \mu\text{M ZnCl}_2$  und  $500 \mu\text{M IBMX}$  unterzogen wurden. Während in Abb. 3.5a mit einer Parallelinkubation verglichen wird, handelt es sich in Abb. 3.5b um den Vergleich mit einer 30minütigen Vorinkubation mit IBMX. Beide Versuchsansätze resultieren in einem geringeren Gesamtzinkgehalt, verglichen mit Kontrollzellen, die nur mit Zink behandelt wurden, wobei der Effekt bei vorinkubierten Zellen deutlich stärker ausfällt (Abb. 3.5).



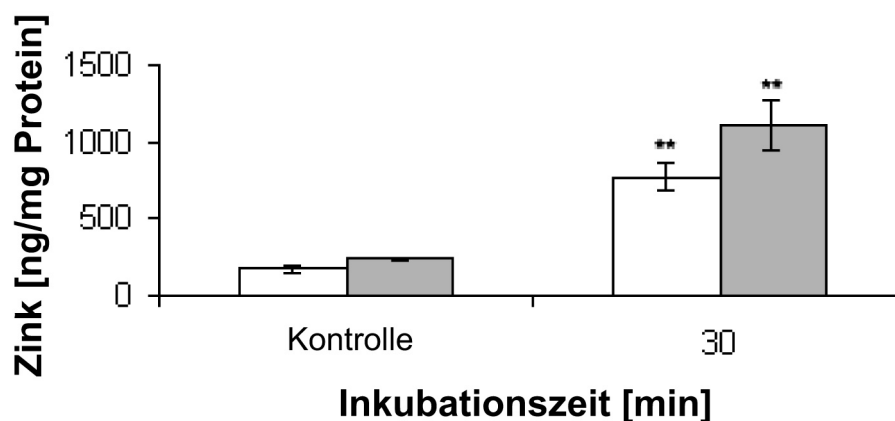
**Abb. 3.5a-b: Der Einfluss von IBMX auf den Gesamtzinkgehalt.** Dargestellt ist der intrazelluläre Gesamtzinkgehalt von C6-Zellen nach Inkubation mit  $150 \mu\text{M ZnCl}_2$  (weiße Balken) im Vergleich zu Zellen die, (a) parallel mit  $150 \mu\text{M ZnCl}_2$  und  $500 \mu\text{M IBMX}$  inkubiert wurden (graue Balken) und (b) 30 Minuten mit  $500 \mu\text{M IBMX}$  vorinkubiert wurden, bevor sie mit  $150 \mu\text{M ZnCl}_2$  behandelt wurden. Die verwendeten Zellen wurden für diese AAS-Messung, wie unter 5.2.5.1 beschrieben, behandelt und aufgearbeitet. Die Inkubationszeiten sind angegeben. Die dargestellten Balken geben die mittlere intrazelluläre Zinkkonzentration unter Berücksichtigung des Standardfehlers aus jeweils neun Messungen ( $n=9$ ) an. Die Kontrolle blieb ohne Zugabe von Zink. Die dargestellten Ergebnisse sind exemplarisch für drei, voneinander unabhängig, durchgeführte Versuche. \*\*: Signifikant ( $p < 0.01$ ) unterschiedlich von den Kontrollen.

Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von IBMX einen deutlichen Einfluss auf den Gesamtzinkgehalt in C6-Zellen hat. Da ein solcher Abfall zwangsweise eine, wenn u.U. auch nur kurzzeitige, Veränderung des freien Zinks mit sich zieht, wurde aus Zeitgründen von fluorimetrischen Untersuchungen abgesehen. In Hinblick auf die erhaltenen Ergebnisse und den hier eingesetzten unspezifischen PDE-Inhibitor IBMX kann nur angenommen werden, dass die Aufrechterhaltung eines erhöhten Cyclonokleotid-Levels eine Aktivierung von Zinkexportmechanismen mit sich zieht.

### 3.6 Modulation der Phospholipase C-Aktivität

Die PLC ist ein der Plasmamembran assoziiertes Enzym, das eine tragende Rolle in vielen verschiedenen Signaltransduktionsprozessen spielt und als ein Hauptpunkt in der Modulation zellulärer Antworten auf Signale angesehen werden kann. Die PLC katalysiert die Spaltung des Membranlipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) in Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und 1,2-Diacylglycerol (DAG). Es gibt vier Isoenzyme der PLC-Familie (siehe 4.3), aber in dieser Arbeit soll im weiteren nicht zwischen den einzelnen Subtypen unterschieden werden, sondern es ist nur die Tatsache von Bedeutung, dass man die Aktivität der PLC auf zwei unterschiedliche Arten regulieren kann: zum einen über den erwähnten G-Protein-gekoppelten Weg und zum anderen über eine direkte Phosphorylierung durch Rezeptortyrosinkinasen.

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, existieren Ergebnisse über eine Verbindung zwischen extrazellulärem Zink und einer intrazellulären Ausschüttung von Calcium durch den vermittelnden Einfluss des Zinc-sensing Receptors (Hershinkel et al. 2001). Da der ZnR über einen G-Protein-abhängigen Signalweg die PLC aktiviert, wird von Maret (2001) die Möglichkeit diskutiert, dass durch extrazelluläres Zink Rezeptortyrosinkinasen stimuliert werden, die dann über Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste in der katalytischen Domäne die PLC aktivieren. Ob die PLC dabei einen Einfluss auf den Zinktransport hat, soll im folgenden mittels Modulation der PLC-Aktivität untersucht werden. Um sich der Möglichkeit eines Einflusses der Aktivität der PLC auf den zellulären Gesamtzinkgehalt zu nähern, wurde zuerst der relativ unspezifische PLC-Inhibitor Neomycin eingesetzt. Die in der Literatur verwendeten Konzentrationen an Neomycin lieferten die Grundlage für die hier durchgeführten Untersuchungen (Matkovich und Woodcock 1997, Nakajima et al. 2000). Abb. 3.6a zeigt den Vergleich von C6-Zellen die ausschließlich mit  $150 \mu\text{M ZnCl}_2$  inkubiert wurden, mit Zellen, die einer parallelen Inkubation mit  $150 \mu\text{M ZnCl}_2$  und  $500 \mu\text{M Neomycin}$  unterzogen wurden. Die zu beobachtende Zunahme im Gesamtzinkgehalt steigt proportional mit der eingesetzten Konzentration an Neomycin an (Tab. 3b) und eine Vorinkubation der C6-Zellen entweder mit Zink oder Neomycin verändern den in Abb. 3.6a dargestellten Verlauf kaum.

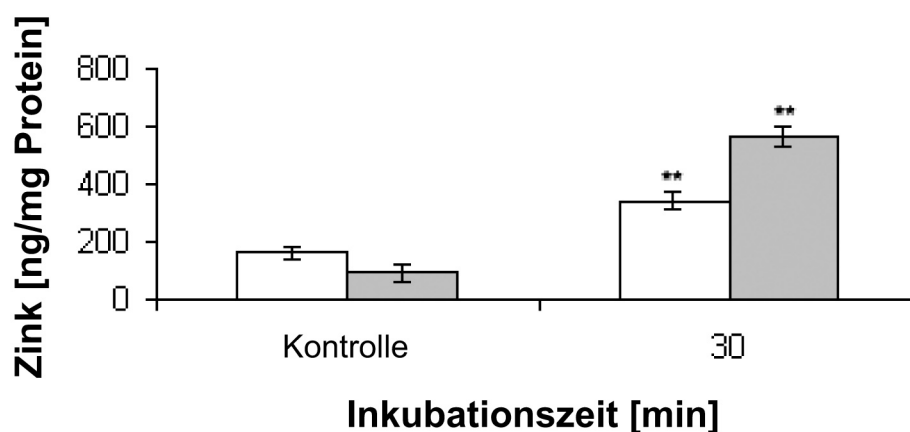


**Abb. 3.6a: Der Einfluss von Neomycin auf den Gesamtzinkgehalt.** Dargestellt ist der intrazelluläre Gesamtzinkgehalt von C6-Zellen nach Inkubation mit 150 µM ZnCl<sub>2</sub> (weiße Balken) im Vergleich zu Zellen, die parallel mit 150 µM Zink und 500 µM Neomycin inkubiert wurden (graue Balken). Die verwendeten Zellen wurden für diese AAS-Messung, wie unter 5.2.5.1 beschrieben, behandelt und aufgearbeitet. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Die dargestellten Balken geben die mittlere intrazelluläre Zinkkonzentration unter Berücksichtigung des Standardfehlers aus jeweils neun Messungen (n=9) an. Die Kontrolle blieb ohne Zugabe von Zink. Die dargestellten Ergebnisse sind exemplarisch für mindestens drei, voneinander unabhängig, durchgeführte Versuche. \*\*:Signifikant ( $p < 0.01$ ) unterschiedlich von den Kontrollen.

Das in Abb. 3.6a gezeigte positive Ergebnis rechtfertigt Folgeuntersuchungen mit dem, im Gegensatz zu Neomycin, starken und spezifischen PLC-Inhibitor U73122. Der genaue Mechanismus der zur Inhibition der PLC durch U73122 führt, ist noch nicht komplett verstanden. Es gilt aber als sicher, dass dieses Aminosteroid direkt an eine Domäne der PLC bindet. Eine solche Bindung hätte eine inhibitorische Wirkung, wenn sie eine Blockierung der Substratanlagerung hervorrufen würde. In der Literatur findet man für die Inhibition der PLC durch U73122 einen IC<sub>50</sub>-Wert der zwischen 1.0 und 2.1 µM liegt (Smith 1990, Barrocas et al. 1999). Für die vollständige Inhibition (Hershinkel et al. 2001, Su et al. 2002) wird daher eine Konzentration von 10 µM U73122 gewählt.

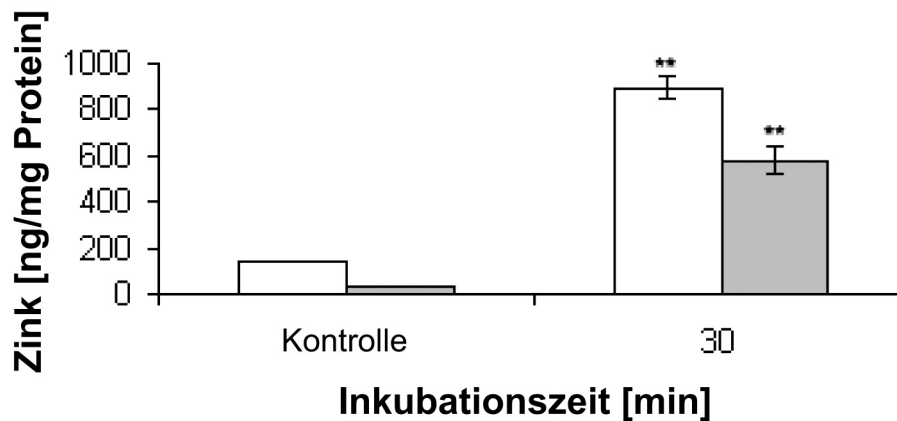
Abb. 3.6b zeigt den Vergleich von C6-Zellen, die ausschließlich mit 150 µM ZnCl<sub>2</sub> inkubiert wurden, mit Zellen, die einer parallelen Inkubation mit 150 µM ZnCl<sub>2</sub> und 10 µM U73122 unterzogen wurden. Die zu beobachtende Zunahme im Gesamtzinkgehalt steigt in diesem Fall nicht mit einer Erhöhung der minimal eingesetzten Konzentration von 10µM U73122 (Tab. 3b) an. Eine Vorinkubation der C6-Zellen mit entweder Zink oder U73122 verändern die hier dargestellte Abnahme des zellulären Gesamtzinkgehalts kaum.





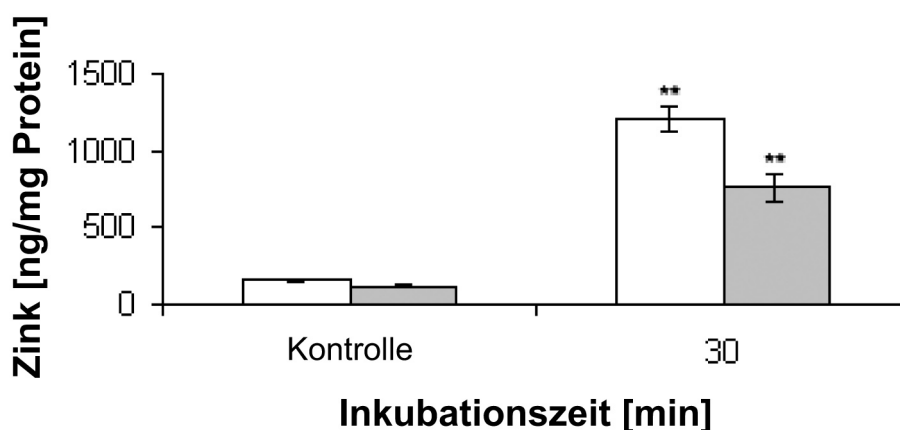
**Abb. 3.6b: Der Einfluss von U73122 auf den Gesamtzinkgehalt.** Dargestellt ist der intrazelluläre Gesamtzinkgehalt von C6-Zellen nach Inkubation mit 150  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  (weiße Balken) im Vergleich zu Zellen, die parallel mit 150  $\mu\text{M}$  Zink und 10  $\mu\text{M}$  U73122 inkubiert wurden (graue Balken). Die verwendeten Zellen wurden für diese AAS-Messung, wie unter 5.2.5.1 beschrieben, behandelt und aufgearbeitet. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Die dargestellten Balken geben die mittlere intrazelluläre Zinkkonzentration unter Berücksichtigung des Standardfehlers aus jeweils neun Messungen ( $n=9$ ) an. Die Kontrolle blieb ohne Zugabe von Zink. Die dargestellten Ergebnisse sind exemplarisch für mindestens drei, voneinander unabhängige, durchgeführte Versuche. \*\*:Signifikant ( $p < 0.01$ ) unterschiedlich von den Kontrollen.

Die in Abb. 3.6a und 3.6b dargestellten Beobachtungen lassen einen Einfluss der PLC am zellulären Zinktransport vermuten. Um dieses Ergebnis zu bestärken wurde nun der spezifische PLC-Aktivator Imipramin eingesetzt. Imipramin ist ein tricyclisches, von der Gruppe der Benzodiazepine abgeleitetes Molekül, das aufgrund seiner aromatischen Ringe und der unpolaren aliphatischen Seitenkette sehr hydrophob und dadurch leicht membrangängig ist. Durch diese Eigenschaften bindet es intrazellulär an die regulatorische Domäne des PLC $\beta$  Subtyps und ist in Gegenwart von Calciumionen in der Lage, die Aktivität der PLC zu steigern. In der Literatur lassen sich mit Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  bis 1 mM im Medium die deutlichsten Effekte ausmachen (Fukuda 1994, Bobeszko et al. 2000, Lattard et al. 2002). Der Vergleich von C6 Zellen die ausschließlich mit 150  $\mu\text{M}$  Zink behandelt wurden, mit Zellen, die eine kombinierte Inkubation mit 150  $\mu\text{M}$  Zink und 500  $\mu\text{M}$  Imipramin erfuhren, zeigen eine Abnahme des zellulären Gesamtzinkgehalts (Abb. 3.6c). Die in dieser Abbildung dargestellten Resultate einer Parallelinkubation mit Imipramin und  $\text{ZnCl}_2$  ändern sich auch bei der Durchführung einer Vorinkubation entweder mit Zink oder Imipramin, kaum. Die zu beobachtende Abnahme im Gesamtzinkgehalt verändert sich auch nicht bei einer Erhöhung der eingesetzten Konzentration an Imipramin (Tab. 3b).



**Abb. 3.6c: Der Einfluss von Imipramin auf den Gesamtzinkgehalt.** Dargestellt ist der intrazelluläre Gesamtzinkgehalt von C6-Zellen nach Inkubation mit 150 µM ZnCl<sub>2</sub> (weiße Balken) im Vergleich zu Zellen, die parallel mit 150 µM Zink und 500 µM Imipramin inkubiert wurden (graue Balken). Die verwendeten Zellen wurden für diese AAS-Messung, wie unter 5.2.5.1 beschrieben, behandelt und aufgearbeitet. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Die dargestellten Balken geben die mittlere intrazelluläre Zinkkonzentration unter Berücksichtigung des Standardfehlers aus jeweils neun Messungen (n=9) an. Die Kontrolle blieb ohne Zugabe von Zink. Die dargestellten Ergebnisse sind exemplarisch für mindestens drei, voneinander unabhängig, durchgeführte Versuche. \*\*:Signifikant ( $p < 0.01$ ) unterschiedlich von den Kontrollen.

Um das Ergebnis der PLC-Aktivierung zu bestätigen, wurde von einem Umstand Gebrauch gemacht, der spezifisch für die verwendete Zelllinie ist. C6-Zellen exprimieren an der Zelloberfläche einen G-Protein-gekoppelten Nukleotidrezeptor des Typs P2Y<sub>1</sub>, der direkt mit der PLC gekoppelt ist (Czajkowski et al. 2002). Nach Zugabe von ADP lässt sich dadurch die Aktivität der PLC direkt über einen, unter physiologischen Bedingungen vorkommenden, rezeptorvermittelten Signalweg stimulieren. In der Literatur wird eine Bindung an den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor mit anschließender Aktivierung der PLC bei Konzentrationen von 10-20 µM ADP im Medium angegeben (Czajkowski et al. 2002). Abb. 3.6d zeigt den Vergleich von C6-Zellen, die ausschließlich mit 150 µM ZnCl<sub>2</sub> inkubiert wurden, mit Zellen, die einer parallelen Inkubation mit 150 µM ZnCl<sub>2</sub> und 20 µM ADP unterzogen wurden. Die zu beobachtende Abnahme im Gesamtzinkgehalt steigt proportional mit der eingesetzten Konzentration an ADP in einem Bereich von 20 bis 1000 µM an. Konzentrationen über 100 µM verändern das Ergebnis nicht mehr (Tab. 3b). Vorinkubationen der verwendeten C6-Zellen entweder mit Zink oder Imipramin verändern das in Abb. 3.6d dargestellte Ergebnis unwesentlich.



**Abb. 3.6d: Der Einfluss von ADP auf den Gesamtzinkgehalt.** Dargestellt ist der intrazelluläre Gesamtzinkgehalt von C6-Zellen nach Inkubation mit  $150 \mu\text{M ZnCl}_2$  (weiße Balken) im Vergleich zu Zellen, die parallel mit  $150 \mu\text{M}$  Zink und  $20 \mu\text{M}$  ADP inkubiert wurden (graue Balken). Die verwendeten Zellen wurden für diese AAS-Messung, wie unter 5.2.5.1 beschrieben, behandelt und aufgearbeitet. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Die dargestellten Balken geben die mittlere intrazelluläre Zinkkonzentration unter Berücksichtigung des Standardfehlers aus jeweils neun Messungen ( $n=9$ ) an. Die Kontrolle blieb ohne Zugabe von Zink. Die dargestellten Ergebnisse sind exemplarisch für mindestens drei, voneinander unabhängig, durchgeführte Versuche. \*\*:Signifikant ( $p < 0.01$ ) unterschiedlich von den Kontrollen.

Da eine Aktivierung der PLC das entgegengesetzte Resultat einer Inhibition erzielte, kann von einem Einfluss der PLC-Aktivität auf den zellulären Zinktransport ausgegangen werden (Jansen et al. 2004c). Um diesen Sachverhalt genauer zu untersuchen, soll die PLC-Aktivität von C6-Zellen durch den spezifischen Inhibitor U73122 ausgeschaltet und nachfolgend der Einfluss eines PLC-Aktivators auf die intrazelluläre Ausschüttung von Calciumionen, als ein Maß für die Aktivität der PLC, untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass ein Einsatz von PLC-Inhibitoren und -Aktivatoren einen deutlichen Einfluss auf den Gesamtzinkgehalt in C6-Zellen haben. Weil ein solcher Einfluss zwangsweise eine, wenn u.U. auch nur kurzzeitige, Veränderung des freien Zinks mit sich zieht, wurde bis zu diesem Zeitpunkt von fluorimetrischen Untersuchungen abgesehen. Da aber bei einer, der Aktivierung vorausgehenden, Inhibition der PLC von einer, sehr geringen, falls überhaupt vorhandenen, Aktivität der PLC ausgegangen werden muss, sollen diese Versuche mit Hilfe der sensiblen Fluoreszenzspektrometrie und nicht mittels Atomabsorptionsspektrometrie durchgeführt werden. Für die bisher verwendeten Aktivatoren Imipramin und ADP liegt in der Literatur kein fluorimetrischer Einsatz hinsichtlich der PLC-gesteuerten Ausschüttung von Calciumionen vor. Aus diesem Grunde soll auf den in dieser Hinsicht etablierten und spezifischen PLC-Aktivator m-3M3FBS zurückgegriffen werden. Dieses, erst vor kurzem durch ein Screening-Verfahren von über 10.000 Verbindungen identifizierte Benzosulfonsäure-Derivat, ist in der Lage, die Aktivität aller bisher bekannten Isoformen der PLC zu stimulieren (Bae et al. 2003). Trotz der Polarität der Sulfonamidgruppe

ist m-3M3FBS aufgrund der beiden aromatischen Ringe stark lipophil und dringt mit Hilfe passiver Diffusion leicht durch die Zellmembran. Das m-3M3FBS in der Lage ist, auf der cytoplasmatischen Seite spezifisch alle PLC-Isoformen zu aktivieren, scheint durch die Bindung des Moleküls an die hochkonservierte Plekstrin-Domäne des Enzyms hervorgerufen zu werden. Da diese Domäne die Substratbindungsstelle enthält und die Bindung von m-3M3FBS an die PLC die Anlagerung des Substrats, Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP<sub>2</sub>), erleichtert, handelt es sich bei der Aktivierung um eine allosterische Regulation. In der Literatur wird eine gesteigerte Aktivität der PLC bei Konzentrationen von 25 bis 50 µM m-3M3FBS im Medium beobachtet (Bae et al. 2003).

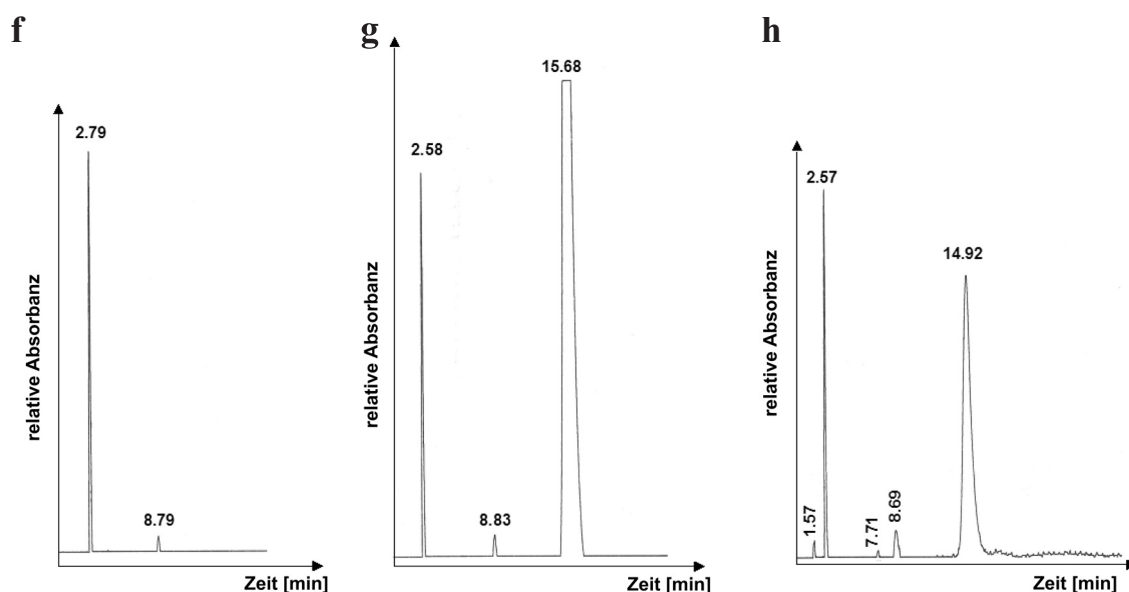
C6-Zellen, die, wie unter 5.2.3.1 beschrieben, mit Fura-2/AM geladen wurden, zeigen nach Zugabe von 20 µM m-3M3FBS einen starken und sprunghaften Anstieg in der Fluoreszenzintensität. Ein solcher Anstieg lässt sich auf eine gesteigerte Aktivität der PLC und der folgenden Ausschüttung von Calcium aus IP<sub>3</sub>-sensitiven, intrazellulären Speichern erklären. C6-Zellen, die nun mit Fura-2/AM und U73122 geladen wurden, zeigen nach Zugabe von m-3M3FBS einen ebensostarken wie sprunghaften Anstieg in der Fluoreszenzintensität. Obwohl die Aktivität der PLC durch die Zugabe von U73122 inhibiert sein sollte, wäre ein solcher Anstieg der Fluoreszenzintensität wiederum durch das Binden von Calciumionen an die Fluoreszenzsonde Fura-2 zu erklären. Um festzustellen, ob es sich bei der Erhöhung der Fluoreszenzintensität um intra- oder extrazelluläre Fluoreszenz handelt, wurden die beiden starken Ionen-Chelatoren DTPA und EDTA eingesetzt. Weder hatte die Chelatierung von extrazellulären Ionen durch DTPA, noch von intrazellulären Ionen durch EDTA einen Einfluss auf die gesteigerte Fluoreszenzintensität. Identische Versuche, die analog mit Zinquin und dem zinkspezifischen intrazellulären Chelator TPEN durchgeführt wurden, lieferten das gleiche Ergebnis. Diese Beobachtungen legen nahe, dass keine Ionen am beobachteten Anstieg der Fluoreszenzintensität beteiligt sind. Zusätzlich durchgeführte Ratio-Messungen konzentrierten sich auf die Änderungen der Fluoreszenzintensität der Excitationswellenlänge des Fura-2/Calcium-Komplexes (340 nm) und der Wellenlänge des Isosbestischen Punktes (360 nm), der im Emissionsspektrum der Sonde gefunden werden kann. Solange nur Calciumionen an der beobachteten Intensitätsänderung der Fluoreszenz beteiligt sind, sollte sich die Fluoreszenzintensität des Isosbestischen Punktes nicht verändern. Es konnte aber beobachtet werden, dass sich die Intensität der Fluoreszenz am Isosbestischen Punkt parallel mit der Fluoreszenzintensität bei 340 nm ändert und damit zeigt, dass der Anstieg der Fluoreszenzintensität nicht durch das Binden von Calciumionen an die Fluoreszenzsonde Fura-2 hervorgerufen wird. Der Einsatz von wiederum 20 µM m-3M3FBS in einem zellfreien System ohne Verwendung von Fluoreszenzsonden zeigte nicht nur den schon im Zellsystem beobachteten charakteristischen Anstieg der Fluoreszenzintensität, sondern auch eine stetige Abnahme der Fluoreszenz über die Zeit (Abb. 3.6e). Diese Abnahme der Fluoreszenzintensität kann durch einen möglichen Zerfall von m-3M3FBS durch den Einfluss von UV-Licht erklärt werden.



**Abb. 3.6e: Eigenfluoreszenz von m-3M3FBS.** Dargestellt ist die resultierende Änderung der Fluoreszenzintensität bei 340 nm nach Zugabe von 20  $\mu\text{M}$  m-3M3FBS zu 2 mL bidestilliertem Wasser. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität über die Zeit, kann dem UV-bedingten Zerfall des PLC-Aktivators m-3M3FBS zugeschrieben werden. Die dargestellte Messung ist exemplarisch für mindestens drei, voneinander unabhängig, durchgeführte Versuche.

Um den möglichen UV-bedingten Zerfall von m-3M3FBS zu beweisen, wurde eine, wie unter 5.2.8 beschrieben, zweidimensionale Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Auf der DC-Platte, die als Kontrolle diente und keinem UV-Licht ausgesetzt wurde, konnte nur ein einziger Punkt auf der Diagonalen der Platte ausgemacht werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Ausgangssubstanz m-3M3FBS nicht zerfallen ist. Hingegen zeigten sich nach Durchführung der Chromatographie in der zweiten Dimension der mit UV-Licht behandelten Platte fünf Punkte auf der Diagonalen. Einer dieser Punkte gehört zur Ausgangssubstanz m-3M3FBS. Drei andere Punkte wanderten langsamer als die Ausgangssubstanz und ein Punkt wanderte schneller. Die Ergebnisse der 2D-DC bestätigen, wie sich bereits aus den Fluoreszenzversuchen ergibt, die Annahme eines Zerfalls von m-3M3FBS.

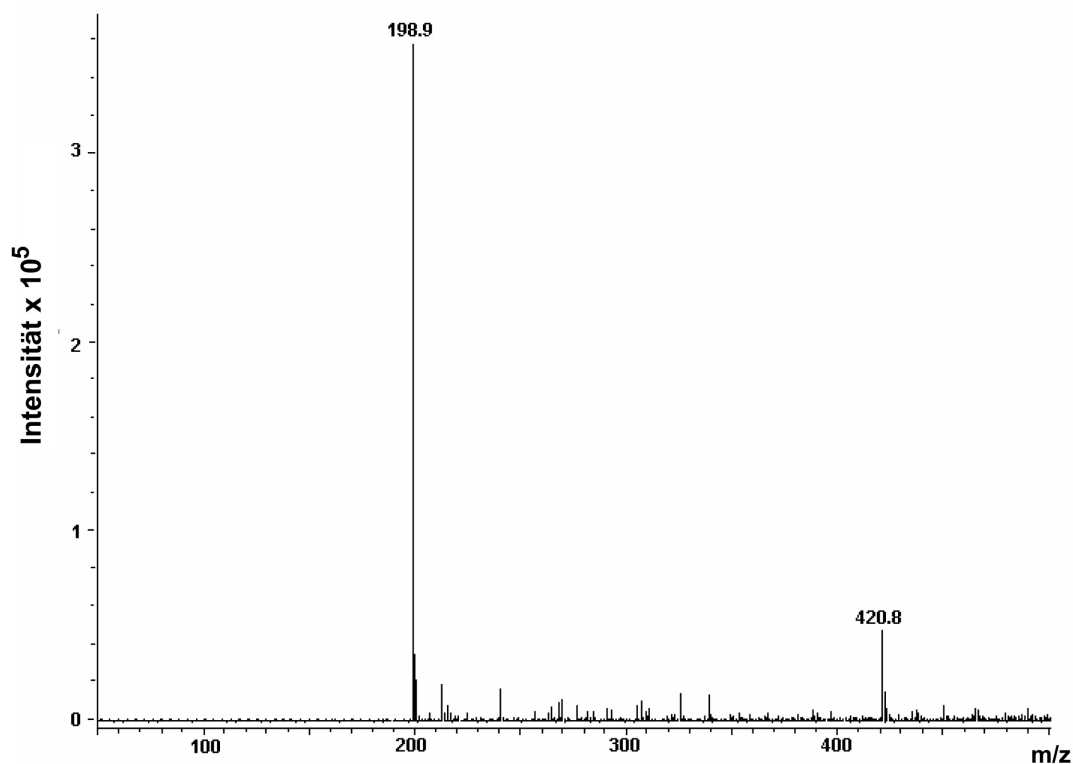
Um die Beobachtungen der DC zu bestärken wird auf eine, wie unter 5.2.9 beschrieben, HPLC-Analyse zurückgegriffen. Abb. 3.6f zeigt im Chromatogramm des Lösungsmittels ein Signal bei einer Elutionszeit von 2.79 Minuten, das von DMSO-Molekülen stammt, und ein Signal bei 8.79 Minuten, das einer Verunreinigung zuzuschreiben ist. In Abb. 3.6g ist das HPLC-Chromatogramm der in DMSO gelösten m-3M3FBS-Stammlösung aufgetragen. Zusätzlich zu den Signalen des Lösungsmittels (2.58 und 8.83 Minuten) ist hier deutlich das zu m-3M3FBS gehörige Signal bei einer Elutionszeit von 15.68 Minuten zu sehen. Das HPLC-Chromatogramm der UV-behandelten Probe, das in Abb. 3.6h dargestellt ist, zeigt zusätzlich zu den Peaks aus dem Lösungsmittel (2.57 und 8.69 Minuten) und der Reinsubstanz (14.92 Minuten) weitere hinzugekommene Signale.



**Abb. 3.6f-h:** Analyse der Zerfallsprodukte von *m*-3M3FBS mittels HPLC. Dargestellt sind die HPLC-Chromatogramme des (f) Lösungsmittels, der (g) unbehandelten Probe und der (h) UV-behandelten Probe. Die Behandlung und Vorbereitung der Proben erfolgte wie im Text beschrieben und unter 5.2.9 angegeben. Die dargestellten Messungen sind exemplarisch für mindestens drei, voneinander unabhängig, durchgeführte Versuche.

Das Chromatogramm der UV-behandelten Probe (Abb. 3.6h) zeigt zusätzliche Peaks (1.57 und 7.71 Minuten) im Vergleich zum Chromatogramm des Lösungsmittels DMSO (Abb. 3.6f) sowie zum Chromatogramm der unbehandelten Probe (Abb. 3.6g). Der Peak bei 8.68 Minuten zeigt einen leicht schulterartigen Verlauf, der durch eine weitere, im Hintergrund liegende Substanz, hervorgerufen sein könnte, die aufgrund der ungenügenden Trennschärfe aber nicht identifiziert werden kann. Außerdem zeigt das Chromatogramm der UV-behandelten Probe (Abb. 3.6f) für die Ausgangssubstanz *m*-3M3FBS (bei 14.92 Minuten) ebenfalls einen schulterartigen Verlauf sowie eine schwächere Gesamtabsorbanz als das der unbehandelten Ausgangssubstanz in Abb. 3.6h. Weitere Zerfallsprodukte führen nach einer Elutionszeit von mehr als 14.92 Minuten zu vielen Signalen geringerer Intensität. Im gesamten wird durch die hier dargestellten Ergebnisse die Annahme eines UV-bedingten Zerfalls von *m*-3M3FBS bestärkt.

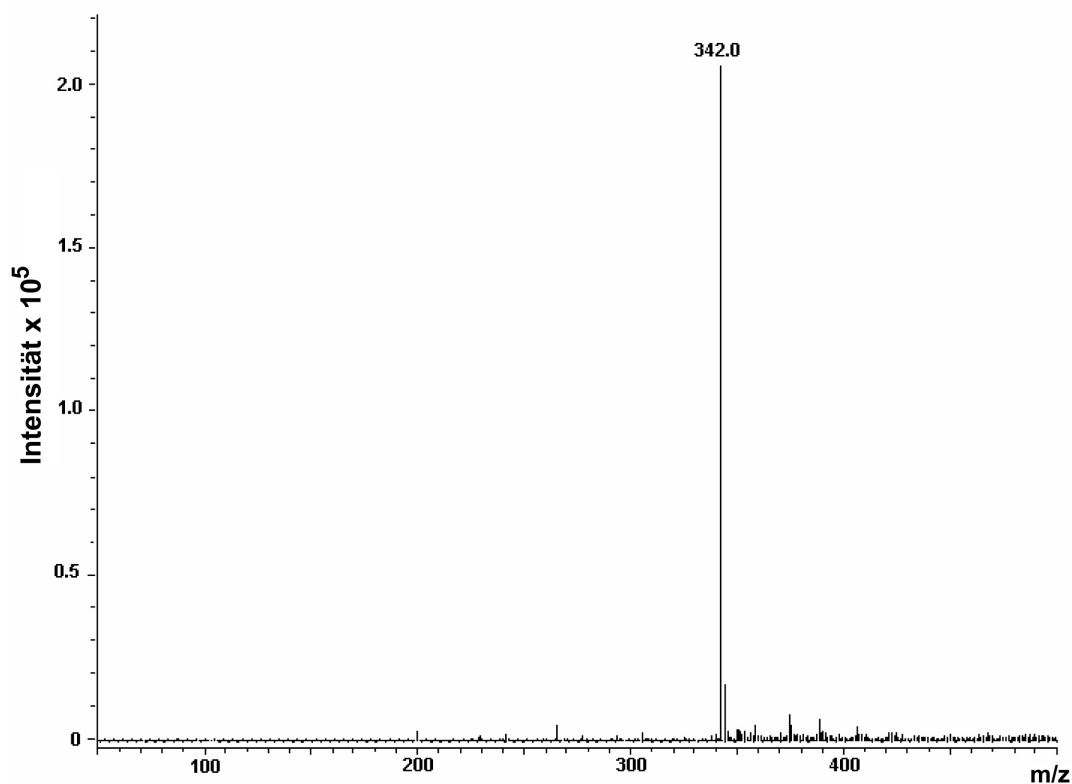
Um einen genaueren Einblick in die Beschaffenheit der Zerfallsprodukte von *m*-3M3FBS zu erhalten, wurde mit den Eluaten der HPLC sowie die mit den durch DC identifizierten Produkten eine ESI-MS-Analyse durchgeführt. Wie sich herausstellte war die Konzentration der durch die HPLC erhaltenen Fraktionen zu gering, um eindeutige Ergebnisse und Rückschlüsse auf ihre Struktur zu erhalten. Aus diesem Grund wurden die fünf, mit der 2D-DC detektierten Punkte, von der DC-Platte abgelöst und für die unter 5.2.10.1a beschriebene ESI-MS Messung, in Acetonitril aufgenommen. Das negative Massenspektrum ( $[M-H]^-$ ) des ersten Punktes zeigt zwei Haupt-Peaks bei  $m/z$  198.9 und bei  $m/z$  420.8 (Abb. 3.6i).



**Abb. 3.6i:** Analyse der Zerfallsprodukte von *m*-3M3FBS (1. Punkt). Dargestellt ist das ESI-MS-Spektrum einer Messung des in Acetonitril gelösten ersten Punktes der 2D-DC. Die Behandlung und Vorbereitung der Probe erfolgte wie im Text beschrieben und unter 5.2.10.1a angegeben. Das Spektrum zeigt ein Maximum für die freie Sulfonsäure ( $[M-H]^-$ ) bei  $m/z$  198.9 und das Maximum des Natriumsalz-Dimers ( $[M-H]^-$ ) der freien Sulfonsäure bei  $m/z$  420.8. Die dargestellte Messung ist exemplarisch für mindestens neun, voneinander unabhängig, durchgeführte Versuche.

Der erste Peak bei  $m/z$  198.9 wurde als die freie Sulfonsäure ( $[2,4,6\text{-Trimethyl-Benzosulfonsäure-H}]^-$ ) identifiziert, die nach Hydrolyse vom *m*-3M3FBS-Molekül abgespalten wird. Der zweite Peak bei  $m/z$  420.8 gehört zum Natriumsalz-Dimer ( $[M-H]^-$ ) der freien Sulfonsäure.

Während die Massenspektren der Punkte 2, 3 und 5 eine große Anzahl von nicht identifizierbaren Zerfallsprodukten des PLC-Aktivators *m*-3M3FBS zeigen, beobachtet man im Spektrum des 4. Punktes hauptsächlich einen Massenpeak bei  $m/z$  342.0 ( $[M-H]^-$ ) (Abb. 3.6j).



**Abb. 3.6j: Analyse der Zerfallsprodukte von *m*-3M3FBS (4. Punkt).** Dargestellt ist das ESI-MS-Spektrum einer Messung des in Acetonitril gelösten vierten Punktes der 2D-DC. Die Behandlung und Vorbereitung der Probe erfolgte wie im Text beschrieben und unter 5.2.10.1a angegeben. Das Spektrum zeigt ein Maximum für die Ausgangssubstanz [*m*-3M3FBS-H]<sup>+</sup> bei *m/z* 342.0. Die dargestellte Messung ist exemplarisch für mindestens neun, voneinander unabhängige, durchgeführte Versuche.

Der detektierte Peak bei *m/z* 342.0 ([M-H]<sup>+</sup>) lässt sich der Ausgangssubstanz *m*-3M3FBS zuordnen ([*m*-3M3FBS-H]<sup>+</sup>) und bestätigt damit weiter oben diskutierte Ergebnisse. Schon der Vergleich der UV-behandelten mit der unbestrahlten DC-Platte zeigte, dass es sich beim vierten Punkt um die Originalsubstanz handeln muss.

Da gezeigt werden konnte, dass der Einfluss von UV-Licht mit einer Wellenlänge von 340 nm in wässriger Lösung eine Hydrolyse und einen Abbau des PLC-Aktivators *m*-3M3FBS hervorruft, ist eine Interaktion der Zerfallsprodukte mit der Zinkhomöostase und den PLC-Signalwegen nicht auszuschließen. Da die in dieser Arbeit durchgeführten Inkubationsversuche in wässrigen Puffer-Lösungen durchgeführt werden, wird *m*-3M3FBS nicht für weitere Inkubationsexperimente verwendet (Jansen et al. 2004a).

Die erlangten Ergebnisse der PLC-Aktivierung zeigen damit hinsichtlich des Gesamtzinkgehaltes Idealerweise das gegensätzliche Resultat zur Inhibition: während eine Inhibition der PLC in einem Anstieg des zellulären Zinkgehaltes resultiert, wird bei PLC-Aktivierung ein Abfall des



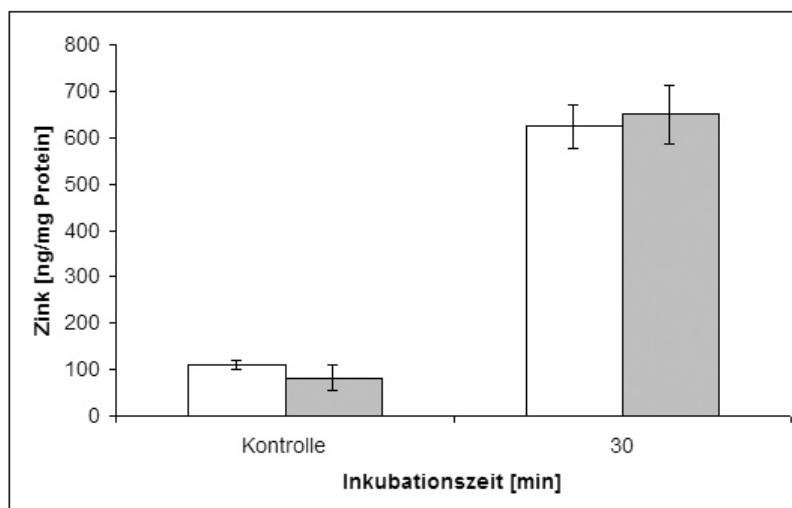
Gesamtzinkgehaltes beobachtet. Basierend auf diesem Sachverhalt, wird von einem Einfluss der PLC-Aktivität auf den zellulären Zinktransport ausgegangen.

### 3.7 Modulation der PKC-Aktivität und des freien cytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes

Wie in der Einleitung bereits erwähnt wurde, besteht durch den Zinc-sensing Receptor eine Verbindung zwischen extrazellulären Zinkkonzentrationen, der PLC-Aktivität und der intrazellulären Ausschüttung von Calcium aus  $\text{IP}_3$ -sensitiven Speichern (Hershinkel et al. 2001). Das Enzym, das durch die PLC sowie durch eine erhöhte Calciumionen-Konzentration aktiviert wird, ist die PKC. Zur Familie der PKC werden Ser/Thr-spezifische Proteinkinasen gerechnet, die durch Tumorpromotoren, wie Tetradecanoyl-Phorbol-Acetat (TPA), aktiviert werden können. Durch diese Wirkung von TPA kann nach Zugabe in zelluläre Modellsysteme überprüft werden, welche Signalübertragungswege unter Kontrolle und Beteiligung der PKC ablaufen. Um festzustellen ob dieses Enzym downstream von der PLC einen Einfluss auf den zellulären Zinktransport hat, wurde die Aktivität der PKC mit Hilfe von freigesetztem Calcium (3.7.1), TPA (3.7.2) und Calphostin C (3.7.3) moduliert.

#### 3.7.1 Der Einfluss von intrazellulärer Calciumfreisetzung durch Thapsigargin auf den zellulären Zinkgehalt

Um die Aktivität der PKC durch intrazelluläres Calcium zu steigern, wurde Thapsigargin eingesetzt, das Calciumionen aus  $\text{IP}_3$ -sensitiven Speichern freisetzt. Die in der Literatur verwendeten Konzentrationen an Thapsigargin lieferten die Grundlage für die hier durchgeführten Untersuchungen (Bowman et al. 2001, Davey et al. 2001, Morelli et al. 2001, Su et al. 2001). Der Vergleich von C6-Zellen, die ausschließlich mit  $150 \mu\text{M}$  Zink behandelt wurden, mit Zellen, die eine kombinierte Inkubation aus  $150 \mu\text{M}$  Zink und  $0.5 \mu\text{M}$  Thapsigargin erfuhren, zeigen keine Unterschiede im Gesamtzinkgehalt (Abb. 3.7.1).



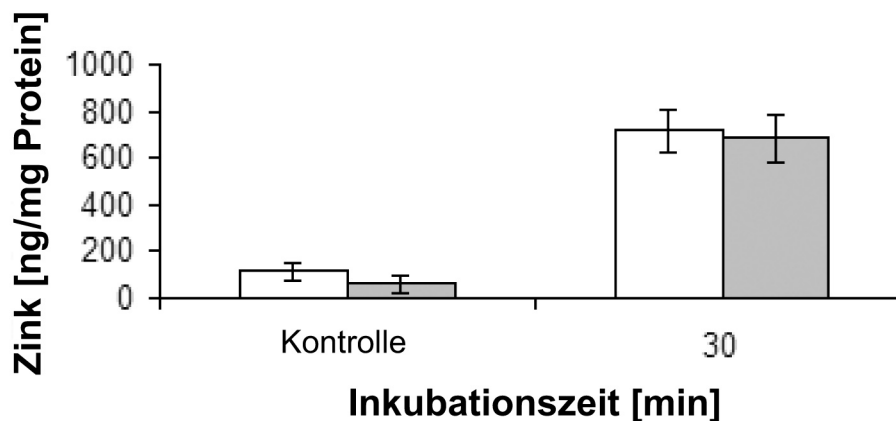
**Abb. 3.7.1: Der Einfluss von Thapsigargin auf den Gesamtzinkgehalt.** Dargestellt ist der intrazelluläre Gesamtzinkgehalt von C6-Zellen nach Inkubation mit  $150 \mu\text{M ZnCl}_2$  (weiße Balken) im Vergleich zu Zellen, die parallel mit  $150 \mu\text{M Zink}$  und  $0.5 \mu\text{M Thapsigargin}$  inkubiert wurden (graue Balken). Die verwendeten Zellen wurden für diese AAS-Messung, wie unter 5.2.5.1 beschrieben, behandelt und aufgearbeitet. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Die dargestellten Balken geben die mittlere intrazelluläre Zinkkonzentration unter Berücksichtigung des Standardfehlers aus jeweils neun Messungen ( $n=9$ ) an. Die Kontrolle blieb ohne Zugabe von Zink. Die dargestellten Ergebnisse sind exemplarisch für drei, voneinander unabhängige, durchgeführte Versuche.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine intrazelluläre Freisetzung von Calciumionen keinen Einfluss auf den Gesamtzinkgehalt in den hier eingesetzten C6-Zellen hat. Die in Abb. 3.7.1 dargestellten Resultate einer Parallelinkubation ändern sich auch bei der Durchführung einer Vorinkubation, entweder mit Zink oder Thapsigargin und unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen sowie für unterschiedliche Inkubationszeiten, kaum (Tab. 3b).

Ob das eingesetzte Thapsigargin, im Gegensatz zum Gesamtzinkgehalt, einen Einfluss auf den Gehalt an freiem zellulärem Zink hat, soll durch Hilfe einer fluorimetrischen Messung mit Zinquin E festgestellt werden. Die Fluoreszenzintensität von mit der Sonde beladenen C6-Zellen, die, wie unter 5.2.3.1 beschrieben, aufgearbeitet und vermessen wurden, steigt nach Zugabe von  $50 \mu\text{M ZnCl}_2$  durch die Bindung von  $\text{Zn}^{2+}$  an Zinquin an. Die folgende Zugabe von  $0.5 \mu\text{M Thapsigargin}$  verändert die zinkspezifische intrazelluläre Fluoreszenzintensität nicht (Tab. 3b). Somit muss davon ausgegangen werden, dass eine massive intrazelluläre Calciumfreisetzung durch Thapsigargin, und eine dadurch hervorgerufene Aktivierung der PKC in den hier verwendeten C6-Zellen, weder einen Einfluss auf den zellulären Gesamtzinkgehalt, noch auf den Anteil an freiem intrazellulärem Zink hat.

### 3.7.2 Der Einfluss des PKC-Aktivators TPA auf den zellulären Zinkgehalt

Es kann u.U. davon ausgegangen werden, dass die Menge des durch Thapsigargin freigesetzten Calciums nicht ausreicht, um die Aktivität der PKC in dem Masse zu steigern, dass sich ihr Einfluss auf den zellulären Zinkgehalt auswirkt. Um dieser Möglichkeit Rechnung zu tragen, wurde der oben bereits erwähnte spezifische PKC-Aktivator TPA eingesetzt. Die in der Literatur verwendeten Konzentrationen an TPA lieferten die Grundlage für die hier durchgeführten Experimente (Palmer und Stiles 1998, Morelli et al. 2001). Abb. 3.7.2 zeigt den Vergleich von C6-Zellen, die ausschließlich mit 150  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  inkubiert wurden, mit Zellen, die einer parallelen Inkubation mit 150  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  und 0.5  $\mu\text{M}$  TPA unterzogen wurden. Es lässt sich auch bei direkter Aktivierung der PKC kein Einfluss auf den Gesamtzinkgehalt beobachten. Eine Vorinkubation der C6-Zellen entweder mit Zink oder TPA, für unterschiedliche Zeiten und mit unterschiedlichen Konzentrationen (Tab. 3b), verändern die hier dargestellte Abnahme des zellulären Gesamtzinkgehalts kaum.



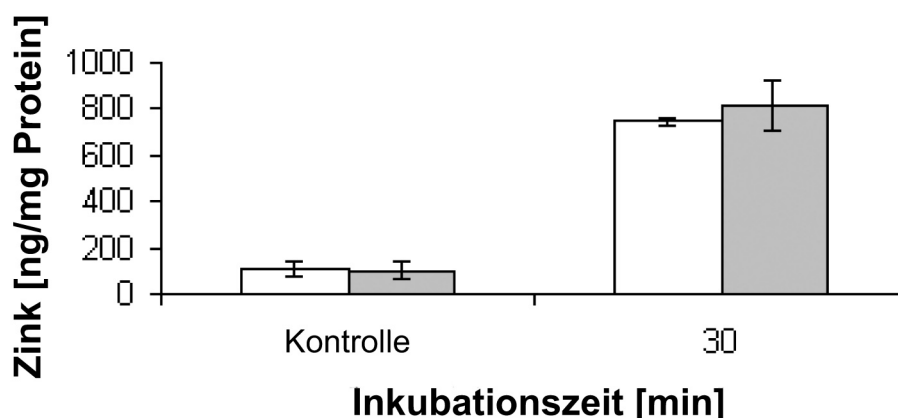
**Abb. 3.7.2: Der Einfluss von TPA auf den Gesamtzinkgehalt.** Dargestellt ist der intrazelluläre Gesamtzinkgehalt von C6-Zellen nach Inkubation mit 150  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  (weiße Balken) im Vergleich zu Zellen, die parallel mit 150  $\mu\text{M}$  Zink und 0.5  $\mu\text{M}$  TPA inkubiert wurden (graue Balken). Die verwendeten Zellen wurden für diese AAS-Messung, wie unter 5.2.5.1 beschrieben, behandelt und aufgearbeitet. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Die dargestellten Balken geben die mittlere intrazelluläre Zinkkonzentration unter Berücksichtigung des Standardfehlers aus jeweils neun Messungen ( $n=9$ ) an. Die Kontrolle blieb ohne Zugabe von Zink. Die dargestellten Ergebnisse sind exemplarisch für drei, voneinander unabhängig, durchgeführte Versuche.

Auch in diesem Fall soll zusätzlich untersucht werden, ob das eingesetzte TPA, im Gegensatz zum Gesamtzinkgehalt, einen Einfluss auf den Gehalt an freiem zellulärem Zink hat. Wieder wird mit Hilfe einer fluorimetrischen Messung und Zinquin E der Gehalt an labilem Zink beobachtet. Es zeigt sich, wie erwartet, nach Zugabe von 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  ein Anstieg in der Fluoreszenzintensität von mit der Sonde beladenen C6-Zellen, die, wie unter 5.2.3.1 beschrieben,

aufgearbeitet und vermessen wurden. Die folgende Zugabe von 0.5  $\mu\text{M}$  TPA verändert die zinkspezifische intrazelluläre Fluoreszenzintensität nicht (Tab. 3b). Dieses Experiment zeigt, dass auch eine direkte Aktivierung der PKC durch TPA in den hier verwendeten C6-Zellen, weder einen Einfluss auf den zellulären Gesamtzinkgehalt, noch auf den Anteil an freiem intrazellulärem Zink hat.

### 3.7.3 Der Einfluss des PKC-Inhibitors Calphostin C auf den zellulären Zinkgehalt

Nach indirekter und direkter Aktivierung der PKC soll abschließend die Auswirkung einer PKC-Inhibition auf den zellulären Zinkgehalt untersucht werden. Um die Aktivität der PKC auszuschalten, wird der spezifische PKC-Inhibitor Calphostin C eingesetzt. Die in der Literatur verwendeten Konzentrationen an Calphostin C lieferten die Grundlage für die hier durchgeführten Experimente (Sato et al. 1999, Morelli et al. 2001). Der Vergleich von C6-Zellen, die ausschließlich mit 150  $\mu\text{M}$  Zink behandelt wurden, mit Zellen, die eine kombinierte Inkubation aus 150  $\mu\text{M}$  Zink und 0.5  $\mu\text{M}$  Calphostin C erfuhren, zeigen keine Unterschiede im Gesamtzinkgehalt (Abb. 3.7.3).



**Abb. 3.7.3: Der Einfluss von Calphostin C auf den Gesamtzinkgehalt.** Dargestellt ist der intrazelluläre Gesamtzinkgehalt von C6-Zellen nach Inkubation mit 150  $\mu\text{M}$  ZnCl<sub>2</sub> (weiße Balken) im Vergleich zu Zellen, die parallel mit 150  $\mu\text{M}$  Zink und 0.5  $\mu\text{M}$  Calphostin C inkubiert wurden (graue Balken). Die verwendeten Zellen wurden für diese AAS-Messung, wie unter 5.2.5.1 beschrieben, behandelt und aufgearbeitet. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Die dargestellten Balken geben die mittlere intrazelluläre Zinkkonzentration unter Berücksichtigung des Standardfehlers aus jeweils neun Messungen ( $n=9$ ) an. Die Kontrolle blieb ohne Zugabe von Zink. Die dargestellten Ergebnisse sind exemplarisch für drei, voneinander unabhängige, durchgeführte Versuche.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Inhibition der PKC mit Calphostin C keinen Einfluss auf den Gesamtzinkgehalt in den hier eingesetzten C6-Zellen hat. Die in Abb. 3.7.3 dargestellten Resultate einer Parallelinkubation ändern sich auch bei der Durchführung einer Vorinkubation, entweder mit Zink oder Calphostin und unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen sowie für unterschiedliche Inkubationszeiten, kaum (Tab. 3b).

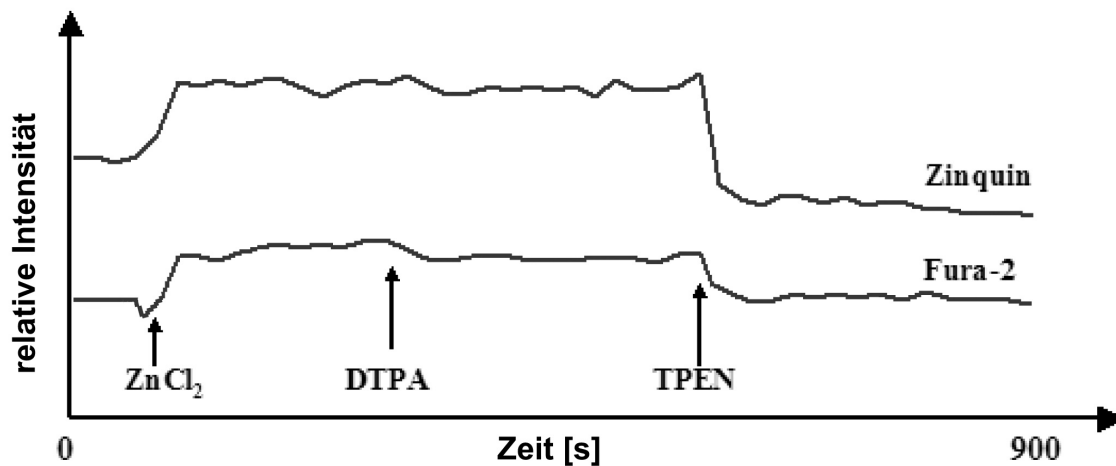
Ob das eingesetzte Calphostin C, im Gegensatz zum Gesamtzinkgehalt, einen Einfluss auf den Gehalt an freiem zellulären Zink hat, soll durch Hilfe einer fluorimetrischen Messung mit Zinquin E festgestellt werden. Die Fluoreszenzintensität von mit der Sonde beladenen C6-Zellen, die, wie unter 5.2.3.1 beschrieben, aufgearbeitet und vermessen wurden, steigt nach Zugabe von 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  durch die Bindung von  $\text{Zn}^{2+}$  an Zinquin an. Die folgende Zugabe von 0.5  $\mu\text{M}$  Calphostin C verändert die zinkspezifische intrazelluläre Fluoreszenzintensität nicht (Tab. 3b). Somit konnte in den hier verwendeten C6-Zellen gezeigt werden, dass eine Inhibition der PKC durch Calphostin C weder einen Einfluss auf den zellulären Gesamtzinkgehalt, noch auf den Anteil an freiem intrazellulärem Zink hat.

Die indirekte Aktivierung der PKC durch intrazelluläre Freisetzung von Calcium mittels Thapsigargin, sowie die direkte Aktivierung durch TPA, zeigen, ebenso wie eine direkte Inhibition mit Calphostin C, keinen Einfluss auf den zellulären Gesamtzinkgehalt sowie den Gehalt an freiem zellulärem Zink. Abschließend kann somit angenommen werden, dass die Modulation der PKC-Aktivität mit den hier durchgeführten Versuchen und den verwendeten C6-Zellen keine Auswirkungen auf den zellulären Zinkgehalt hat. Obwohl einige Autoren von einer Aktivierung der PKC durch Zink berichten (Csermely 1988, Forbes et al. 1990, Hubbard et al. 1991), wird in dem vorliegenden Modellsystem eine Beteiligung der PKC am Zinktransport ausgeschlossen (Jansen et al. 2004c).

### 3.8 Untersuchungen zum Zinc-sensing Receptor

Wie unter 2.5.8.3 beschrieben, handelt es sich beim ZnR um einen G-Proteingekoppelten Zelloberflächenrezeptor, der Veränderungen in der extrazellulären Zinkkonzentration wahrnimmt und über den PLC-Signalweg die Freisetzung von intrazellulären Calciumionen aus  $\text{IP}_3$ -sensitiven Speichern veranlasst (Hershinkel et al. 2001). Der ZnR wurde von Hershinkel et al. (2001) in den vier humanen Zelllinien HT29-Cl, HEK293, HaCat und NHK auf indirekte, fluorimetrische Weise nachgewiesen. Da keine neuronale Zelllinie (weder Neuronen noch Gliazellen) hinsichtlich des Vorhandenseins des ZnR's untersucht wurde, soll im folgenden geklärt werden, ob es sich bei C6-Gliomazellen um ZnR-positive oder ZnR-negative Zellen handelt. Aufgrund nur begrenzt zur Verfügung stehender Materialien und Apparaturen wurde die für diese Art der Messung speziell etablierte und auf der gleichzeitigen Inkubation von C6-

Zellen mit Fura-2/AM (4  $\mu\text{M}$ ) und Zinquin E (25  $\mu\text{M}$ ) beruhende, fluorimetrische Methode der Doppelfärbung angewendet (siehe 5.2.3.3). Wie Abb. 3.8a zeigt, steigt die Fluoreszenzintensität bei 340 (Fura-2) und 364 nm (Zinquin) nach Zugabe von 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  sprunghaft an. Um sicher zu gehen, dass es sich um intrazelluläre Fluoreszenz handelt, wird 100  $\mu\text{M}$  des extrazellulären Ionenchelators DTPA appliziert. Da keine Veränderung der Fluoreszenzintensitäten registriert wird, steht fest, dass es sich ausschließlich um intrazelluläre Fluoreszenz handelt (Abb. 3.8a). Die folgende Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  TPEN, einem zinkspezifischen intrazellulären Chelator, hebt den zuvor beobachteten Anstieg in der Fluoreszenzintensität wieder auf. Durch diese Beobachtung wird gezeigt, dass es sich bei der beobachteten Fluoreszenz ausschließlich um zinkspezifische Fluoreszenzintensität handelt, die durch das Binden von Zinkionen an die Sonden Fura-2 und Zinquin zustande kommt.



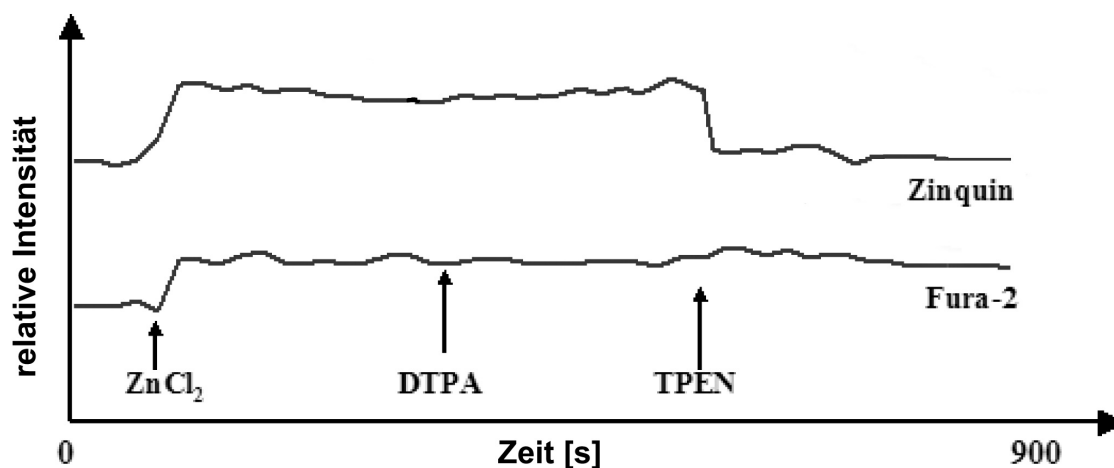
**Abb. 3.8a: Untersuchung zum ZnR in C6-Gliomazellen.** Dargestellt ist die Veränderung der Fura-2- und Zinquin-spezifischen Fluoreszenzintensitäten in C6-Zellen nach Zugabe von 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , 100  $\mu\text{M}$  DTPA und 100  $\mu\text{M}$  TPEN. Die Zugabe der Reagenzien und die Aufarbeitung der Zellen erfolgte wie im Text beschrieben, und unter 5.2.3.3 angegeben. Die dargestellte Messung ist exemplarisch für mindestens drei, voneinander unabhängig, durchgeführte Versuche.

Bei Vorhandensein eines ZnR's hätte die Zugabe von extrazellulären Zinkionen diesen Rezeptor aktiviert, und es wäre zu einer Ausschüttung von intrazellulären Calciumionen durch die gesteigerte PLC-Aktivität gekommen. Eine Zugabe von TPEN hätte dann drei mögliche Auswirkungen auf die Fura-2-Fluoreszenz: (a) Nur die zinkspezifische Zinquin-Fluoreszenz fällt ab während die Fura-2-Fluoreszenz gleich bleibt, da diese ausschließlich durch die ausgeschütteten Calciumionen hervorgerufen wird. (b) Beide Fluoreszenzen fallen zuerst ab, wobei die Fura-2-Fluoreszenz danach wieder ansteigt, die Zinquin-Fluoreszenz sich aber nicht wieder erholt. Diese Möglichkeit wäre denkbar, wenn anfänglich ausschließlich Zinkionen für die beobachteten Fluoreszenzintensitäten verantwortlich wären und nach Chelatierung

dieser, das ebenfalls ausgeschüttete Calcium an Fura-2 bindet. (c) Die Zinquin-Fluoreszenz fällt komplett ab, aber die Fura-2-Fluoreszenz verliert nur einen Teil ihrer Intensität. Dies wäre zu beobachten, wenn ein gewisser Teil der Fura-2-Fluoreszenz von Zinkionen verursacht würde, die dann chelatiert werden. In diesem Szenario wäre es auch denkbar, dass nach dem teilweisen Abfall der Fura-2-Fluoreszenz diese wieder ansteigt, da durch das chelatierte Zink Bindungsstellen frei werden, an die nun  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden können. Die in Abb. 3.8a dargestellten Beobachtungen widersprechen einem Vorhandensein des ZnR's in C6-Zellen. Zusätzlich durchgeführte Ratio-Messungen mit Fura-2 konzentrierten sich auf die Änderungen der Fluoreszenzintensität der Excitationswellenlänge des Fura-2/Calcium-Komplexes (340 nm) und der Wellenlänge des Isosbestischen Punktes (360 nm), der im Emissionsspektrum der Sonde gefunden werden kann. Solange nur Calciumionen an der beobachteten Intensitätsänderung der Fluoreszenz beteiligt sind, sollte sich die Fluoreszenzintensität des Isosbestischen Punktes nicht verändern. Es konnte aber beobachtet werden, dass sich die Intensität der Fluoreszenz am Isosbestischen Punkt parallel mit der Fluoreszenzintensität bei 340 nm ändert und damit zeigt, dass der Anstieg der Fluoreszenzintensität nicht durch das Binden von Calciumionen an die Fluoreszenzsonde Fura-2 hervorgerufen wird.

Um sicherzustellen, dass die angewendete Methode der indirekten, fluorimetrischen Identifikation des ZnR's tatsächlich das Potential hat, einen möglicherweise vorhandenen Rezeptor zu identifizieren, wurde, parallel zu den C6-Zellen, exakt die gleiche Versuchsdurchführung (siehe 5.2.3.3) für die humane Lungenepithelzelllinie A549 gewählt.

Anfänglich zeigt sich der gleiche Verlauf wie in Abb. 3.8a beobachtet. Nach Zugabe von 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  steigt die Fluoreszenzintensität bei 340 (Fura-2) und 364 nm (Zinquin) sprunghaft an (Abb. 3.8b). Um auch in diesem Fall sicher zu gehen, dass es sich um intrazelluläre Fluoreszenz handelt, wird 100  $\mu\text{M}$  des extrazellulären Ionenchelators DTPA appliziert. Da keine Veränderung der Fluoreszenzintensitäten registriert wird, steht auch in diesem Versuch fest, dass es sich ausschließlich um intrazelluläre Fluoreszenz handelt (Abb. 3.8b). Die folgende Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  TPEN senkt spezifisch die komplette Fluoreszenzintensität von Zinquin, die Fura-2-Fluoreszenz vermag der Chelator nur sehr leicht negativ zu beeinflussen.



*Abb. 3.8b: Untersuchung zum ZnR in A549 Lungenepithelzellen. Dargestellt ist die Veränderung der Fura-2- und Zinquin-spezifischen Fluoreszenzintensitäten in A549-Zellen nach Zugabe von 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , 100  $\mu\text{M}$  DTPA und 100  $\mu\text{M}$  TPEN. Die Zugabe der Reagenzien und die Aufarbeitung der Zellen erfolgte wie im Text beschrieben und unter 5.2.3.3 angegeben. Die dargestellte Messung ist exemplarisch für mindestens drei, voneinander unabhängig, durchgeführte Versuche.*

Diese Beobachtung entspricht der oben diskutierten Möglichkeit eines kompletten Abfalls der Zinquin-Fluoreszenz bei gleichzeitigem geringem Verlust der Fura-2-Fluoreszenz. Dies wäre zu beobachten wenn nur ein gewisser Teil der Fura-2-Fluoreszenz von Zinkionen verursacht wurde, die dann durch TPEN chelatiert werden. Die übrigbleibende Fluoreszenz kommt durch das Binden von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an die Sonde zustande. Somit weisen die in Abb. 3.8b dargestellten Beobachtungen auf das mögliche Vorhandensein des ZnR's in A549-Zellen hin. Auch in diesem Fall durchgeführte Ratio-Messungen mit Fura-2 konzentrierten sich wieder auf die Änderungen der Fluoreszenzintensität der Excitationswellenlänge des Fura-2/Calcium-Komplexes (340 nm) und der Wellenlänge des Isosbestischen Punktes (360 nm). Auch in diesem Fall sollte sich die Fluoreszenzintensität des Isosbestischen Punktes nicht ändern, wenn ausschließlich Calciumionen an der beobachteten Intensitätsänderung der Fluoreszenz beteiligt sind. Es konnte beobachtet werden, dass sich die Intensität der Fluoreszenz am Isosbestischen Punkt nur kurzzeitig mit der Fluoreszenzintensität bei 340 nm ändert und dann konstant blieb, womit gezeigt werden kann, dass der Anstieg der Fluoreszenzintensität zum größten Teil durch das Binden von Calciumionen an die Fluoreszenzsonde Fura-2 hervorgerufen wird.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die angewendete Methode der indirekten, fluorimetrischen Identifikation des ZnR's das Potential hat, einen vorhandenen Rezeptor zu identifizieren. Somit kann davon ausgegangen werden, dass in C6-Zellen kein solcher Rezeptor vorliegt. Nur die noch ausstehende Sequenzierung des ZnR's kann die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse bestätigen oder widerlegen (siehe 4.4).



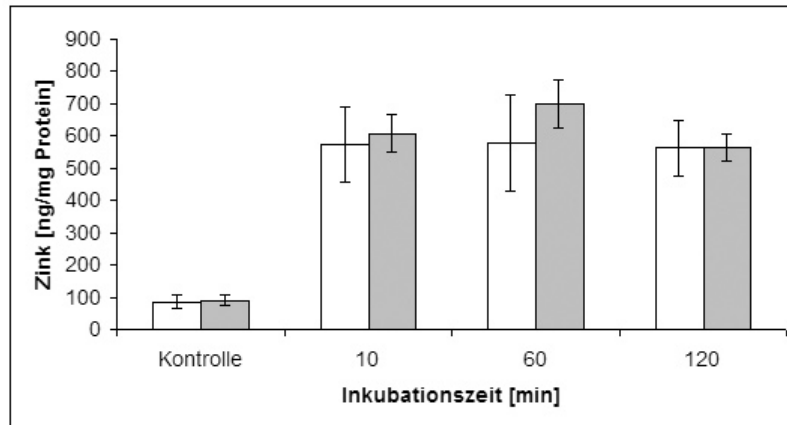
### 3.9 Der Einfluss von Translation und Histon-Acetylierung auf den zellulären Gesamtzinkgehalt in C6-Zellen

Die theoretische Grundlage dieser abschließenden Versuche ist die Annahme der Möglichkeit, dass eine permanent vorherrschende, nahezu toxische Konzentration an extrazellulärem Zink, C6-Zellen dazu veranlasst, ihre Proteinbiosynthese an diesen Umstand anzupassen. Es wäre denkbar, dass durch diese Umstände eine erhöhte Anzahl der in der Einleitung erwähnten Zinktransporter exprimiert wird (siehe 2.3). Aus diesem Grund soll an dieser Stelle, mit den zu Verfügung stehenden Möglichkeiten, der Einfluss der Translation sowie der Histon-Acetylierung auf den zellulären Gesamtzinkgehalt untersucht werden. Aufgrund der fehlenden zeitlichen Aussagekraft eines Einflusses der Translation und Histon-Acetylierung auf den freien zellulären Zinkgehalt, wird von diesbezüglichen fluorimetrischen Messungen abgesehen.

#### 3.9.1 Der Einfluss einer direkten Translations-Inhibition auf den Gesamtzinkgehalt

Um einen möglichen translationalen Einfluss auf den Gesamtzinkgehalt zu untersuchen, wurde der spezifische Inhibitor Cycloheximid gewählt, für den sich in der Literatur Konzentrationen von 5-10 mM bei 1- bis 24-stündiger Inkubation in C6-Zellen als wirkungsvoll erwiesen (Miyoshi et al. 2001, Chacko und Adamo 2002). Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde eine parallele Inkubation von C6-Zellen mit 150  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  und 10 mM Cycloheximid gewählt. Der Vergleich von C6-Zellen, die ausschließlich mit 150  $\mu\text{M}$  Zink behandelt wurden, mit Zellen, die eine kombinierte Inkubation aus 150  $\mu\text{M}$  Zink und 10 mM Cycloheximid erfuhren, zeigen keine Unterschiede im Gesamtzinkgehalt (Abb. 3.9.1).

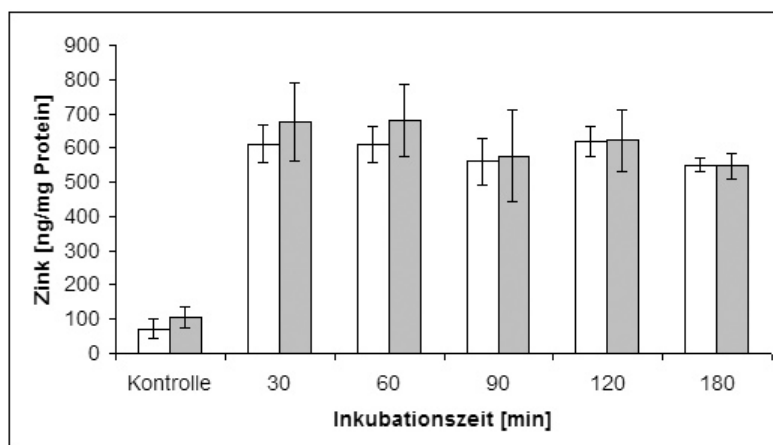
Die Inkubationszeiten wurden mit 10, 60 und 120 Minuten so gewählt, dass eine eindeutige Aussage über den Einfluss der Translation auf den zellulären Gesamtzinkgehalt möglich wird. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Inhibition der Translation durch Cycloheximid keinen Einfluss auf den Gesamtzinkgehalt in den hier eingesetzten C6-Zellen hat. Von der Durchführung einer Vorinkubation, entweder mit Zink oder Cycloheximid wurde abgesehen, da die zu untersuchende Fragestellung nur ungenügend adressiert werden würde.



**Abb. 3.9.1: Der Einfluss von Cycloheximid auf den Gesamtzinkgehalt.** Dargestellt ist der intrazelluläre Gesamtzinkgehalt von C6-Zellen nach Inkubation mit 150 µM ZnCl<sub>2</sub> (weiße Balken) im Vergleich zu Zellen, die parallel mit 150 µM Zink und 10 mM Cycloheximid inkubiert wurden (graue Balken). Die verwendeten Zellen wurden für diese AAS-Messung, wie unter 5.2.5.1 beschrieben, behandelt und aufgearbeitet. Die Inkubationszeiten sind angegeben. Die dargestellten Balken geben die mittlere intrazelluläre Zinkkonzentration unter Berücksichtigung des Standardfehlers aus jeweils neun Messungen (n=9) an. Die Kontrolle blieb ohne Zugabe von Zink. Die dargestellten Ergebnisse sind exemplarisch für drei, voneinander unabhängige, durchgeführte Versuche.

### 3.9.2 Der Einfluss einer erhöhten Histon-Acetylierung auf den Gesamtzinkgehalt

Um einen möglichen Einfluss der Histon-Acetylierung auf den Gesamtzinkgehalt zu untersuchen, wurde der Histon-Deacetylase-Inhibitor TSA eingesetzt. Durch den Einsatz von TSA wird nicht nur die Histon-Acetylierung aufrechterhalten, sondern man kann von einer indirekten Aktivierung der Transkription ausgehen. Der durch TSA hervorgerufenen aufgelockerten Nukleosomstruktur ist es zu verdanken, dass es Transkriptionsfaktoren erleichtert wird, an die DNA zu binden. Abb. 3.9.2 zeigt den Vergleich von C6-Zellen die ausschließlich mit 150 µM ZnCl<sub>2</sub> inkubiert wurden, mit Zellen, die einer parallelen Inkubation mit 150 µM ZnCl<sub>2</sub> und 1.32 mM TSA unterzogen wurden. Die eingesetzten Konzentrationen sowie die gewählten Inkubationszeiten zeigten sich in der Literatur als wirkungsvoll (Furumai et al. 2001, Cabral et al. 2002). Es lässt sich bei indirekter Aktivierung der Transkription durch eine Inhibition der Histon-Deacetylase kein Einfluss auf den Gesamtzinkgehalt beobachten.



**Abb. 3.9.2: Der Einfluss von TSA auf den Gesamtzinkgehalt.** Dargestellt ist der intrazelluläre Gesamtzinkgehalt von C6-Zellen nach Inkubation mit  $150 \mu\text{M ZnCl}_2$  (weiße Balken) im Vergleich zu Zellen, die parallel mit  $150 \mu\text{M Zn}$  und  $1.32 \text{ mM TSA}$  inkubiert wurden (graue Balken). Die verwendeten Zellen wurden für diese AAS-Messung, wie unter 5.2.5.1 beschrieben, behandelt und aufgearbeitet. Die Inkubationszeiten sind angegeben. Die dargestellten Balken geben die mittlere intrazelluläre Zinkkonzentration unter Berücksichtigung des Standardfehlers aus jeweils neun Messungen ( $n=9$ ) an. Die Kontrolle blieb ohne Zugabe von Zink. Die dargestellten Ergebnisse sind exemplarisch für drei, voneinander unabhängig, durchgeführte Versuche.

Die Inkubationszeiten wurden mit 10, 60, 90, 120 und 180 Minuten so gewählt, dass eine Aussage über den Einfluss der Histon-Acetylierung auf den zellulären Gesamtzinkgehalt möglich wird. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Inhibition der Histon-Deacetylasen durch TSA keinen Einfluss auf den Gesamtzinkgehalt in den hier eingesetzten C6-Zellen hat. Von der Durchführung einer Vorinkubation, entweder mit Zink oder TSA wurde abgesehen, da die zu untersuchende Fragestellung nur ungenügend adressiert werden würde.

### 3.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

**Tab. 3a: Zusammenfassung der Zinkaufnahme-Untersuchungen in C6-Zellen.** Dargestellt sind die Ergebnisse aus AAS-Messungen mit Zellen, die mit  $150 \mu\text{M ZnCl}_2$  für die angegebenen Zeiten inkubiert wurden. Die verwendeten C6-Zellen wurden wie unter 5.2.5.1 beschrieben behandelt und aufgearbeitet. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus neun Messungen ( $n = 9$ ).

Intervalllänge	Gesamtzeit	Zinkgehalt nach dem ersten Messintervall [ng/mg Protein]	Abbildung
2 Stunden	5 Stunden	480	3.2a
1 Stunde	4 Stunden	500	-
30 Minuten	2 Stunden	600	3.2b
10 Minuten	60 Minuten	580	-
5 Minuten	30 Minuten	502	-
2 Minuten	10 Minuten	435	-
30 Sekunden	180 Sekunden	455	3.2c

**Tab. 3b: Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Modulatoren der Signaltransduktion in C6-Zellen.** Dargestellt sind die Auswirkungen auf den Gesamtzinkgehalt mittels AAS und auf den Gehalt an freiem, intrazellulärem Zink mittels Fluoreszenz-Spektrometrie. Die Ergebnisse aus AAS-Messungen stammen von C6-Zellen, die mit 150  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  und den jeweilig angegebenen Konzentrationen und Zeiten inkubiert wurden. Diese Zellen wurden wie unter 5.2.5.1 beschrieben behandelt und aufgearbeitet. Die Behandlung der C6-Zellen, die für die Fluoreszenz-Spektrometrie verwendet wurden, ist unter 5.2.3.1, sowie im jeweiligen Text, beschrieben.

Eingesetzter Modulator der Signaltransduktion	Abb.	Ziel und Wirkung des eingesetzten Modulators	Eingesetzte Konzentrationen	Verwendete Inkubationszeiten	Beobachtete Auswirkungen auf den zellulären Gesamtzinkgehalt	Beobachtete Auswirkungen auf den Gehalt an freiem, zellulärem Zink
A23187	3.1.3a 3.1.3b	$\text{Ca}^{2+}$ Ionophor	1.9, 100, 200 nM	30, 60, 90 min	Anstieg	Anstieg
SNOC	3.3.1a 3.3.1c	NO-Donor, GC- Aktivator	250 $\mu\text{M}$	30, 60, 90, 120 min	Keine Auswirkungen	Indirekte Wirkung durch L-Cystein und NO
SNOG	3.3.1b 3.3.1d	NO-Donor, GC- Aktivator	250 $\mu\text{M}$	5, 10, 15 min	Keine Auswirkungen	Indirekte Wirkung durch L-Cystein und NO
Diethylamine NONOate	3.3.1g	NO-Donor	250 $\mu\text{M}$	30, 60, 90, 120 min	Keine Auswirkungen	Anstieg
LY83583	3.3.2	GC- Inhibitor	1.6 $\mu\text{M}$	30, 60, 90, 120 min	Keine Auswirkungen	Keine Auswirkungen
Rp-8-pCPT- cGMPS	3.3.3	cGMP- Analogon, Aktivator der PKG	1, 10, 100 $\mu\text{M}$	30, 60, 120 min	Keine Auswirkungen	Keine Auswirkungen
Sp-5,6-DCI- cBIMPS	3.4.1	cAMP- Analogon, Aktivator der PKA I	1, 10, 100 $\mu\text{M}$	30, 60, 120 min	Keine Auswirkungen	Keine Auswirkungen

Eingesetzter Modulator der Signaltransduktion	Abb.	Ziel und Wirkung des eingesetzten Modulators	Eingesetzte Konzentrationen	Verwendete Inkubationszeiten	Beobachtete Auswirkungen auf den zellulären Gesamtzinkgehalt	Beobachtete Auswirkungen auf den Gehalt an freiem, zellulären Zink
8-Bromo-cAMP	3.4.2	cAMP-Analagon, Aktivator der PKA I+II	1 mM	30, 60, 90, 180 min	Abfall	Nicht untersucht
IBMX	3.5a 3.5b	Inhibitor der PDEs	500 $\mu$ M	5, 10, 15, 20, 30 min	Abfall	Nicht untersucht
Neomycin	3.6a	PLC-Inhibitor	50, 500, 5000 $\mu$ M	10, 30, 60 min	Anstieg	Nicht untersucht
U73122	3.6b	PLC-Inhibitor	10 $\mu$ M	10, 30, 60 min	Anstieg	Nicht untersucht
Imipramine	3.6c	PLC-Aktivator	100, 250, 500 $\mu$ M	5, 10, 15, 30, 60 min	Abfall	Nicht untersucht
ADP	3.6d	PLC-Aktivator	5, 10, 20 $\mu$ M	5, 15, 30, 60 min	Abfall	Nicht untersucht
<i>m</i> -3M3FBS	3.6e	PLC-Aktivator	10, 20, 40 $\mu$ M	bis 15 min	Nicht untersucht	Indirekter Einfluss auf die Fluoreszenz
Thapsigargin	3.7.1	Freisetzung von intrazellulären $Ca^{2+}$	0.5 $\mu$ M	30, 60 min	Keine Auswirkungen	Keine Auswirkungen
TPA	3.7.2	PKC-Aktivator	0.5 $\mu$ M	30, 60 min	Keine Auswirkungen	Keine Auswirkungen
Calphostin C	3.7.3	PKC-Inhibitor	0.5 $\mu$ M	30, 60 min	Keine Auswirkungen	Keine Auswirkungen
Cycloheximid	3.9.1	Aktivator der Translation	10 mM	4, 8, 12 h	Keine Auswirkungen	Nicht untersucht
Trichostatin A	3.9.2	Inhibitor der Histon Deacetylase	1.32 mM	24, 48 h	Keine Auswirkungen	Nicht untersucht

## 4. Diskussion

Das Spurenelement Zink ist essentiell für Proliferation und Differenzierung der Zellen aller Organismen, von Prokaryonten bis zum Menschen. Dies nicht zuletzt, weil die im menschlichen Körper enthaltenen 2-3 g Zink, in mehr als 300 Enzymen aller 6 Enzymklassen vorkommen, in denen es sowohl strukturelle, als auch katalytische Funktionen hat. Zusätzlich gibt es mehrere tausend Transkriptionsfaktoren in denen Zink in sogenannten Zinkfinger-Motiven vorkommt. Analysen des menschlichen Genoms zeigen, dass bis zu 3% aller Proteine solche Zinkfingerdomänen aufweisen (Lander 2001). Besondere Bedeutung bekommt die regulatorische Funktion von Zink durch die Beobachtung, dass die Konzentration an freiem zellulärem Zink nicht konstant ist, sondern fluktuiert. In der vorliegenden Arbeit sollten die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen des Zinktransports und die Möglichkeit einer regulativen Funktion von Zink in der zellulären Signalübertragung untersucht werden.

### 4.1 Cytotoxische Wirkungen von Zink

Die Ergebnisse des Neutralrottests zeigen die Existenz einer zeit- und konzentrationsabhängigen cytotoxischen Wirkung von Zinkchlorid. Hohe Konzentrationen von 500  $\mu\text{M}$  werden über kurze Zeiträume von ein bis zwei Stunden von den Zellen vertragen, wobei nach drei Stunden die höchstverträgliche Konzentration auf 150  $\mu\text{M}$  absinkt. Diese Konzentration verschiebt sich dann aber bei deutlich längerer Inkubationsdauer nur noch gering und liegt nach 24 Stunden bei 100  $\mu\text{M}$ . Die kleinste chronische Zinkkonzentration liegt bei der DNA-Fragmentierung, im Gegensatz zu den Ergebnissen des Neutralrottests, bei 150  $\mu\text{M}$  extrazellulär zugegebenen Zinks und damit ebenfalls höher als die in der Literatur angegebenen Werte (Haase und Beyersmann 1999). Die hohe Zinkverträglichkeit liegt in diesem Fall aller Wahrscheinlichkeit nach am Subklon der verwendeten C6-Zelllinie. Für die meisten, der in dieser Arbeit durchgeführten Inkubationsversuche, wurde eine extrazelluläre Konzentration von 150  $\mu\text{M}$  Zink gewählt, um einen Stimulus für den verstärkten Zinkexport zu setzen. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Inkubationsversuche lagen die Inkubationszeiten zum größten Teil zwischen 30 Sekunden und 90 Minuten, somit ist selbst bei der Verwendung einer hohen Zinkkonzentration von 150  $\mu\text{M}$  nicht von einer akuten Induktion der Apoptose auszugehen. Ebenfalls ergibt sich für diese Zinkkonzentration eine physiologische Relevanz für Glia-Zellen, berücksichtigt man, dass während der interneuronalen Signaltransduktion Konzentrationen von 300  $\mu\text{M}$  Zink im synaptischen Spalt auftreten (Frederickson 2000).

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, ist bekannt, dass gewisse Agenzien den durch hohe Zinkkonzentrationen ausgelösten programmierten Zelltod positiv sowie negativ beeinflussen können. Der für diese Arbeit wichtige Crosstalk zwischen Zink und dem „second messenger“

Calcium, sowie die durch diese divalenten Kationen aktivierten Signalwege, wurde die Wirkung des Calciumionophors A23187 auf den intrazellulären Zinkimport untersucht. Es war bekannt, dass A23187 in der Lage ist, neben Calcium auch Zink und Mangan zu transportieren (Erdahl et al. 1996). Ebenfalls liegen von Haase (2001) Ergebnisse mit dem Ionophor Pyrithion vor, die zeigen, dass Pyrithion in der Lage ist, den Zinkinflux von nicht-toxischen, extrazellulären Zinkkonzentrationen zu verstärken und damit Apoptose auszulösen. Aus diesem Grund wurden die in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen von A23187 in Kombination mit Zink auf ihre apoptoseinitiiierende Wirkung untersucht. Die erlangten Ergebnisse zeigen, dass weder A23187, noch Zink mit den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen in der Lage sind, programmierten Zelltod auszulösen. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass A23187, ähnlich wie Pyrithion, in der Lage ist, den Zinkeinstrom von nicht-toxischen, extrazellulären Zinkkonzentrationen zu verstärken und dadurch Apoptose auszulösen (Jansen et al. 2003).

#### **4.2 Zelluläre Zinkaufnahme**

Der Import und die Verteilung von Zink ist in C6-Zellen umfangreich untersucht und dokumentiert worden (Galvani et al. 1995, Reyes 1996, Wu et al. 1997, Haase und Beyersmann 1999, Takeda et al. 2001). Der Großteil dieser Untersuchungen beschränkt sich jedoch auf eine mögliche cytotoxische Wirkung von Zink sowie dessen Einfluss auf die Apoptose in C6-Zellen und weniger mit der zellulären Zinkaufnahme über die Zeit (Sundermann 1995; Haase 2001). Studien zur Zinkaufnahme, wie die von Reyes (1996) und Kern et al. (2000), befassten sich mit Zeiten jenseits von einer Stunde, nur bei Wellinghausen und Rink (1998) und Haase (2001) finden sich Zeiten von einer halben Stunde oder weniger. Hauptsächlich wurden diese Versuche zur Optimierung der jeweiligen Fragestellungen durchgeführt, und die erhaltenen Werte lieferten Auskunft über den intrazellulären Gesamtzinkgehalt zu spezifischen Zeiten. Untersuchungen zum Zinkexport in C6-Zellen sind selten. Definitive Anhaltspunkte für eine schnelle Zinkexport-Funktion finden sich nur bei Haase (2001) im Zusammenhang mit der Wirkung von Lanthan.

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur zeitlichen Aufnahme von Zink zeigen in der Atomabsorption (Abb. 3.2a) sowie in der Fluoreszenz (u.a. Abb. 3.3.1c) einen sehr schnellen Aufnahme-Prozess in die Zelle. Korreliert man den intrazellulären Gehalt an Zink mit der Zellzahl, so ist dieser in der Wachstumsphase, bedingt durch proliferative Prozesse, deutlich gesteigert. Den entgegengesetzten Effekt eines Absinkens des intrazellulären Zinkgehalts erhält man durch Änderung der Bezugsgröße und in einem Vergleich von Proteinmenge und intrazellulärem Zinkgehalt. Dieser Effekt wird durch den Umstand hervorgerufen, dass der Wert der Proteinneusynthese während der Wachstumsphase den Wert der Zinkaufnahme in der Proliferation übersteigt, und zu einer relativen Abnahme des gemessenen intrazellulären Zinks führt (Haase 2001).



Zur Aufdeckung einer möglichen Regulation der Zinkaufnahme und der Zinkhomöostase wurden von Haase (2001) Versuche durchgeführt, die eine extrazelluläre Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Zinkchlorid als Schwellenwert der Toxizität identifizierten. War bis zu jenem Wert keine deutliche Erhöhung des intrazellulären Zinkgehalts zu detektieren, konnte oberhalb dessen aber eine deutliche Zunahme gemessen werden. Extrazelluläre Zinkkonzentrationen von 50 und 100  $\mu\text{M}$  ergaben in der AAS keine Erhöhung des intrazellulären Gesamtzinkgehalts. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass mit 150  $\mu\text{M}$  Zinkchlorid inkubierte Zellen innerhalb der ersten Stunde einen Anstieg im Gesamtzinkgehalt aufwiesen, der dann nach drei bis fünf Stunden abflachte (Haase 2001). Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur Zinkaufnahme ist ein solcher Schwellenwert bei 100  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  von besonderer Bedeutung. Wichtig ist die Erkenntnis, dass es nach länger andauernder Inkubation von ca. fünf Stunden mit 150  $\mu\text{M}$  Zinkchlorid zu einem Schwellenwert der maximalen zellulären Zinkkonzentration kommt und es in C6-Zellen einen Mechanismus geben muss, der diese Sättigung hervorruft. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Studien zur Zinkaufnahme legen nahe, dass eine Reduktion in der Zinkaufnahme, innerhalb eines Zeitraums von 30 Sekunden bis 30 Minuten nach Beginn der Inkubation mit Zinkchlorid, nicht stattfindet. Es wird davon ausgegangen, dass es sich um langsamer arbeitende Regulationsvorgänge handelt. Nimmt man als Antwort auf übermäßige Aufnahme von Zink einen homöostatischen Regulationsmechanismus an, so wäre ein schneller Export von Zink aus der Zelle zu erwarten. Eine weitergehende Steigerung der Zinkaufnahme würde wahrscheinlich in einer Sättigung dieses Mechanismus resultieren, der durch negative Regulation des Zinkimports oder Blockierung des Zinkexports ausgelöst wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen versucht, den regulativen Mechanismus, der für die Entstehung des oben diskutierten Schwellenwertes verantwortlich ist, auf der Ebene der intrazellulären Signaltransduktion zu identifizieren. Zum anderen wurden, basierend auf der Erkenntnis, dass das intrazelluläre freie Zink mit großer Wahrscheinlichkeit ein Bestandteil der Signaltransduktion ist, Mechanismen gesucht, die einen Einfluss auf den Gesamtzinkgehalt sowie den Gehalt an labilem zellulärem Zink haben.

### 4.3 Signaltransduktion und Zinkaufnahme

Um einen möglichen regulativen Einfluss auf die Zinkhomöostase zu untersuchen, wurde, wie unter 3.3 beschrieben, der cGMP-PKG-Signalweg untersucht (Abb. 4.3.1). Von Wätjen et al. (2001) liegen Ergebnisse über PC12-Zellen vor, die zeigen, dass der „second messenger“ cGMP, wahrscheinlich über cGMP-abhängige Proteinkinasen, Zinkimportproteine hemmt und dadurch die Zinkaufnahme in die Zelle verringert. Das Enzym, das die Synthese von cGMP aus GTP katalysiert, ist die Guanylat-Cyclase. Eine Aktivierung der GC würde somit zu einem Anstieg des intrazellulären cGMP-Spiegels führen, wodurch cGMP in der Lage wäre, seine möglicherweise hemmende Wirkung auf Zinkimportproteine auszuüben. Eine solche

Wirkungsweise müsste sich in einem Absinken des intrazellulären Zinkgehaltes widerspiegeln. Im Gegensatz zur oben diskutierten Aktivierung, erwirkt eine Inhibition der GC einen Abfall des intrazellulären cGMP-Levels, wodurch cGMP nicht mehr in der Lage wäre, seine hemmende Wirkung auf Zinkimportproteine auszuüben. Eine solche Wirkungsweise müsste sich hingegen in einem erhöhten intrazellulären Zinkgehalt widerspiegeln. Beide Modulationsmöglichkeiten der GC-Aktivität wurden in dieser Arbeit hinsichtlich eines Einflusses auf den Zinkgehalt in C6-Zellen untersucht.

In den vorliegenden Versuchen wurde der Umstand ausgenutzt, dass aus der Bindung von NO eine Konformationsänderung der GC resultiert, die zu einer gesteigerten Aktivität des Enzyms führt (Stamler 1994). Als NO-Donoren wurden S-Nitrosocystein und S-Nitrosoglutathion verwendet. Die Aktivierung der Guanylat-Cyclase mit Hilfe von SNOC bzw. SNOG zeigt keinen signifikanten Abfall des Gesamtzinkgehaltes. Somit konnten Ergebnisse von anderen Autoren, die durch Aktivierung der Guanylat-Cyclase mittels NO einen Einfluss auf den Gesamtzinkgehalt beobachten konnten, nicht bestätigt werden. Anders hingegen verliefen Untersuchungen zum Einfluss von SH-Gruppen-freien NO-Donoren auf den Gehalt an freiem zellulärem Zink. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, hat der proteingebundene Teil des zellulären Zinks meist Cystein-Thiolgruppen als Liganden und kann durch Oxidation dieser Thiole aus seiner Protein-Bindungsstelle freigesetzt werden. Es wurde gezeigt, dass auf diese Weise der Redoxstatus der Zelle den Gehalt an freiem Zink durch oxidative Freisetzung aus Zink-Speicherproteinen, hauptsächlich Metallothionein (MT), beeinflusst (Maret und Vallee 1998). Durch Manipulation des zellulären Redoxstatus mittels Oxidantien (Turan et al. 1997) oder Stickstoffmonoxid (Berendji et al. 1997) werden Fluktuationen im zellulären freien Zink ausgelöst, die im Falle von Stickstoffmonoxid zur Freisetzung aus MT führten (Pearce et al. 2000). Es hätte also erwartet werden können, dass nach Zugabe von NO-Donoren ein Anteil des proteingebundenen Zinks durch Stickstoffmonoxid freigesetzt wird und an die Sonde bindet, woraus ein Anstieg der Fluoreszenzintensität resultiert hätte. Da eine entgegengesetzte Entwicklung beobachtet wurde, muss von einer anderen Reaktion als Ursache für den beobachteten Abfall der Fluoreszenz ausgegangen werden. Eine Erklärung wäre, dass Zinkionen an die Cystein-Thiolgruppen von L-Cystein und L-Glutathion, die die jeweiligen Proteinkomponenten von SNOC und SNOG darstellen, binden. Ebenfalls ist nicht bekannt ob Stickstoffmonoxid mit der Zinksonde Zinquin, oder mit dem nach Bindung von  $Zn^{2+}$  gebildeten Zink/Zinquin-Komplex, reagiert. Beide Möglichkeiten könnten u.U. zu dem beobachteten Abfall der Fluoreszenzintensität und damit zur Missinterpretation der unter 3.3.1c-d erlangten Ergebnisse führen. Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit der verwendeten NO-Donoren muss davon ausgegangen werden, dass die chemische Reaktion, die zum Abfallen der Fluoreszenzintensität führt, für beide NO-Donoren identisch ist. Deswegen wurde in den folgenden Experimenten ausschließlich SNOC verwendet. Da weder L-Cystein noch Natriumnitrit eine Eigenfluoreszenz bei den verwendeten Wellenlängen besitzen, wurde der unter 3.3.1c durchgeführte Versuch in einem zellfreien System wiederholt. Der in Abb. 3.3.1e dargestellte Verlauf der Fluoreszenz ohne Zellen ist im

allgemeinen identisch mit dem Ergebnis, das durch Zugabe von SNOC zu C6-Zellen erlangt wurde (Abb. 3.3.1c). Da für alle Untersuchungen im zellfreien System jeweils ein Versuch mit Messpuffer sowie ein Versuch mit bidestilliertem Wasser durchgeführt wurde, konnte ein Einfluss des pH-Wertes auf die beobachtete Reaktion ausgeschlossen werden. Untersuchungen über die Wirkung der Inhaltsstoffe von SNOC auf die Fluoreszenzintensität zeigten, dass nicht  $\text{NaNO}_2$ , sondern L-Cystein für den charakteristische Abfall der Fluoreszenzintensität verantwortlich ist (Abb. 3.3.1f). Identische Untersuchungen mit Zellen bestätigen ebenfalls die beschriebenen Ergebnisse im zellfreien System. Der beobachtete Abfall der zinkspezifischen Fluoreszenzintensität scheint damit auf der alleinigen Wirkung von L-Cystein zu beruhen. Da, wie bereits erwähnt, Zink über Cystein- und Histidin-Reste mit Proteinen bindet, kann davon ausgegangen werden, dass L-Cystein über seine SH-Gruppen mit Zink interagiert und in der Lage ist,  $\text{Zn}^{2+}$  aus dem bereits gebildeten Zink/Zinquin-Komplex zu lösen.

Um die mögliche Bildung von Zink/Cystein-Komplexen zu untersuchen, wurde der Einfluss von starken Oxidationsmitteln auf die zinkspezifische Fluoreszenz geprüft. Oxidationsmittel sind in der Lage, durch die Bildung von Disulfidbrücken, den Anteil an freiem L-Cystein drastisch zu senken. Die daraus resultierende Freisetzung von  $\text{Zn}^{2+}$  aus Zink/L-Cystein-Komplexen führt somit wieder zum fluoreszierenden Komplex mit Zinquin. In der Tat führte die Zugabe von entweder 100  $\mu\text{M}$  Kaliumpermanganat oder 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in einem Versuch, wie unter 3.3.1f beschrieben, zu einem Wiederanstieg der zinkspezifischen Fluoreszenzintensität, wodurch von der Beteiligung der Thiolgruppen bei dieser Reaktion ausgegangen werden kann. Da Zink als  $d^{10}$ -System vorzugsweise tetraedische oder octaedische Komplexe mit seinen Liganden bildet, binden zwei Zinquin-Moleküle ein Zinkion. Nach Spaltung des Zink/Zinquin-Komplexes durch Zugabe von L-Cystein wird  $\text{Zn}^{2+}$ , bedingt durch seine hohe Affinitätskonstante von  $K = 1.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  (Martell et al. 1974), aller Wahrscheinlichkeit nach zwei L-Cystein-Moleküle über Thiolgruppen binden. Wie in Abb. 3.3.1c und Abb. 3.3.1e gezeigt werden konnte, kommt es zu einem Wiederanstieg der zinkspezifischen Fluoreszenz nach Reaktion des Zink/Zinquin-Komplexes mit SNOC, wobei nach Zugabe von L-Cystein dieser Anstieg nicht beobachtet werden konnte (Abb. 3.3.1f). Das Phänomen des Wiederanstiegs der Fluoreszenzintensität in Versuchen, in denen NO beteiligt ist, beruht auf der Fähigkeit von Stickstoffmonoxid Zink-Schwefel-Bindungen zu zerstören (Kröncke et al. 1994) und erklärt damit ebenfalls die gleichbleibende Fluoreszenz nach Zugabe von L-Cystein (Abb. 3.3.1f). Um festzustellen ob Stickstoffmonoxid die Zink-Bindung an Zinquin beeinflusst, wurde der Versuch mit dem SH-Gruppen-freien NO-Donor Diethylamine-NONOat wiederholt. NO oxidiert Sulfhydrylgruppen und damit die Abgabe von locker gebundenem Zink aus Metallothionein und anderen zellulären Proteinen (Kröncke et al. 1994, Berendji et al. 1997). Der anfänglich beobachtete Anstieg der Fluoreszenzintensität ist somit durch den höheren Anteil an freiem Zink zu erklären, der dann von Zinquin gebunden wird (Abb. 3.3.1g). Da NO instabil ist, werden die gebildeten Disulfide durch das reduzierende Potential des Cytosols wieder gespalten, und es kommt in zinkbindenden Proteinen wieder zu einer Bildung von Sulfhydrylgruppen. Bedingt durch ihre

höhere Affinität, reassoziieren diese SH-Gruppen mit Zinkionen. Als Konsequenz werden den Zink/Zinquin-Komplexen die  $Zn^{2+}$ -Ionen entzogen und die Fluoreszenzintensität fällt, wie in Abb. 3.3.1g zu erkennen ist, ab. Die Summe der durch Fluoreszenzspektroskopie erlangten Ergebnisse umfasst zwei voneinander unabhängige Effekte auf die Zinquin-Fluoreszenz. Zum einen ist dies der schnelle Fluoreszenzabfall, der durch die Zugabe von SNOC, SNOG und L-Cystein hervorgerufen wird und auf der Zerstörung des Zink/Zinquin-Komplexes durch Sulfhydrylgruppen beruht. Zum anderen ist es der Anstieg der Fluoreszenzintensität, der durch Zugabe des SH-Gruppen-freien NO-Donors Diethylamine-NONOat hervorgerufen wird.

Um die Modifikationen von Zinkkomplexen während der Reaktion von L-Cystein mit dem Zink/Zinquin-Komplex zu untersuchen, wurde die Methode der Elektrospray-Massenspektrometrie eingesetzt. Ziel war es, die Interaktionen von L-Cystein mit dem Zink/Zinquin-Komplex unter verschiedenen Bedingungen und unabhängig vom Puffer zu untersuchen. Aufgrund des charakteristischen Isotopenmusters von Zink wird die Detektion neuer Zinkkomplexe in den zu beobachtenden Massen-Peaks des Spektrums sehr vereinfacht. Wie erwähnt, bildet Zink als  $d^{10}$ -System vorzugsweise im Spektrum leicht detektierbare, tetraedische oder octaedische Komplexe mit seinen Liganden. Auch intermediäre Komplexe sind möglich, die aber im Spektrum nur sehr schwer auszumachen sind. Geht man den deduktiven Weg und betrachtet zuerst den Zink/Zinquin-Komplex ohne L-Cystein, so müsste man, basierend auf den  $d^{10}$ -charakteristischen Komplexierungseigenschaften von  $Zn^{2+}$ , von Komplexen mit einem Zinkion und/oder zwei daran gebundenen Zinquin-Molekülen mit  $m/z$  451.4 bzw.  $m/z$  837.4 ausgehen. Nach Zugabe von L-Cystein können zum einen Komplexe mit einem Zinkion und zwei oder vier daran gebundenen L-Cystein-Molekülen mit  $m/z$  307.4 bzw.  $m/z$  569.4 entstehen. Zum anderen besteht die Möglichkeit für Komplexe aus einem Zinkion mit jeweils zwei daran gebundenen Molekülen L-Cystein und  $H_2O$  mit  $m/z$  343.4. Ebenfalls möglich sind Komplexe aus Zink, Zinquin und  $H_2O$  mit  $m/z$  469.4. Die positiven sowie negativen Massenspektren von L-Cystein, Zinquin A und der Kombination aus Zink und Zinquin A (Abb. 3.3.1h) zeigten die zugehörigen Massenpeaks (siehe 3.3). Zeitabhängige Messungen des in Abb. 3.3.1h dargestellten Versuches zeigen darüber hinaus die Bildung des Zink/Zinquin-Komplexes anhand der Intensitätszunahme des korrespondierenden Peaks, bei gleichzeitigem Intensitätsabfall des zu Zinquin A gehörigen Maximums.

Die Spektren einer Kombination aus Zinquin A,  $Zn^{2+}$  und L-Cystein zeigten eine hohe Konzentration an freiem Zinquin A bei  $m/z$  387.1 ( $[M+H]^+$ ) und keinen zum Zink/Zinquin-Komplex gehörigen Peak. Das Auftreten vieler nicht identifizierbarer Signale, mit und ohne Zink-Isotopenmuster, führt wahrscheinlich zu dem Umstand, dass die Menge an Zink/L-Cystein-Komplexen so gering ist, dass sie aufgrund ihrer niedrigen Intensität nicht getrennt von anderen Peaks ausgemacht werden können (Abb. 3.3.1i). Viele der neu auftretenden Komplexe können Verunreinigungen zugeschrieben werden, die sich von den Reaktionsgefäßen aus Kunststoff ablösen und mit den in der zu untersuchenden Probe enthaltenen Molekülen komplexieren. Diese Verunreinigungen lassen sich nicht verhindern und werden durch die hohe Sensibilität

der Messinstrumente erst zu einem Problem.

Die unter 3.3.1 dargestellten Ergebnisse in C6-Zellen und im zellfreien System zeigen, dass L-Cystein, als Reinsubstanz oder aus SNOC bzw. SNOG freigesetzt, in der Lage ist, Zink aus Zink/Zinquin-Komplexen herauszulösen. Diese Ergebnisse sind deshalb so überraschend, da die Stabilitätskonstante des  $\text{Zn}(\text{Zinquin})_2$ -Komplexes mit  $\log \beta_2 = 13.5$  weitaus höher liegt, als die Affinitätskonstante des  $\text{Zn}(\text{cys})_2$ -Komplexes mit  $\log \beta_2 = 9.16$  bei pH 7. Diese Konstanten wurden aus der Stabilitätskonstanten  $\log K_2 = 18.2$  (Martell et al. 1974) und der Protonen-Dissoziationskonstanten von L-Cystein errechnet. Diese Beobachtungen legen nahe, dass L-Cystein in Lösung nicht nur den durch Kristallographie aufgeklärten Komplex bildet (Bell und Sheldrick 1984), sondern auch in der Lage ist, weitaus festere und komplexere Arten wie den  $\text{Zn}(\text{cys})_4$ -Komplex zu bilden, der in einigen Zink-Proteinen angetroffen wird. Für weitere fluorimetrische Untersuchungen mit Zinquin und L-Cystein-enthaltenden NO-Donoren in dieser Arbeit - und im allgemeinen - ist es wichtig, den hier beobachteten Auswirkungen Rechnung zu tragen (Jansen et al. 2004a).

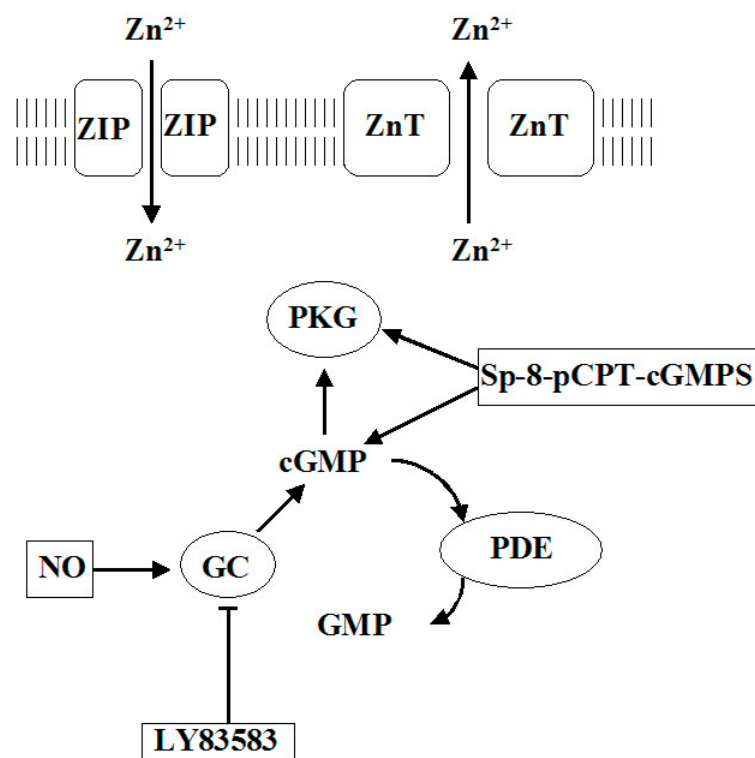
Aus diesen Ergebnissen wird gefolgert, dass eine Aktivierung der Guanylat-Cyclase mit Hilfe von Stickstoffmonoxid aus den NO-Donoren SNOC, SNOG sowie Diethylamine NONOate und ein damit einhergehender theoretischer Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration in den hier verwendeten C6-Zellen keinen Einfluss auf den zellulären Gesamtzinkgehalt hat. Ebenso lässt sich feststellen, dass NO in der Lage ist, durch oxidative Freisetzung von  $\text{Zn}^{2+}$  aus intrazellulären, zinkbindenden Proteinen eine Fluktuation im freien, intrazellulären Zinkionen auszulösen. Letztere Ergebnis steht im Einklang mit Beobachtungen einer Vielzahl anderer Autoren (Berendji et al. 1997, Haase und Beyersmann 1999, Spahl et al. 2003, Bossy-Wetzel et al. 2004).

Weitere Untersuchungen wurden zum Einfluss der Inhibition der GC auf den zellulären Zinkgehalt durchgeführt. Als Antagonist zum aktivatorisch wirkenden Stickstoffmonoxid wurde LY83583 gewählt, das zu einem intrazellulären Abfall des cGMP-Spiegels führen soll, wodurch cGMP nicht mehr in der Lage wäre, seine möglicherweise hemmende Wirkung auf Zinkimportprozesse auszuüben. Wie in Abb. 3.3.2 sowie Tab. 3b deutlich gezeigt werden kann, hat eine Inhibition der GC mittels LY83583 im verwendeten Modellsystem weder einen Einfluss auf den Gesamtzinkgehalt noch auf den Gehalt an freiem Zink. Ein weiterer Inhibitor der Guanylat-Cyclase ist das Methylenblau, welches in den vorliegenden Versuchen nicht verwendet wurde, da es die GC nur unspezifisch hemmt und in weitere zelluläre Regelkreise eingreift (Ohkuma und Katsura 2001).

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die Menge an cGMP, die durch die Aktivierung der GC durch NO erreicht wird, zu gering ist, um die Zinkaufnahme zu beeinflussen, wurde das PDE-resistente cGMP-Analogon Sp-8-pCPT-cGMPS eingesetzt. Sp-8-pCPT-cGMPS ist gleichzeitig ein spezifischer Aktivator der PKG I und besitzt sehr gute Membranpermeabilität (Schwede et al. 2000). Dosis-Wirkung-Experimente mit verschiedenen Konzentrationen und

Inkubationszeiten zeigten keinen Einfluss auf den zellulären Gesamtzinkgehalt der verwendeten C6-Zellen (Tab. 3b und Abb. 3.3.3a).

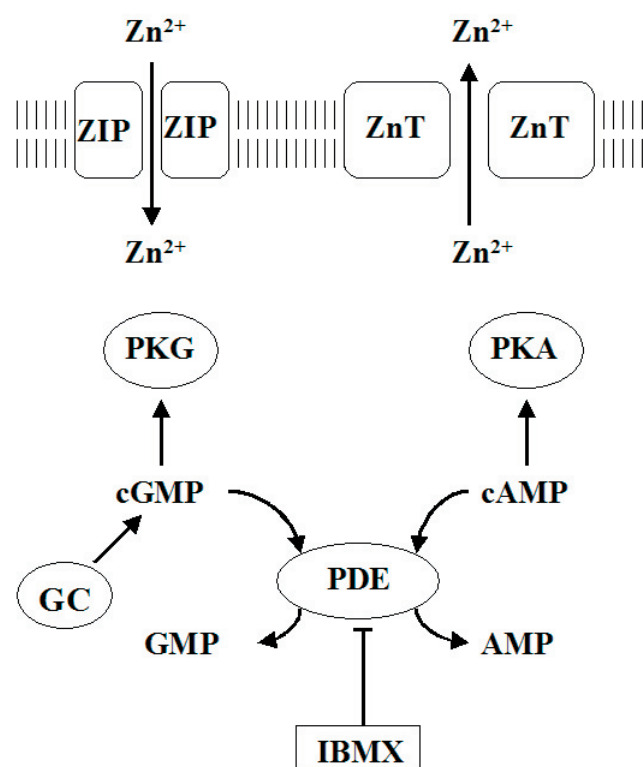
Als Fazit der Ergebnisse aus 3.3 lässt sich feststellen, dass weder eine Aktivierung noch eine Inhibition der Guanylat-Cyclase mit Hilfe von NO bzw. LY83583 einen Einfluss auf den zellulären Gesamtzinkgehalt und auf den Anteil an freiem intrazellulärem Zink, der hier verwendeten C6-Zellen, hat. Auch ein ausgeprägter Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration mit gleichzeitiger Aktivierung der PKG mittels des PDE-resistenten cGMP-Analogons Sp-8-pCPT-cGMPS, hat weder Auswirkungen auf den Gesamtzinkgehalt der Zellen noch auf den Anteil an labilem Zink.



**Abb. 4.3.1: Der cGMP/PKG-Signalweg.** Dargestellt ist der untersuchte Teil des cGMP/PKG-Signalwegs sowie die verwendeten Modulatoren.

Verfolgt man die Signalkaskade der cyclischen Nucleotide weiter „downstream“, so sind die Cyclonucleotid-Phosphodiesterasen die Enzyme, die u.a. für den Abbau von cGMP und cAMP zu GMP bzw. AMP mittels Hydrolyse verantwortlich sind (Abb. 4.3.2). Für die PDE, ein  $Ca^{2+}$ /Calmodulinabhängiges Enzym, ist bekannt, dass sie durch hohe intrazelluläre Zinkkonzentrationen gehemmt wird (Wätjen et al. 2000). In der gleichen Arbeit wird gezeigt, dass eine Hemmung dieses Enzyms einen Anstieg des intrazellulären cGMP-Spiegels, durch Ausbleiben der Hydrolyse zu GMP, mit sich bringt. Hierdurch wird eine Hemmung der Zinkimportproteine ausgelöst und es ergibt sich ein niedrigerer, intrazellulärer Zinkgehalt.

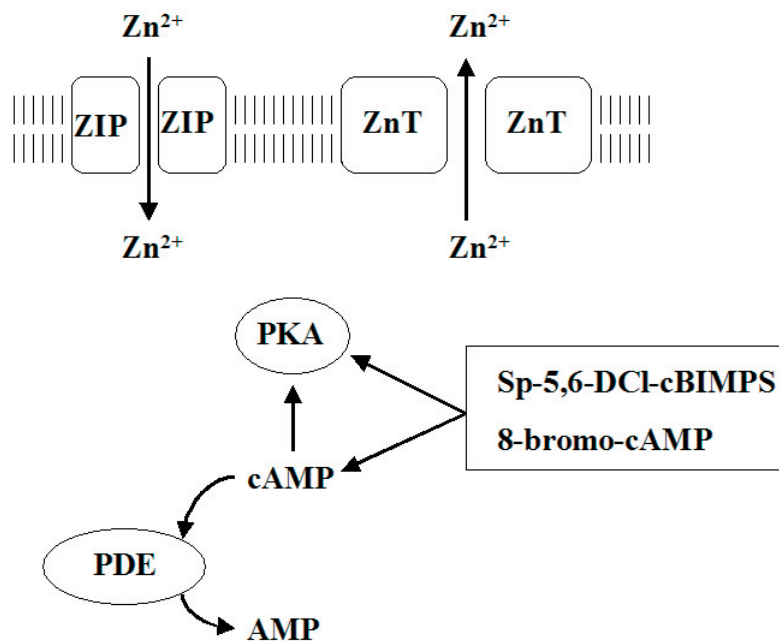
Dieser Umstand würde bedeuten, dass eine zusätzliche Hemmung der PDE, parallel zur Inkubation mit hohen extrazellulären Zn-Konzentrationen, keinen Einfluss mehr auf die Zinkaufnahme und damit auf den intrazellulären Gehalt an Zink haben dürfte. Obwohl bereits gezeigt werden konnte, dass die Höhe des intrazellulären Gehalts an cGMP keinen Einfluss auf den zellulären Zinkgehalt hat, wurden die Aktivitäten der PDEs mit IBMX gehemmt. Die unter 3.5 beschriebene Inhibition der PDE zeigte im verwendeten Modellsystem einen deutlichen Einfluss auf den zellulären Zinkgehalt von C6-Zellen (Abb. 3.5a-b und Tab. 3b). Im Hinblick auf die erhaltenen Ergebnisse und den hier eingesetzten unspezifischen PDE-Inhibitor IBMX, kann nur angenommen werden, dass die Aufrechterhaltung eines allgemein erhöhten Cyclonukleotidlevels eine Aktivierung von Zinkexport-Mechanismen nach sich zieht.



**Abb. 4.3.2: Der PDE-Signalweg.** Dargestellt ist der untersuchte Teil des PDE-Signalwegs sowie der verwendete Modulator.

Da durch IBMX alle vorhandenen PDEs inhibiert werden und eine Beteiligung von cGMP aufgrund der durchgeführten Versuche ausgeschlossen wird, besteht immer noch die Möglichkeit einer Beteiligung anderer cyclo-Nukleotide am Zinktransport. Da cAMP als „second messenger“ bekannt ist, scheint eine Beteiligung dieses Moleküls am wahrscheinlichsten (Abb. 4.3.3). Bedingt durch diesen Umstand und aufgrund des engen Crosstalks zwischen cGMP und cAMP (Schwede et al. 2000) sollte der Einfluss von cAMP-Analoga auf den zellulären Zinkgehalt untersucht werden. Im Falle von cAMP wurde von einer Aktivierung und Inhibition der AC abgesehen und der direkte Weg über das Signalmolekül gewählt. Um den Einfluss eines erhöhten zellulären cAMP-Gehaltes auf den Gesamtzinkgehalt zu untersuchen, wurde

das PDE-resistente cAMP-Analogon Sp-5,6-DCI-cBIMPS eingesetzt. Sp-5,6-DCI-cBIMPS ist gleichzeitig ein spezifischer Aktivator der PKA und besitzt sehr gute Membranpermeabilität (Schwede et al. 2000). Es lässt sich feststellen, dass ein ausgeprägter Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration mit gleichzeitiger Aktivierung der PKA I mittels des PDE-resistenten cAMP-Analogons Sp-5,6-DCI-cBIMPS, weder Auswirkungen auf den Gesamtzinkgehalt der Zellen noch auf den Anteil an labilem Zink hat (Tab. 3b und Abb. 3.4.1a).



**Abb. 4.3.3: Der cAMP/PKA-Signalweg.** Dargestellt ist der untersuchte Teil des cAMP/PKA-Signalwegs sowie die verwendeten Modulatoren.

Unter PKA-Aktivatoren besteht jedoch eine Isoenzympezifität, die bei der Betrachtung der Rolle dieser Enzyme auf den zellulären Zinkgehalt berücksichtigt werden muss. Da Sp-5,6-DCI-cBIMPS nur PKA I aktiviert (Schwede et al. 2000), soll zusätzlich der Einfluss des cAMP-Analogons 8-Bromo-cAMP untersucht werden. 8-Bromo-cAMP ist ebenfalls gut membranpermeable und vermag spezifisch die PKA I und II zu aktivieren. In diesem Falle zeigte sich, dass eine durch 8-Bromo-cAMP hervorgerufene Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels mit gleichzeitiger Aktivierung der PKA I und II den Gesamtzinkgehalt der verwendeten C6-Zellen senkt. Unter Betrachtung der Ergebnisse aus 3.4.1 und 3.4.2 kann nur angenommen werden, dass für den beobachteten Abfall im Gesamtzinkgehalt die Aktivierung der PKA II nötig ist. Ob für solch einen Abfall gleichzeitig eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels vorliegen muss, bleibt Spekulation. Die alleinige Erhöhung des cAMP-Gehaltes hat in C6-Zellen nach den vorliegenden Resultaten keinen Einfluss auf den Gesamtzinkgehalt. Es konnte jedoch von Schmidt et al. (2001) ein Signalweg identifiziert werden, der unabhängig von der PKA ist, durch cAMP reguliert wird und zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC)

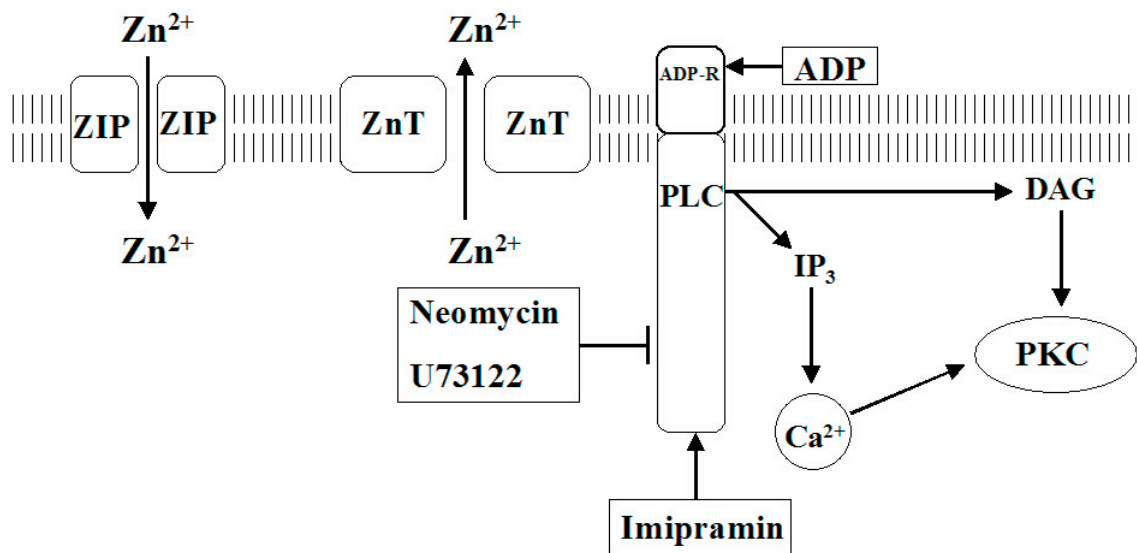


führt. Die PLC ist ein der Plasmamembran assoziiertes Enzym, das eine tragende Rolle in vielen verschiedenen Signaltransduktionsprozessen hat und als ein Hauptpunkt in der Modulation zellulärer Antworten auf Signale angesehen werden kann (Abb. 4.3.4). Die von der PLC katalysierte Reaktion ist die Spaltung des Membranlipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) in die beiden „second messenger“ Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und 1,2-Diacylglycerol (DAG). Es gibt vier Isoenzyme der PLC-Familie:  $\text{PLC}\beta$ ,  $\text{PLC}\gamma$ ,  $\text{PLC}\delta$  und  $\text{PLC}\epsilon$ . Der Unterschied dieser Isoformen liegt hauptsächlich in der Art ihrer Aktivierung.  $\text{PLC}\beta$  wird über einen G-Protein-gekoppelten Signalweg aktiviert, während  $\text{PLC}\gamma$  direkt durch Rezeptortyrosinkinasen phosphoryliert und somit aktiviert wird. Der Aktivierungsmechanismus von  $\text{PLC}\delta$  ist noch nicht vollständig aufgeklärt und die  $\text{PLC}\epsilon$  wird über die  $\alpha$ -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins aktiviert (Lopez 2001, Krauss 2003). In dieser Arbeit sollte nicht zwischen den einzelnen Subtypen unterschieden werden, sondern es war nur die Tatsache von Bedeutung, dass die Aktivität der PLC auf zwei unterschiedliche Arten reguliert wird: zum einen über den erwähnten G-Protein-gekoppelten Weg und zum anderen über eine direkte Phosphorylierung durch Rezeptortyrosinkinasen.

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, wurde kürzlich berichtet, dass extrazelluläres Zink in einigen Zelltypen einen „Zinc-sensing receptor“ aktiviert, der zu einer intrazellulären Ausschüttung von Calciumionen führt (Hershinkel et al. 2001). Da dieser ZnR über einen G-Protein-abhängigen Signalweg die PLC aktiviert, wird von Maret (2001) die Möglichkeit diskutiert, dass durch extrazelluläres Zink Rezeptortyrosinkinasen stimuliert werden, die dann über Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste in der katalytischen Domäne die PLC aktivieren. Ob die PLC dabei einen Einfluss auf den zellulären Zinkgehalt ausübt, wurde mit Hilfe der Modulation der PLC-Aktivität untersucht. Es konnte unter 3.6 gezeigt werden, dass eine Inhibition der PLC durch Neomycin (Abb. 3.6a) sowie durch U73122 (Abb. 3.6b) einen Anstieg des zellulären Gesamtzinkgehalts auslöst. Die Aktivierung der PLC mittels Imipramine (Abb. 3.6c) und ADP (Abb. 3.6d) hingegen resultiert in einem Abfall des zellulären Gesamtzinkgehaltes.

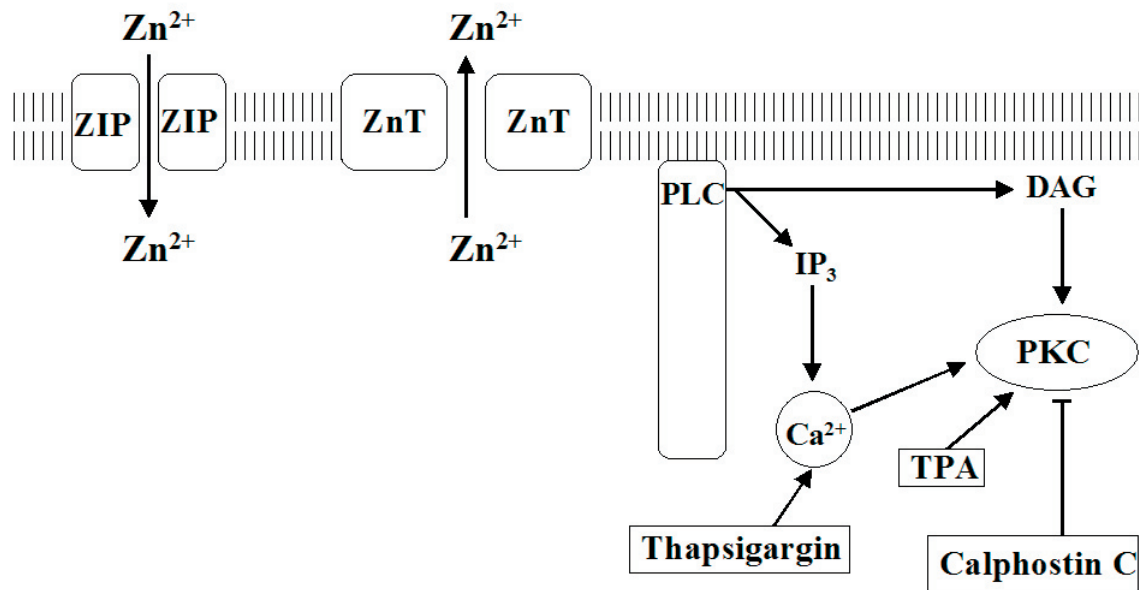
Da eine Aktivierung der PLC das entgegengesetzte Resultat einer Inhibition erzielte, kann von einem Einfluss der PLC-Aktivität auf den zellulären Zinktransport ausgegangen werden (Jansen et al. 2004c). Um zu untersuchen, ob C6-Zellen nach Inkubation mit U73122 noch mit PLC-spezifischer intrazellulärer Ausschüttung von Calciumionen reagieren, sollte auf den spezifischen PLC-Aktivator *m*-3M3FBS zurückgegriffen werden. Dieses erst vor kurzem durch ein Screening-Verfahren von über 10.000 Verbindungen identifizierte Benzosulfonsäure-Derivat, ist in der Lage, die Aktivität aller bisher bekannten Isoformen der PLC zu stimulieren (Bae et al. 2003). Wie im Ergebnisteil (3.6) beschrieben ist, ist dieses Reagenz leider unter Versuchsbedingungen und UV-Licht nicht stabil (Jansen et al. 2004a) und konnte daher nicht weiter verwendet werden. Zum Abschluss der Untersuchungen mit *m*-3M3FBS muss erwähnt werden, dass die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse keineswegs den stimulierenden Effekt von *m*-3M3FBS auf die PLC widerlegen. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass

*m*-3M3FBS, bedingt durch dessen Zerfall und der emittierten Eigenfluoreszenz, keine fluorimetrische Detektion von Calcium und Zink mittels der Fluoreszenzsonden Fura-2 und Zinquin zulässt (Jansen et al. 2004a). Die zuvor erlangten Ergebnisse der PLC-Aktivierung: während eine Inhibition der PLC in einem Anstieg des zellulären Zinkgehaltes resultiert, wird bei PLC-Aktivierung ein Abfall des Gesamtzinkgehaltes beobachtet. Es wird postuliert, dass die PLC über noch zu klärende Mechanismen den Zink-Export aktiviert.



**Abb. 4.3.4: Der PLC-Signalweg.** Dargestellt ist der untersuchte Teil des PLC-Signalwegs sowie die verwendeten Modulatoren.

Die PLC katalysiert die Produktion der beiden „second messenger“ DAG und IP<sub>3</sub>, die beide als Aktivatoren der PKC gelten. Während DAG direkt aktivierend auf die PKC wirkt, entfaltet IP<sub>3</sub> seine stimulierende Wirkung indirekt über die Ausschüttung von intrazellulären Calciumionen. Zur Familie der PKC werden Ser/Thr-spezifische Proteinkinasen gerechnet, die durch Tumorpromotoren, wie die Phorbolster, aktiviert werden können (Abb. 4.3.5). Zu diesen Tumorpromotoren, die selbst aber nicht in der Lage sind eine Tumorbildung zu initiieren, gehört Tetradeacanoyl-Phorbol-Acetat (TPA), das mit hoher Affinität von der PKC gebunden wird. Durch diese Wirkung von TPA kann nach dessen Zugabe in zelluläre Modellsysteme überprüft werden, welche Signalübertragungswege unter Kontrolle und Beteiligung der PKC ablaufen. Die Modulation der Aktivität dieses Enzyms durch Mobilisierung von Ca<sup>2+</sup> mit Thapsigargin (3.7.1), direkte Aktivierung mit TPA (3.7.2) oder Inhibierung mit Calphostin C (3.7.3) zeigte keinen Einfluss auf den zellulären Zinkgehalt. Obwohl einige Autoren von einer Aktivierung der PKC durch Zink berichten (Csermely 1988, Forbes et al. 1990, Hubbard et al. 1991), wird in dem vorliegenden Modellsystem eine Beteiligung der PKC sowie von Ca<sup>2+</sup> am Zinktransport ausgeschlossen (Jansen et al. 2004c).



**Abb. 4.3.5: Der Ca<sup>2+</sup>/PKC-Signalweg.** Dargestellt ist der untersuchte Teil des Ca<sup>2+</sup>/PKC - Signalwegs sowie die verwendeten Modulatoren.

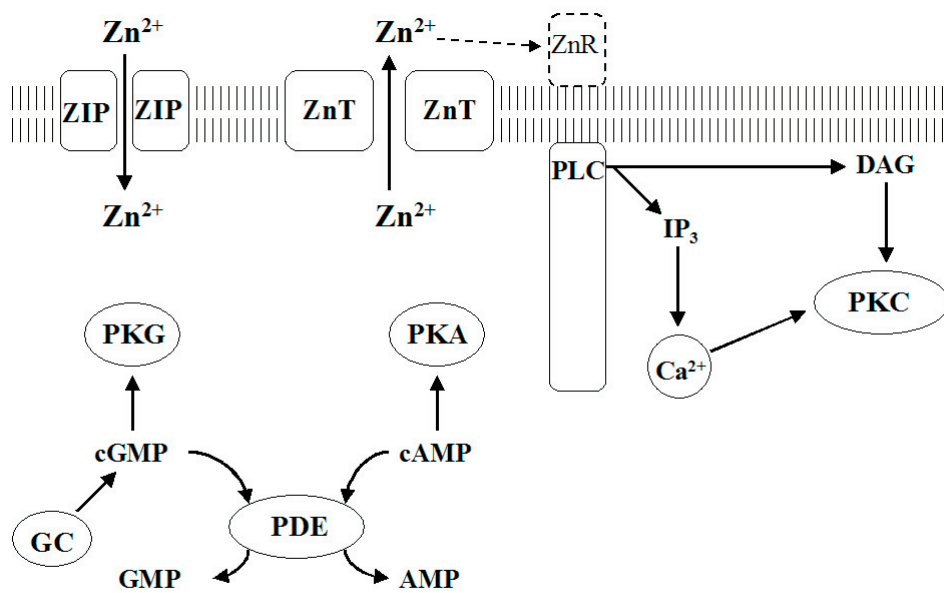
Eine weitere Verbindung zwischen extrazellulären Zinkkonzentrationen, der PLC-Aktivität und der intrazellulären Ausschüttung von Calcium aus IP<sub>3</sub>-sensitiven Speichern besteht durch den Zinc-sensing Receptor (Hershinkel et al. 2001). Wie unter 2.5.8.3 beschrieben, handelt es sich beim ZnR um einen G-Protein-gekoppelten Zelloberflächenrezeptor, der Veränderungen in der extrazellulären Zinkkonzentration wahrnimmt und über den PLC-Signalweg die Freisetzung von intrazellulärem Calciumionen aus IP<sub>3</sub>-sensitiven Speichern veranlasst. Der ZnR wurde von Hershinkel et al. (2001) in den vier humanen Zelllinien HT29-Cl, HEK293, HaCat und NHK auf indirekte, fluorimetrische Weise nachgewiesen. Da von diesen Autoren keine neuronale Zelllinie (weder Neuronen noch Gliazellen) hinsichtlich des Vorhandenseins des ZnR's untersucht wurde, sollte geklärt werden, ob sich in C6-Gliomazellen ein ZnR identifizieren lässt. Die unter 3.8 a beschriebene Untersuchung widerspricht einem Vorhandensein eines solchen ZnR's in den eingesetzten C6-Zellen (Abb. 3.8a), während dieser Rezeptor in einer Positivkontrolle mit A549 Lungenepithelkarzinomazellen identifiziert werden konnte (Abb. 3.8b). Das Antreffen eines solchen Rezeptors in C6-Zellen wäre aber auch verwunderlich, da unter 3.2 gezeigt werden konnte, dass der Zinkeinstrom in C6-Gliomazellen ein extrem schneller Prozess ist. In den durch Hershinkel et al. (2001) als ZnR-positiv charakterisierten Zelllinien erfolgt der Zinkeinstrom außerordentlich langsam. In den dort untersuchten humanen Zelllinien HT29-Cl, HEK293, HaCat und NHK könnte dem ZnR eine vermittelnde Rolle in der PLC/Ca<sup>2+</sup>-induzierten Aktivierung der PKC zukommen. In C6-Gliomazellen könnte Zink, bedingt durch seinen schnellen Einstrom, die Aktivierung selber übernehmen, so wie es schon in anderen Zelllinien gezeigt werden konnte (Csermely 1988, Forbes et al. 1990, Hubbard et al. 1991). Unter Umständen hat eine solche direkte PKC-Aktivierung durch Zn<sup>2+</sup> ebenfalls eine

höhere Geschwindigkeit als die des PLC/Ca<sup>2+</sup>-Signalwegs.

Um die Möglichkeit eines Einflusses der Proteinbiosynthese auf die zelluläre Zinkaufnahme zu untersuchen, wurde die Wirkung einer Translationsinhibition durch Cycloheximid und der Histonacetylierung durch TSA auf den Gesamtzinkgehalt in C6-Zellen untersucht. Inkubationen mit Cycloheximid, das als effektiver Proteinsyntheseblocker wirkt (Kwaik 1998; Myoshi et al. 2001), zeigten keinen Einfluss auf den intrazellulären Zinkgehalt in C6-Zellen (Abb. 3.9.1). Eine hemmende Wirkung von Cycloheximid auf den Gesamtzinkgehalt hätte den Schluss erlaubt, dass durch die Inhibition der Translation, die Synthese von Zinktransportern gehemmt wurde und aus diesem Grund weniger Zink in die Zellen aufgenommen wurde.

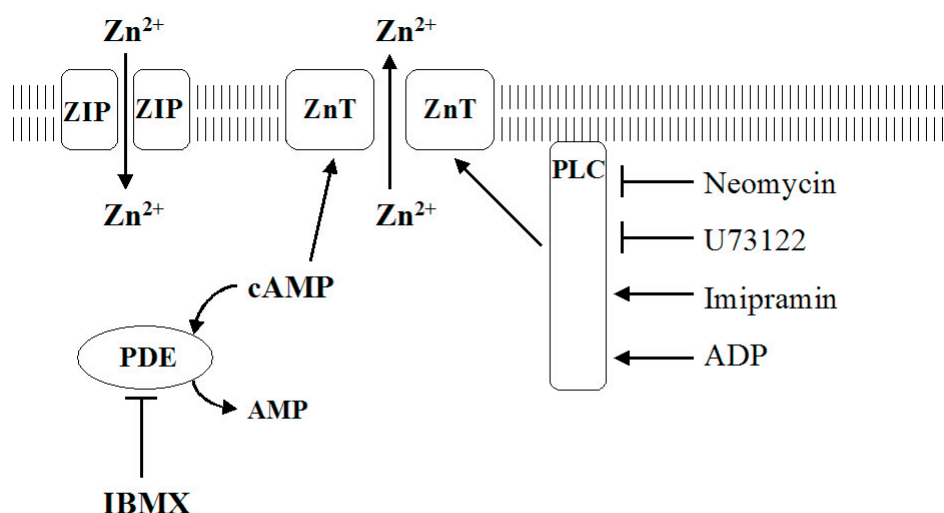
Trichostatin A hingegen ist ein Inhibitor von Histon-Deacetylasen und wird als indirekter Aktivator der Transkription eingesetzt (Furumai et al. 2001). Die Wirkung von TSA führt zu weniger Wechselwirkungen zwischen den Histonen und der DNA und damit zu einer aufgelockerten Nukleosomstruktur. Da die Histone acetyliert bleiben, können Transkriptionsfaktoren besser an die DNA binden und es kommt zu einer indirekt gesteigerten Transkriptionsrate. TSA zeigte in den durchgeführten Versuchen jedoch keinen Einfluss auf den Gesamtzinkgehalt (Abb. 3.9.2), sodass auch eine Beteiligung der Transkriptionsebene an der Zinkaufnahme in C6-Zellen unwahrscheinlich ist.

Zusammenfassend stellt Abb. 4.3.1 alle in dieser Arbeit untersuchten Signaltransduktionswege dar. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die jeweils verwendeten Aktivatoren sowie Inhibitoren nicht mit in die Grafik eingebracht.



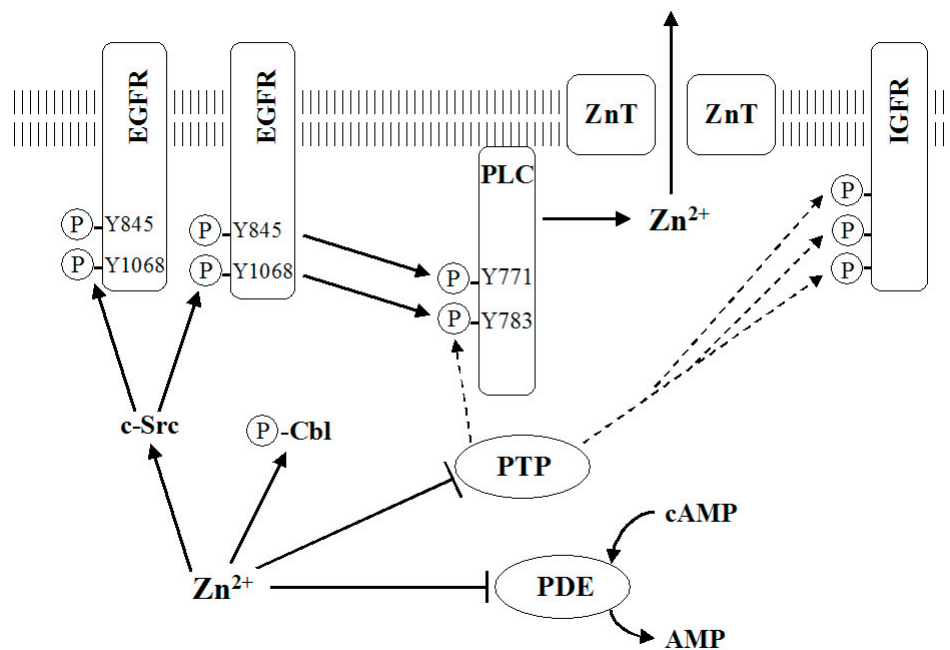
**Abb. 4.3.6: Überblick der untersuchten Signaltransduktionswege.** Einige der dargestellten Signalwege wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht vollständig, bzw. stark vereinfacht abgebildet.

Zusammenfassend wird geschlossen, dass in C6-Gliomazellen hohe mikromolare extrazelluläre Zinkkonzentrationen einen Anstieg im zellulären Gesamtzinkgehalt hervorrufen. Diese Erhöhung zieht aller Wahrscheinlichkeit nach eine Aktivierung des Zinkexports mit sich, der auf einer cAMP-regulierten Aktivitätssteigerung der PLC beruht. Abb. 4.3.7 fasst die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Signaltransduktionswege, die einen Einfluss auf den zellulären Zinkgehalt zeigten, zusammen.



**Abb. 4.3.7: Überblick der untersuchten Signaltransduktionswege mit Einfluss auf den zellulären Zinkgehalt in C6-Zellen.** Die jeweilig verwendeten Aktivatoren sowie Inhibitoren wurden ebenfalls aufgeführt. Einige der dargestellten Signalwege wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht vollständig, bzw. stark vereinfacht abgebildet.

Dieser Mechanismus ist nicht der einzige, der den (erhöhten) intrazellulären Zinkspiegel mit dem Zinkexport verbindet. Samet et al. (2003) konnten zeigen, dass Zink die Phosphorylierung und damit die Aktivierung des EGFR induziert. Zusätzlich konnten Haase und Maret (2003) während Untersuchungen des Zinkeinflusses auf den Insulin/IGF-Signalweg zeigen, dass Zinkionen in physiologischen Konzentrationen die Protein-Tyrosin-Phosphatasen inhibiert. Durch diesen Umstand kommt es zum Erliegen der Tyrosinphosphorylierung und einer dadurch gesteigerten Tyrosinphosphorylierung von Proteinen. Die Verbindung zur PLC-Aktivität liefern Ergebnisse von Kamat und Carpenter (1997) die zeigen, dass die PLC durch Wachstumsfaktor-bedingte Tyrosinphosphorylierung aktiviert wird. Die Gesamtbetrachtung der hier diskutierten Ergebnisse weist auf eine weitere Verbindung zwischen intrazellulären Zinkkonzentrationen, Protein-Tyrosinphosphorylierung und der PLC hin. In Anbetracht der in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse wird hier ein Model für Säugerzellen hypothetisiert, in dem der Zinkexport durch einen erhöhten intrazellulären Zinkspiegel über die Phospholipase C stimuliert wird (Jansen et al. 2004c). Abb. 4.3.8 zeigt den möglichen Zusammenhang von den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen, mit den Resultaten der oben diskutierten Forschergruppen.



**Abb. 4.3.8: Möglicher Zusammenhang von Signaltransduktionswegen mit intrazellulären Zinkkonzentrationen und Protein-Tyrosinphosphorylierungen.** Zusammenstellung der in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse und Arbeiten anderer Autoren. Einige der dargestellten Signalwege wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht vollständig, bzw. stark vereinfacht abgebildet. (Cbl = Substrat der EGFR-Kinase; IGFR = Rezeptor des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors; EGFR = Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors; c-Src = Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinase)

#### 4.4 Ausblick

Der Einfluss des essentiellen Spurenelements Zink auf die zelluläre Signaltransduktion ist ein Forschungsgebiet, in dem trotz entscheidender Fortschritte in der Grundlagenforschung und Analytik in den letzten Jahren viele zentrale Fragen nicht untersucht wurden. Obwohl die Aktivierung einzelner Signalwege nach Inkubation mit Zink Gegenstand zahlreicher Arbeiten war, fehlt bis heute sowohl eine Übersicht über die beteiligten Signalkaskaden, als auch eine Hypothese über den Ursprung dieser Signale. Außerdem wurde diesen Ergebnissen in der Vergangenheit zumeist eine rein toxikologische Bedeutung beigemessen. Neuere Studien zeigen jedoch, dass das intrazelluläre freie Zink mit großer Wahrscheinlichkeit ein notwendiger Bestandteil der Signaltransduktion ist, dem u.U. sogar die Funktion eines „second-messenger“-

Moleküls zukommt (Haase und Maret 2003). Im Folgenden wird ein möglicher Arbeitsplan für die weitere Erforschung des Zusammenhangs von Zink-modulierten Signalwegen mit dem physiologischen Alterungsprozesses diskutiert.

Definitive Aussagen über das Vorhandensein eines „Zinc-sensing receptors“ in Zellen, können erst nach Charakterisierung und Sequenzierung dieses Rezeptors erfolgen. Hershinkel et al. (2001) geben Anhaltspunkte, die für eine Charakterisierung hilfreich sind, wie z.B. die Ähnlichkeit zum „Calcium-sensing receptor“. Die Identifikation der Proteinsequenz des ZnRs steht bis zum heutigen Zeitpunkt aber aus. Da drei Jahre seit der ersten Dokumentation dieses Rezeptors vergangen sind, scheint eine Sequenzierung des ZnRs mit Problemen behaftet zu sein. Zukünftige eigene Arbeiten sollen sich, unter Ausnutzung dreier unterschiedlicher Herangehensweisen, mit der Charakterisierung des ZnRs in Hirnzellen befassen. Zum einen soll auf bioinformatischem Wege über unabdingliche Motive, die der ZnR enthalten kann (wie Zink- und PLC-Bindungsstellen sowie G-Protein-Bindungs-Motiv), die jeweilig zugehörige Sequenz dieser Motive ermittelt werden. Dann kann eine Suche dieser Sequenzen im Genom des Versuchorganismus', vorzugsweise im Rattengenom erfolgen. Mit zusätzlicher Hilfe des GeneFinder-Programms kann dann die mögliche Sequenz des ZnRs ermittelt werden. Abschließend soll über die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die Amplifikation der Sequenz durchgeführt werden, gefolgt vom Einklonieren dieser in einen eukaryotischen Expressionsvektor mit abschließender Transfektion in die zu untersuchende Zelllinie. Eine Untersuchung mit der unter 5.2.3.3 beschriebenen Technik der doppelten Fluoreszenzfärbung mit Zinquin und Fura-2 kann dann das positive Ergebnis zeigen. Die zweite mögliche Herangehensweise für die Charakterisierung des ZnRs wäre, den ZnR durch TSA oder 5'-Aza-2'-deoxycytidin (beides sind Histondeacetylase-Inhibitoren) in der untersuchten, ZnR-reprimierenden Zelllinie zu induzieren. Ergibt sich aus der Fluoreszenzspektrometrie ein positives Ergebnis, bringt der Vergleich der ZnR-positiven- mit der ZnR-negativen Zelllinie, durch eine 2-D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2-D-PAGE), die Unterschiede im Proteinexpressionsmuster hervor. Unterschiedlich auftretende Proteinbanden können nun sequenziert werden. Abschließend erfolgt, wie oben beschrieben, eine PCR und die abschließende Transfektion. Der dritte und aufwendigste Weg, der zur Charakterisierung des ZnRs führen soll, ist die Erstellung einer subtraktiven RNA/DNA-Bibliothek. Diese, aufgrund ihrer Komplexität hier nur kurz angesprochene Technik, beruht auf dem Vergleich des Transkriptoms von ZnR-positiven mit ZnR-negativen Zellen. Diese Methode ist bei richtiger Durchführung zwar sehr genau, aber auch sehr zeitintensiv und wird zusätzlich durch den Umstand erschwert, dass zwar Zellen des gleichen Organismus (Ratte) aber unterschiedlichen Gewebes (somatisches und neuronales) miteinander verglichen werden müssen. Die beiden europäischen Projekte ZINCAGE ([www.zincage.com](http://www.zincage.com)) und ZENITH ([www.inra.fr/zenith-zinc](http://www.inra.fr/zenith-zinc)), befassen sich mit dem Einfluss von Zink auf die Alterung. Während sich ZINCAGE auf molekularbiologischer Ebene hauptsächlich mit den Auswirkungen von Zinkionen auf den alterungsbedingten Aktivitätsverlust des humanen Immunsystems befasst, liegt bei ZENITH das



Hauptinteresse auf den Auswirkungen unterschiedlicher Zinkmengen, die durch die Nahrung aufgenommen werden. Es stellt sich also vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit diskutierten Vorarbeiten die Frage nach dem Einfluss des essentiellen Spurenelements Zink auf die zelluläre Signaltransduktion des physiologischen Alterungsprozesses, bzw. dessen direkte Beteiligung daran. Während des physiologischen Alterungsprozesses kommt es im Gehirn, im Vergleich zu somatischen Geweben, nicht nur zu einer Anhäufung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) („Free radical theory of aging“), sondern ebenfalls zu einer erhöhten Anfälligkeit für oxidativen Stress aufgrund (a) des hohen Gehalts an (per-) oxidierbaren ungesättigten Fettsäuren, (b) des auf die Masse bezogenen hohen Sauerstoffverbrauchs, (c) des hohen Gehalts an (per-) oxidationsfördernden Co-Faktoren und (d) dem Mangel an Schutzmechanismen für oxidativen Stress (Poon et al. 2004). Der letzte Punkt beruht hauptsächlich auf dem Umstand, dass der Gehalt an hirnspezifischem MT III stark erhöht ist und dadurch gänzlich alles freie zelluläre Zink proteingebunden vorliegt. Dadurch stehen nicht ausreichend Zinkionen zur Verfügung, weder für den Schutz von Thiolgruppen vor Oxidation (Powell 2000), noch für die Aktivierung der Superoxiddismutase (Vallee und Falchuk 1993, Lukaski 2000). Bei jungen Menschen ist MT III in der Lage, Zink während kurzzeitigen Stress' zu sequestrieren und danach wieder abzugeben, um Zellen vor ROS zu schützen. Die Induktion von MT III geschieht durch Interleukin-6 als schnelle Antwort mit entzündungshemmenden Aufgaben. Daher nimmt der Gehalt an MT während der Seneszenz zu, denn alternde Zellen stehen durch entzündliche Prozesse, enzymatische Fehlfunktionen, defekte Mitochondrien und eingeschränktem Metabolismus, etc. unter andauerndem oxidativem Stress. Durch diesen Umstand wird das freiverfügbare zelluläre Zink durch MT gebunden und der protektive Effekt von MT entwickelt sich mit zunehmendem Alter in eine dysfunktionale Richtung (Mocchegiani et al. 2000, Giacconi et al. 2003, Poon et al. 2004). Aus diesem Grund werden zinkgebundene MT-Komplexe als biologische Marker für die physiologische Alterung benutzt (Mocchegiani et al. 2001). Ebenfalls werden durch diese von MT hervorgerufene geringe Bioverfügbarkeit von Zinkionen, grundlegende Hirnfunktionen eingeschränkt. Zu diesen gehört die Freisetzung von Somatostatin aus dem Hippocampus und dessen Regulation durch das zinkabhängige Somatomedin-C (Giacconi et al. 2003), die Neuromodulation von Glutamat- und N-methyl-D-aspartat- (NMDA) Rezeptoren (Assaf und Chung 1984), sowie die Erregbarkeit neuronaler Membranen (Zatta et al. 2003). Einhergehend mit der Aufklärung eukaryotischer Signaltransduktionswege in den letzten Jahren (Beyersmann und Haase 2001) ist es nicht verwunderlich, dass auf der Ebene neuronaler Prozesse ein, in dieser Arbeit bereits diskutierter, ausgeprägter Crosstalk zwischen den beiden divalenten Kationen Calcium und Zink besteht (Maret 2001). So induziert die Mobilisierung von Calcium die NO-Produktion, welche dann Zink aus MT freisetzen kann (Pearce et al. 2000). Die gänzlich andere Verknüpfung des Ca/Zn-Crosstalks fanden Hershinkel et al. (2001) mit der bereits oben erwähnten Identifikation des ZnR in diversen somatischen Zelllinien. Eine, durch mikromolare Konzentrationen von extrazellulären Zink hervorgerufene Calcium-Freisetzung aus Thapsigargin- und ATP-sensitiven, intrazellulären Speichern mittels des G-Protein-gekoppelten ZnR, stellt die

Verbindung von extrazellulärem zu intrazellulärem Zink her (Hershinkel et al. 2001).

Die oben diskutierte Sequenzierung des ZnRs kann eine Grundlage für Forschungen darstellen, die den Einfluss des ZnR auf den physiologischen Alterungsprozess untersuchen. Welchen Einfluss hat der ZnR auf die Alterung von somatischem Gewebe? Und, falls vorhanden, welchen Einfluss auf die Alterung von Hirnzellen? Da neuronale Zellen differenzierter altern als somatische, könnte das Nichtvorhandensein des ZnR in neuronalen Zellen eine Erklärung für die gewebetypischen Alterungsprozesse liefern. Die Voraussetzung für diese Arbeiten ist, wie erwähnt, die erfolgreiche Sequenzierung und Expression des Zinc-sensing Receptors in vorher ZnR-negativen Hirnzellen. Untersucht werden soll primär der Einfluss der ZnR-Expression in Hirnzellen auf die ROS-vermittelte Telomer-Schrumpfung, als Marker für den physiologischen Alterungsprozess. Durch Extraktion der genomischen DNA der zu untersuchenden Zelllinie und deren Verdau mit Restriktionsenzymen kann dann die Länge der Telomere und damit ein möglicher Einfluss auf den Alterungsprozess im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-Zellen bestimmt werden. Sekundäre Untersuchungen nach dem oben beschriebenen Muster könnten dann den Einfluss des ZnR in neurodegenerativen Erkrankungen klären.

In der Literatur wurde ebenfalls beschrieben, dass in Patienten mit Alzheimer Disease das MT III-Protein stark unterexprimiert wird (Uchida et al. 1991) wodurch es zu einer erhöhten Freisetzung von Zinkionen kommt, die wiederum zu Aggregation von Amyloid- $\beta$ -Proteinen führen kann (siehe 2.5.10). Welchen Einfluss hätte eine Überexpression von MT III auf den Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen und im besonderen auf Alzheimer Disease? Welche Rolle übernimmt die Verfügbarkeit von freiem, zellulärem Zink dabei? Wie wird diese reguliert? Untersucht werden könnte primär der Einfluss der MT III-Überexpression und MT III-Knockdown bzw. Knockout in Hirnzellen auf die ROS-vermittelte Telomer-Schrumpfung. Die Sequenz des MT III-Proteins ist hinreichend bekannt und eine entsprechende cDNA kann mit Hilfe eines eukaryotischen Expressionsvektors stabil in die zu untersuchende Zelllinie transfiziert und überexprimiert bzw. durch Knockdown stabil ausgeschaltet werden. Auf die transiente Überexpression und Knockdown sollte aufgrund der erschwerten Handhabung der zu untersuchenden Zelllinie erst zu einem späteren Zeitpunkt zurückgegriffen werden. Untersuchungen zum Einfluss von Zink zur ROS-bedingten Telomer-Schrumpfung können aber, wie oben beschrieben, durchgeführt werden. Auch hier könnten sekundäre Untersuchungen den Einfluss der Überexpression/des Knockouts von MT III in neurodegenerativen Erkrankungen klären.

Von mehreren Arbeitsgruppen konnte ergänzend gezeigt werden, dass eine Inaktivierung des Insulin- / Insulin-like Growth Factor-Signalwegs bei Mäusen in einer signifikant herabgesetzten ROS-Produktion, einer verbesserten Stress-Resistenz und einer um 33% verlängerten Lebenserwartung resultiert (Tatar et al. 2001, Lee et al. 2003, Holzberger et al. 2003). Zusätzlich konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Zink einen insulinmimetischen Effekt hat (Haase und Maret 2003). Welcher Einfluss auf die Alterung kann dann bei der Chelatierung von freiem Zink bzw. Überexpression von MT III ausgemacht werden? Auf der Basis vorangegangener

Experimente soll untersucht werden, ob die resultierenden Kombinationswirkungen von MT III- und/oder ZnR-Überexpression bzw. Knockout/Knockdown einen Einfluss auf die ROS-vermittelte Telomerschrumpfung in Hirnzellen hat. Die oben aufgeführten Techniken bilden hier die methodischen Grundlagen. Als weitere Perspektive könnten weitere Untersuchungen zum Einfluss der Kombinationswirkungen von MT III- und/oder ZnR-Überexpression bzw. Knockout/Knockdown der entsprechenden Gene in neurodegenerativen Erkrankungen durchgeführt werden.

Aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse und der oben diskutierten Perspektiven ist zu erwarten, dass das Gebiet der Erforschung der Rolle von Zink bei der Regulation physiologischer Prozesse auch in Zukunft wichtige Erkenntnisse in den unterschiedlichen naturwissenschaftlichen Fachgebieten liefern wird.

## 5. Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Chemikalien

**Tab. 5.1.1a: Verwendete Chemikalien.**

Substanz	Bezugsquelle		
	Firma	Ort	Land
<b>A</b>			
ADP	Sigma	Deisenhofen	Deutschland
Agarose	Seakem	Rockland	USA
<b>B</b>			
BCA (Reagenz A)	Sigma	Deisenhofen	Deutschland
Borsäure	Merck	Darmstadt	Deutschland
Bromphenolblau	Merck	Darmstadt	Deutschland
<b>C</b>			
CaCl <sub>2</sub>	Merck	Darmstadt	Deutschland
Chloroform	Merck	Darmstadt	Deutschland
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	Riedel de Haen	Seelze	Deutschland
<b>D</b>			
DMEM high/low Glucose	Serva	Heidelberg	Deutschland
DMSO	Fluka	Buchs	Deutschland
DNA-Leiter-Standard GeneRuler	Fermentas	St.Leon-Rot	Deutschland
Diethylamine-NONOat	CalBioChem	Bad Soden	Deutschland
<b>E</b>			
EDTA	Merck	Darmstadt	Deutschland
EGTA	Sigma	Deisenhofen	Deutschland
Ethidiumbromid, Stammlösung 10 mg/mL	Fluka	Buchs	Deutschland
<b>F</b>			
FKS	Sigma	Deisenhofen	Deutschland
Fura-2/AM	Molecular Probes	Leiden	Deutschland
<b>G</b>			
Glucose	Serva	Heidelberg	Deutschland
Glycerin	Merck	Darmstadt	Deutschland

<b>H</b>			
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Stammlösung 30%	Merck	Darmstadt	Deutschland
HCl	Merck	Darmstadt	Deutschland
HEPES	Serva	Heidelberg	Deutschland
HNO <sub>3</sub> 65% (suprapur)	Merck	Darmstadt	Deutschland
<b>I</b>			
Imipramin x HCl	CalBiochem	Bad Soden	Deutschland
Isopropanol	Merck	Darmstadt	Deutschland
<b>K</b>			
KCL	Merck	Darmstadt	Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Riedel de Haen	Seelze	Deutschland
<b>L</b>			
Lichrosorb RP 18	Merck	Darmstadt	Deutschland
<b>M</b>			
Methanol	Fluka	Buchs	Deutschland
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	Merck	Darmstadt	Deutschland
m-3M3FBS	CalBiochem	Bad Soden	Deutschland
<b>N</b>			
NaCl	Fluka	Buchs	Deutschland
NaHCO <sub>3</sub>	Merck	Darmstadt	Deutschland
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	Darmstadt	Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	Merck	Darmstadt	Deutschland
Nonidet P40	Sigma	Deisenhofen	Deutschland
<b>P</b>			
Penicillin/Streptomycin	Gibco	Eggenstein	Deutschland
Phenol gepuffert mit TE-Puffer	Roth	Karlsruhe	Deutschland
<b>R</b>			
Rnase A	Serva	Heidelberg	Deutschland
RSA	Sigma	Deisenhofen	Deutschland

<b>S</b>			
SDS	Serva	Heidelberg	Deutschland
<b>T</b>			
Tris-Base	Merck	Darmstadt	Deutschland
<b>U</b>			
U73122	CalBiochem	Bad Soden	Deutschland
<b>Z</b>			
Zinkchlorid, Standardlösung 1g/100mL	Merck	Darmstadt	Deutschland

**Tab. 5.1.1b: Puffer und Stammlösungen.**

<b>Methode</b>	<u>Inhaltsstoffe</u>
<b>Agarose-Gelelektrophorese</b>	
Lyse Puffer	0.5 mL 1 M Tris HCl, pH 8.0 1.5 mL 20 % SDS 1 mL 0.5 M EDTA ad 50 mL mit Aqua bidest.
TE Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA, pH 8.0
10xTBE-Puffer	54 g Tris-Base 27.5g Borsäure 20 mL 0.5 M EDTA, pH 8.0 ad 500 mL mit Aqua bidest.
5xLadepuffer	150 µL 0.5 M EDTA 500 µL 20 % SDS 2.5 mL Glycerin 62,5 µL 20 % Bromphenolblau ad 5 mL mit Aqua bidest.
PBS-Puffer	136 mM NaCl 2.6 mM KCl 8.1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

<b>Fluoreszenzmessungen</b>	
Inkubationspuffer	0.3 % RSA 5mM Glucose 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.3 mM CaCl <sub>2</sub> 25 mM HEPES 120 mM NaCl 5.4 mM KCl pH 7.35
Messpuffer	5mM Glucose 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.3 mM CaCl <sub>2</sub> 25 mM HEPES 120 mM NaCl 5.4 mM KCl pH 7.35
Fura-2/AM-Stammlösung	250 µg Fura-2/AM gelöst in 250 µL DMSO
Zinquin A-Stammlösung	30 mM (in DMSO)
Zinquin E-Stammlösung	30 mM (in DMSO)
<b>Proteinbestimmung</b>	
Reagenz A	1 % BCA (Dinatriumsalz) 2 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> x H <sub>2</sub> O 0.16 % Dinatriumtartrat 0.4 % NaOH 0.95 % NaHCO <sub>3</sub> pH 11.25 (eingestellt mit 50 %iger NaOH)
Reagenz B	4 % CuSO <sub>4</sub> in Aqua Bidest.
Arbeitsreagenz	100 Volumenteile Reagenz A 2 Volumenteile Reagenz B

## 5.1.2 Geräte

**Atomabsorptionsspektrometer :**

PE 2880 Atomic Absorption Spectrometer von Perkin Elmer

PE AS 40 Probenautomat von Perkin Elmer

AS 3 Autosampler

Hohlkathodenlampe für Zn von LOT GmbH, Darmstadt

**Brutschrank:**B 5060 EK-CO<sub>2</sub> von Heraeus**Elektrophorese**

PHARMACIA/BIOTECH GNA 100 Elektrophoresekammer

PHARMACIA LKB GPS200/400 Netzgerät

**Fluoreszenzmikroskop**

Zeiss Axioskop 50 B

VHW 50 1-2b Fluoreszenzlampe

MINOLTA X 700 Spiegelreflexkamera mit KODAK Ektachrome 400 Film

Verwendete Filtersätze:

**Tab. 5.1.2: Filtersätze für die Fluoreszenzmikroskopie**

Filtersatz	Excitation [nm]	Emission [nm]	Beamsplitter [nm]
2	365	< 420	460
9	450-490	<520	510
15	546	<590	580

**Fluoreszenzspektrometer:**

LS 50 B von Perkin Elmer,

gesteuert durch einen 4/86er Computer DEC PC LPv<sup>+</sup> 433 dx,mit *FL WinLab* Software von Perkin Elmer

Küvettemperierung durch Thermostat HAAKE FP/FKP

**Gel-Scangerät:**

Herolab Gel-Scanapparatur mit

Herolab RH – 2 Gehäuse

UVT – 28 M Durchlichttisch



EASY 429 K Kamera

Gesteuert durch einem Pentium I Computer mit *EasyWin 32* - Software

**HPLC-Analyse:**

Pumpe L-6000A HPLC Pump von Merck Hitachi

Handgepackte Säule (100 mm x 4 mm) mit Lichrosorb RP 18 10 µm von Merck

Detektor UV-detector LDC von Milton Roy mit 254 nm Filter

**Massenspektrometer:**

Esquire-LC von Bruker Daltonics mit Bruker Daltonics Data Analysis 2.0 Software

**Phasenkontrastmikroskop**

Zeiss TELAVAL 31

CONTEX RTX II Quartz Spiegelreflexkamera mit KODAK T-max (100 und 400 ASA) Film

**Photometer**

Computer mit CARY Software

**Scanner**

EPSON Perfection 1200 PHOTO

Gesteuert durch einen Pentium 4 Computer mit ADOBE Photoshop 7.0 Software

**Sterilbank:**

HB 2472 von Holten Laminair

**Thermomixer:**

Eppendorf 5463

**UV-Photometer:**

Eppendorf Bio-Photometer mit Eppendorf Küvetten *UVette 220-1600 nm*

**Zellkulturmaterial**

Alle verwendeten Zellkulturschalen wurden von NUNC () bezogen

**Zentrifugen:**

Hettich Mikroliter-Zentrifuge (max. 15000 rpm)

Heraeus Megafuge 1,0R (max. 24500 rpm)

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Zellkultur

#### C6-Zellen

Als das hauptsächliche Modellsystem wurde in dieser Arbeit die von Benda et al. (1968) etablierte Gliomazelllinie C6 verwendet. Für die Untersuchung von Signaltransduktionswegen sind Gliazellen aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeit und funktionellen Verknüpfung mit excitatorischen und inhibitorischen Neuronen im Zentralnervensystem aller Vertebraten besonders geeignet. Wie in der Einleitung dieser Arbeit bereits erwähnt, spielen Zinkionen, die aus synaptischen Vesikeln in den synaptischen Spalt entlassen wurden, nicht nur eine tragende Rolle bei der intrazellulären Signaltransduktion zwischen Neuronen, sondern führten auch aufgrund hoher, lokal auftretender Konzentrationen, zu einer evolutionären Anpassung an diese Bedingungen.

Die hier verwendeten Gliazellen stammen aus N-Nitrosomethylharnstoff-induzierten Gehirntumoren von Ratten. Sie werden als pluripotente Glia-Progenitorzellen bezeichnet, da sie in den frühen Passagen nach Zugabe bestimmter Wachstumsfaktoren zu Oligodendrocyten differenzieren können. Bei längerer Kultur sowie Passagenzahlen von über 80, wurde von Parker et al. (1980) eine Transdifferenzierung von oligodendrocytischen zu astrocytischen Eigenschaften beobachtet. Damit dadurch hervorgerufene Veränderungen von Eigenschaften und Morphologie keinen Einfluss auf die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente hat, wurde hier ausschließlich mit Zellen der Passagen 9 bis 42 gearbeitet. Ebenfalls war für die in dieser Arbeit durchgeführten Inkubationsversuche von besonderer Bedeutung, dass die verwendeten Zellen ein Stoffwechselmaximum aufwiesen und damit verstärkt Stoffe aus dem Kulturmedium aufnahmen. Aus diesem Grund wurden hier ausschließlich Zellen verwendet, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Weiterhin konnte damit die bei C6-Zellen auftretende Kontaktinhibition des Wachstums ausgeschlossen werden, da C6-Zellen in diesem Stadium den Boden der Kulturschale nur zu 70-80% bedeckten (Abb. 5.2.1). Weil die Verdopplungszeit in der logarithmischen Wachstumsphase 35 bis 41 Stunden (Benda et al. 1968) beträgt, wurden für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche Zellen im Bereich von 24 Stunden verwendet, um den oben genannten Umständen Rechnung zu tragen.

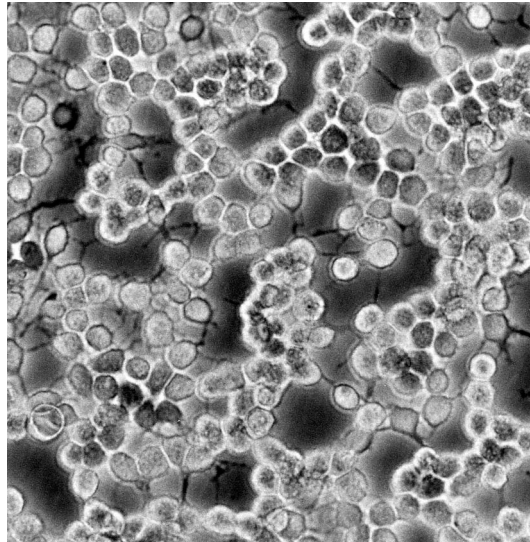
Die in diese Arbeit verwendeten C6-Gliomazellen wurden in 100 mm-Zellkulturschalen mit Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) kultiviert. Dem Medium wurde zur Optimierung der Kulturbedingungen 4500 mg/L Glucose (high glu), sowie 3.7 g/L NaHCO<sub>3</sub> und 5% FKS zugesetzt. Zusätzlich wurden 100 Einheiten Penicillin und 100 µg Streptomycin pro mL Medium hinzugefügt, um einer eventuellen Infektion der Zellkultur durch Bakterien entgegenzuwirken. Nach Zugabe von Medium wuchsen die Zellen bei 37°C und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre mit 10% CO<sub>2</sub> im Brutschrank.

Bedingt durch die jeweilige Destination ergaben sich zwei unterschiedliche Behandlungsweisen

für Zellen. Für die Zellzucht wurden konfluent gewachsene 100 mm Kulturschalen benötigt, was durch das Ausplattieren von  $2 \times 10^5$  Zellen (dies entspricht 75  $\mu\text{L}$  Zellsuspension einer konfluent gewachsenen 100 mm Kulturschale) in 10 mL Kulturmedium erreicht wurde. Nach vier Tagen wurde hier das alte Medium durch neues ersetzt und die Konfluenz stellte sich nach sieben Tagen ein. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Inkubationsversuche hingegen wurden, aufgrund der o.g. Umstände, 70-80% konfluent gewachsene 60 mm Kulturschalen verwendet (Abb. 5.2.1). Für diesen Zweck wurden 400  $\mu\text{L}$  Zellsuspension in 4.6 mL Kulturmedium ausplattiert und die gewünschte Konfluenz stellte sich am zweiten Tag nach dem Aussäen ein. Da C6-Zellen nicht sehr fest am Boden der Kulturschalen haften, erfolgte das Ablösen rein mechanisch durch vorsichtiges Abspülen mit dem Mediumstrahl. Durch diesen Umstand konnte das bei anderen Zelllinien oft angewendete Trypsinieren umgangen werden, und eine eventuell auftretende Beeinflussung des Zellwachstums oder der Inkubationsversuche durch Trypsin und EDTA wurde ausgeschlossen.

Um die Möglichkeit offen zu halten, spezielle Versuche dieser Arbeit unter gleichen Bedingungen wiederholen zu können, wurden die jeweiligen Passagen an C6-Zellen eingefroren. Zum Einfrieren wurden Zellen in konfluent gewachsenen 100 mm Kulturschalen mit 1.35 mL FKS abgelöst, dann mit 150  $\mu\text{L}$  DMSO (entsprechend einer Endkonzentration von 10% DMSO) versetzt und anschließend in Reaktionsgefäßen bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Beim umgekehrten Prozess wurden die Reaktionsgefäße mit den Zellen in einem, auf  $37^\circ\text{C}$  vorgewärmten, Wasserbad aufgetaut und danach in eine Kulturschale mit 10 mL Medium gegeben. Aufgrund der hohen Zelldichte wuchsen die Zellen über Nacht an und am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Dies passierte zum einen um neue Nährstoffe bereitzustellen und zum anderen, um die restlichen Spuren des eventuell noch vorhandenen DMSO zu eliminieren. Nach zweimaligem Passagieren wurden die Zellen dann für die jeweilig durchgeführten Versuche verwendet.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Zellzahlbestimmungen erfolgten mit Hilfe der sogenannten „Neubauerzählkammer“ (Neubauer-Haematocytometer) in geeigneten Verdünnungen von  $4 \times 10^5$  bis  $3 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter, wobei der Mittelwert aus vier Zählungen in die jeweilige Versuchsauswertung einfluss.



**Abb. 5.2.1: Phasenkontrastaufnahme von C6-Zellen.** Dargestellt sind C6-Zellen die 70-80% konfluent gewachsen sind. Das Bild wurde in einer Vergrößerung von 1:200 aufgenommen.

#### A549-Zellen

Die in diese Arbeit ebenfalls verwendeten A549-Zellen wurden in 100 mm-Zellkulturschalen mit Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) kultiviert. Dem Medium wurde zur Optimierung der Kulturbedingungen 1000 mg/L Glucose (low glu), sowie 3.7 g/L  $\text{NaHCO}_3$  und 10% FKS zugesetzt. Zusätzlich wurden 100 Einheiten Penicillin und 100  $\mu\text{g}$  Streptomycin pro mL Medium hinzugefügt, um einer eventuellen Infektion der Zellkultur durch Bakterien entgegenzuwirken. Nach Zugabe von Medium wuchsen die Zellen bei 37 °C und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre mit 5%  $\text{CO}_2$  im Brutschrank.

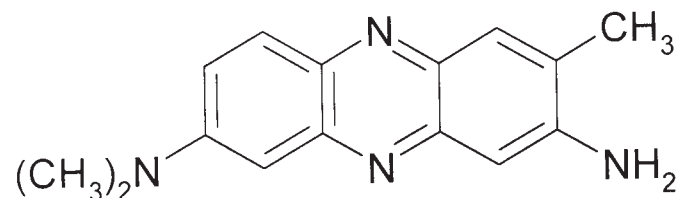
Für die Zellzucht wurden konfluent gewachsene 100 mm Kulturschalen benötigt, was durch das Ausplattieren von  $2 \times 10^5$  Zellen (dies entspricht 100  $\mu\text{L}$  Zellsuspension einer konfluent gewachsenen 100 mm Kulturschale) in 10 mL Kulturmedium erreicht wurde. Nach vier Tagen wurde hier das alte Medium durch neues ersetzt und die Konfluenz stellte sich nach sieben Tagen ein. Da A549-Zellen sehr fest am Boden der Kulturschalen haften, wurden die Zellen für zwei Minuten mit einer Lösung aus Trypsin (10%) und EDTA (0.02%) behandelt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit zwei Milliliter PBS-Puffer gespült. Erst dann erfolgte das mechanische Ablösen durch vorsichtiges Abspülen mit dem Mediumstrahl. Um die Möglichkeit offen zu halten, spezielle Versuche dieser Arbeit unter gleichen Bedingungen wiederholen zu können, wurden die jeweiligen Passagen an A549-Zellen eingefroren. Zum Einfrieren wurden Zellen in konfluent gewachsenen 100 mm Kulturschalen mit 1.35 mL FKS abgelöst, dann mit 150  $\mu\text{L}$  DMSO (entsprechend einer Endkonzentration von 10% DMSO) versetzt und anschließend in Reaktionsgefäßen bei -80 °C eingefroren. Beim umgekehrten Prozess wurden die Reaktionsgefäße mit den Zellen in einem, auf 37 °C vorgewärmten, Wasserbad aufgetaut und danach in eine Kulturschale mit 10 mL Medium gegeben. Aufgrund der hohen Zelldichte

wuchsen die Zellen über Nacht an und am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Dies passierte zum einen um neue Nährstoffe bereitzustellen und zum anderen, um die restlichen Spuren des eventuell noch vorhandenen DMSO zu eliminieren. Nach zweimaligem Passagieren wurden die Zellen dann für die jeweilig durchgeführten Versuche verwendet.

### 5.2.2 Untersuchungen zur Cytotoxizität in C6-Zellen

Die Bestimmung der chronischen Cytotoxizität von Zink wurde in dieser Arbeit aus Gründen der Vergleichbarkeit auf zwei unterschiedliche Weisen durchgeführt. Zum einen erfolgte die Bestimmung durch eine Modifikation des Neutralrottestes (a) und zum anderen durch DNA-Fragmentierung mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese (b).

(a) Der Neutralrot-Farbstoff (N8,N8,3-Trimethyl-2,8-Phenazindiamin; Abb. 5.2.2) liegt intrazellulär, im Vergleich zum umgebenden mehr basischen Puffer, hauptsächlich protoniert vor. Dieser Umstand wird durch den  $pK_A$ -Wert von Neutralrot bedingt, der nahe des Neutralpunktes liegt. Das geladene Farbstoffmolekül, das somit intrazellulär „gefangen“ ist, wird bei Vorhandensein von intakten Zellmembranen und funktionierenden  $H^+$ -ATPasen in den aziden Lysosomen akkumuliert. Aus diesem Grund wird eine Zelle, oder der Teil einer Zellpopulation, als lebend bezeichnet, die bzw. der, es vermag, Neutralrot aufzunehmen (Barbich et al. 1986).



**Abb. 5.2.2: Strukturformel von Neutralrot.**

Der Neutralrottest wurde mit den folgenden Lösungen durchgeführt:

#### Neutralrotstammlösung

Zur Herstellung der Neutralrotstammlösung wurden 0,4 g Neutralrot in 100 mL bidestilliertem Wasser gelöst und unter sterilen Verhältnissen durch einen 0,3  $\mu$ m-Filter filtriert.

Diese Stammlösung ist bei einer Temperatur von 4 °C über einen längeren Zeitraum haltbar.

### Neutralrotgebrauchslösung

Die Neutralrotgebrauchslösung setzt sich aus 200 µl Neutralrotstammlösung und 50 mL des für die Zellkultur verwendeten Nährmediums zusammen. Nach einer 24-stündigen Aufbewahrung bei 37°C wurden eventuell gebildete Farbstoffansammlungen in der Zentrifuge mit 6000 U/min abgetrennt und der Überstand für den Cytotoxizitätstest verwendet.

### PBS-Puffer

Der hier verwendete PBS-Puffer wurde aus 137 mM (8.0 g/L) NaCl, 10 mM (1.44 g/L) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 mM (0.2 g/L) KCl und 1.5 mM (0.2 g/L) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in bidestilliertem Wasser hergestellt.

Mit Hilfe eines elektronischen pH-Meters wurde der pH-Wert mit NaOH und HCl auf 7.38 eingestellt.

### Essigsaures 50%iges Ethanol

Aus 1 mL konzentrierter Essigsäure, 50 mL bidestilliertem Wasser und 50 mL Ethanol wurde das benötigte essigsaure 50%ige Ethanol hergestellt.

### Durchführung des Neutralrottestes:

In einer 96er Multiwell-Platte wurden aus Gründen der Reflexion bei der Messung nur die inneren 60 Wells benutzt. Nach Zugabe von  $1 \times 10^5$  Zellen in 250 µL Kulturmedium pro Well wurde die Platte zum Anheften der Zellen am Boden der Wells für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe der jeweilig geforderten Konzentration der zu untersuchenden Substanzen und dann die Inkubation für die jeweilig geforderte Zeit. Anschließend wurde das Medium verworfen, mit sterilem PBS gespült und neues Medium hinzugegeben. An diesen letzten Arbeitsschritt schloss sich eine 24stündigen Ruhephase im Brutschrank an. Danach erfolgte das Absaugen des Mediums gefolgt von der Zugabe von 250 µL Neutralrotgebrauchslösung pro Well für drei Stunden. Damit das aufgenommene Neutralrot quantitativ bestimmt werden konnte, wurden die Zellen danach mit PBS gespült und in 1 mL essigsaurem 50%igem Ethanol durch Schütteln aufgeschlossen.

Die Messung der Menge an Neutralrot erfolgt üblicherweise bei einer Absorptionswellenlänge von 540 nm im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Eine solche Messung berücksichtigt aber nicht den Umstand, dass Neutralrot selber ein Fluoreszenzfarbstoff ist. Schon Messungen von Haase (2001) konnten zeigen, dass eine fluorimetrische Detektion (im Multiwell-Platten-Lesegerät des LS 50 B) zur Quantifizierung besser geeignet ist. Fluoreszenzspektren von in essigsaurem Ethanol gelöstem Neutralrot ergaben Anregungsmaxima bei 512 nm und Emissionsmaxima bei 600 nm. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass zwischen Farbstoffkonzentration und gemessener Fluoreszenzintensität eine lineare Korrelation von  $y = 3.194x$  (mit:  $y$  = relative Fluoreszenzintensität;  $x$  = Neutralrotkonzentration in ng/mL)

mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.945 besteht. Die eigentliche Quantifizierung der Cytotoxizität der untersuchten Substanzen und Konzentrationen erfolgte jeweils durch die Auswertung einer Neunfachbestimmung. Die in dieser Arbeit aufgeführte Überlebensrate ergibt sich aus der Subtraktion der Autofluoreszenz von letal geschädigten Zellen von den jeweils gemessenen Werten. Als letal geschädigt gelten Zellen nach 24stündiger Inkubation mit 10 mM Zinkchlorid. Der Vergleich der so erhaltenen, korrigierten Werte, mit der, als 100% gesetzten Neutralrotfluoreszenz unbehandelter Kontrollen, liefert dann die Überlebensrate. Diese wird jeweils durch den Mittelwert von neun Messungen bestimmt und in Prozent angegeben.

(b) Als zweite Bestimmungsmethode für die Cytotoxizität wurde die durch Apoptose hervorgerufene DNA-Fragmentierung verwendet. Wie schon in der Einleitung beschrieben, zeigen die im Laufe des programmierten Zelltods gebildeten DNA-Bruchstücke ein charakteristisches Bandenmuster („DNA-Leiter“) in der Elektrophorese und liefern damit einen gut detektierbaren Nachweis für Toxizität. Als Positivkontrollen wurden C6-Zellen für 48 Stunden mit einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  im Medium inkubiert. Durch die intrazelluläre Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) und starker Lipidperoxidation gilt  $\text{H}_2\text{O}_2$  in der eingesetzten Konzentration für C6-Zellen als Apoptose-induzierender Faktor. Als Negativkontrollen dienten unbehandelte Zellen für die jeweilig geforderte Zeit, jedoch ohne Zugabe der zu testenden Substanzen im Brutschrank belassen wurden.

#### 5.2.2.1 Untersuchungen zur chronischen Zinktoxizität in C6-Glioma-Zellen

Die cytotoxische Wirkung von  $\text{ZnCl}_2$  wurde bezüglich der Konzentration und Inkubationszeit im Neutralrottest untersucht. Tabelle 5.2.2.1a gibt die für den Neutralrottest eingesetzten Konzentrationen und Inkubationszeiten wider.

**Tabelle 5.2.2.1a:** Inkubationszeiten und  $ZnCl_2$ -Konzentrationen für den Neutralrottest. Die verwendeten Zellen wurden, wie unter 5.2.2 (a) beschrieben, inkubiert und aufgearbeitet.

Inkubationszeit [h]	$ZnCl_2$ -Konzentrationen [ $\mu M$ ]					
1	0	100	200	300	400	500
2	0	100	200	300	400	500
3	0	100	150	200	250	300
24	0	25	50	75	100	150

Ebenfalls wurde die chronische Zinktoxizität durch Detektion der sogenannten „DNA-Leiter“ mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Tabelle 5.2.2.1b gibt die für die DNA-Fragmentierung eingesetzten Konzentrationen und Inkubationszeiten wieder.

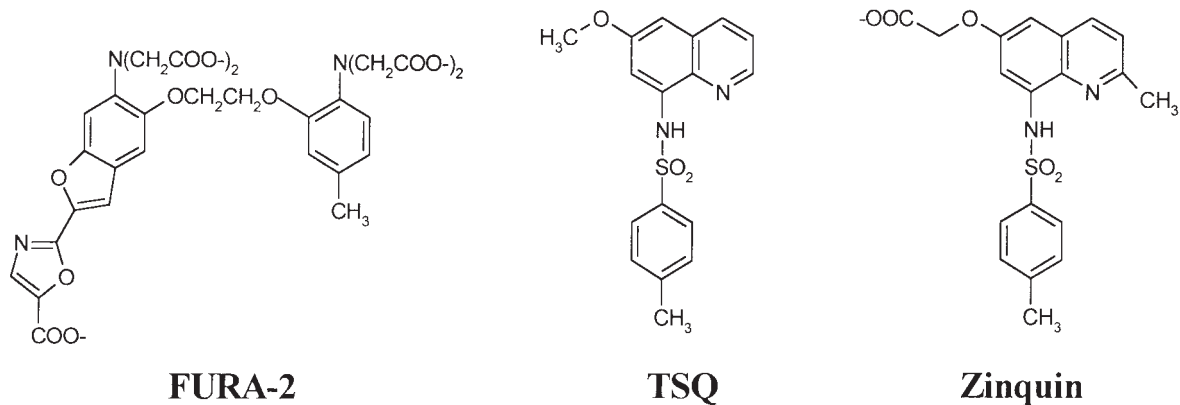
**Tabelle 5.2.2.1b:** Inkubationszeiten und  $ZnCl_2$ -Konzentrationen für die DNA-Fragmentierung. Die verwendeten Zellen wurden, wie unter 5.2.2 (b) sowie 5.2.4 beschrieben, inkubiert und aufgearbeitet.

Inkubationszeit [h]	$ZnCl_2$ -Konzentrationen [ $\mu M$ ]				
4	0	50	100	150	200
12	0	50	100	150	200
24	0	50	100	150	200
48	0	50	100	150	200



### 5.2.3 Fluoreszenzspektrometrie

Die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzsonden zur Detektion von Zink waren TSQ (Abb. 5.2.3a) und Zinquin (Abb. 5.2.3b), außerdem wurde FURA-2 (Abb. 5.2.3c) zur Detektion von Zink sowie von Calcium verwendet (siehe dazu auch Einleitung).



**Abb. 5.2.3: Strukturen der verwendeten Fluoreszenzsonden.** Dargestellt sind jeweils die intrazellulär vorliegenden Strukturen nach eventueller Spaltung von Acetoxymethyl- oder Ethylester durch intrazelluläre Esterasen.

Für diese Sonden mussten zunächst die optimalen Anregungs- und Emissionswellenlängen der metallgebundenen Farbstoffe in C6-Zellen ermittelt werden. Für diesen Zweck wurden jeweils  $3 \times 10^6$  Zellen unter den, in Tab. 5.2.3a für Zink bzw. Tab. 5.2.3b für Calcium, aufgeführten Bedingungen behandelt. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen in 60 mm Kulturschalen und Inkubationspuffer mit den jeweiligen Fluoreszenzsonden beladen und bei 37 °C für die angegebenen Zeiten inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit 2 mL Messpuffer (MP) gewaschen und dann mit nochmals 2 mL MP vom Boden der Kulturschalen abgelöst. In der Fluoreszenzküvette wurden die Zellen bei 37 °C und unter Rühren für 15 Minuten mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  und 25  $\mu\text{M}$  des membranpermeablen Zinkionophores bzw. 1.9 nM des membranpermeablen Calcium-ionophores A23187 behandelt. Durch Applikation der Ionophore konnte sichergestellt werden, dass die Fluoreszenzsonden mit Zink bzw. Calcium gesättigt wurden. Von den so behandelten Zellen wurden dann mit dem Scan-Programm der FL WinLab-Software Excitations- und Emissionsspektren mit Schlitzweiten von jeweils 10 nm und einer Scangeschwindigkeit von 1500 nm/min aufgenommen und die Wellenlängenmaxima bestimmt. Zur Lyse der Zellen wurde anschließend 40  $\mu\text{L}$  10%iges NP40 und 5 mM EDTA (Endkonzentration) hinzugegeben und von den jetzt metallfreien Fluoreszenzsonden Spektren unter den oben genannten Bedingungen aufgenommen. Tabelle 5.2.3a/b geben die Ergebnisse

dieser Messung und damit die Wellenlängenmaxima, die für alle folgenden Messungen verwendet wurden, wieder. Um festzustellen, ob die Verwendung eines Metallionen-Ionophores den Zink- bzw. Calciumeinstrom nennenswert verändert, wurde unter Verwendung von Na-Pyrithion und A23187 die Intensitätsveränderung des Fluoreszenzsignals detektiert. Hierfür wurde die Zink- bzw. Calciumaufnahme, unter gleichzeitiger Verwendung von Na-Pyrithion bzw. A23187, erneut durchgeführt und dabei mit der Timedrive-Funktion der FL WinLab-Software die Zunahme der Fluoreszenzintensitäten aufgezeichnet.

**Tab. 5.2.3a: Detektion der Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluoreszenzsonden für Zink.**

Fluoreszenzsonde	Wellenlängenmaxima [nm]			Inkubationsbedingungen	
	Excitation, zinkgebunden	Excitation, zinkfrei*	Emission	Zeit [min]	Konzentration [ $\mu$ M]
FURA-2	345	380	510	15	4
TSQ	369	-	480	30	30
Zinquin	364	-	470	30	25

**Tab. 5.2.3b: Detektion der Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluoreszenzsonden für Calcium.**

Fluoreszenzsonde	Wellenlängenmaxima [nm]			Inkubationsbedingungen	
	Excitation, zinkgebunden	Excitation, zinkfrei	Emission	Zeit [min]	Konzentration [ $\mu$ M]
FURA-2	340	380	509	15	4

Die Zellen wurden, wie im Text beschrieben, inkubiert und aufgearbeitet.

\* Diese Excitationswellenlängenmaxima gelten bei Ratiofarbstoffen für die metallfreie Sonde.

#### 5.2.3.1 Fluoreszenzmessungen für Inkubationsversuche mit Zink

Für Zellen, die für die in dieser Arbeit durchgeführten Inkubationsversuche verwendet werden, gilt ebenfalls das unter 5.2.3 beschriebene Prinzip der Inkubation und Aufarbeitung. Die verwendeten Zellen werden mit 25  $\mu$ M Zinquin E und u.U. mit den im Text angegebenen Konzentrationen anderer Reagenzien in 60 mm Kulturschalen und Inkubationspuffer beladen und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Danach werden die Zellen zweimal mit 2 mL Messpuffer (MP) gewaschen und dann mit nochmals 2 mL MP vom Boden der Kulturschalen abgelöst und in eine Fluoreszenzküvette überführt. Bei 37 °C und unter ständigem Rühren erfolgt, nach eventueller Zugabe von im Text angegebener Reagenzien, dann die Messung im LS 50 B. Eventuelle Veränderungen werden im jeweiligen Text angegeben.

Für Fluoreszenzmessungen in einem zellfreien System werden jeweils 5  $\mu\text{M}$  Zinquin A in 2 mL MP sowie 2 mL bidestilliertes Wasser gegeben. Bei 37 °C und unter ständigem Rühren erfolgt, nach eventueller Zugabe der im Text angegebenen Reagenzien, dann die Messung im LS 50 B. Zellfreie Fluoreszenzmessungen werden immer parallel in MP und bidestilliertem Wasser durchgeführt, um einen Einfluss des pH-Wertes auszuschließen. Eventuelle Veränderungen werden im jeweiligen Text angegeben.

#### 5.2.3.2 Fluoreszenzmessungen für Inkubationsversuche mit Calcium

Für Zellen, die für die in dieser Arbeit durchgeführten Inkubationsversuche verwendet werden, gilt ebenfalls das unter 5.2.3 beschriebene Prinzip der Inkubation und Aufarbeitung. Die verwendeten Zellen werden mit 4  $\mu\text{M}$  Fura-2/AM und u.U. mit den im Text angegebenen Konzentrationen anderer Reagenzien in 60 mm Kulturschalen und Inkubationspuffer beladen und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Danach werden die Zellen zweimal mit 2 mL Messpuffer (MP) gewaschen und dann mit nochmals 2 mL MP vom Boden der Kulturschalen abgelöst und in eine Fluoreszenzküvette überführt. Bei 37 °C und unter ständigem Rühren erfolgte, nach eventueller Zugabe von im Text angegebener Reagenzien, dann die Messung im LS 50 B. Eventuelle Veränderungen werden im jeweiligen Text angegeben.

Für Fluoreszenzmessungen in einem zellfreien System werden jeweils 1  $\mu\text{M}$  Fura-2 in 2 mL MP sowie 2 mL bidestilliertes Wasser gegeben. Bei 37 °C und unter ständigem Rühren erfolgte, nach eventueller Zugabe der im Text angegebener Reagenzien, dann die Messung im LS 50 B. Zellfreie Fluoreszenzmessungen werden immer parallel in MP und bidestilliertem Wasser durchgeführt, um einen Einfluss des pH-Wertes auszuschließen. Eventuelle Veränderungen werden im jeweiligen Text angegeben.

#### 5.2.3.3 Fluoreszenzmessungen zur indirekten Identifikation des ZnR's

Für Zellen, die für die in dieser Arbeit durchgeführten Inkubationsversuche verwendet werden, gilt ebenfalls das unter 5.2.3 beschriebene Prinzip der Inkubation und Aufarbeitung. Die verwendeten Zellen werden parallel mit 25  $\mu\text{M}$  Zinquin E und 4  $\mu\text{M}$  Fura-2/AM in 60 mm Kulturschalen und Inkubationspuffer beladen und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Danach werden die Zellen zweimal mit 2 mL Messpuffer (MP) gewaschen und dann mit nochmals 2 mL MP vom Boden der Kulturschalen abgelöst und in eine Fluoreszenzküvette überführt. Bei 37 °C und unter ständigem Rühren erfolgte, nach eventueller Zugabe von im Text angegebener Reagenzien, dann die Messung im LS 50 B. Eventuelle Veränderungen werden im jeweiligen Text angegeben.

Für Fluoreszenzmessungen in einem zellfreien System werden jeweils 5  $\mu\text{M}$  Zinquin A und 1  $\mu\text{M}$  Fura-2 in 2 mL MP sowie 2 mL bidestilliertes Wasser gegeben. Bei 37 °C und unter ständigem Rühren erfolgt, nach eventueller Zugabe der im Text angegebenen Reagenzien, dann die Messung im LS 50 B. Zellfreie Fluoreszenzmessungen werden immer parallel in MP

und bidestilliertem Wasser durchgeführt, um einen Einfluss des pH-Wertes auszuschließen. Eventuelle Veränderungen werden im jeweiligen Text angegeben.

#### 5.2.4 DNA-Extraktion und Agarose-Gelelektrophorese

##### (a) DNA-Extraktion

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, wird die DNA von Zellen während des Apoptoseprozesses durch eine Ca/Ma-abhängige Endonuklease in der internukleosomalen Linkerregion in Bruchstücke von 180 Basenpaaren und einem vielfachen davon, zerschnitten. Zur Detektion dieser Fragmente muss die DNA aus der jeweiligen Zellsuspension extrahiert werden. Hierfür werden die für eine bestimmte Zeit inkubierten Zellen mit dem vorhandenen Medium vom Boden der Kulturschalen abgelöst, in ein 10 mL Sarstedt-Röhrchen überführt und fünf Minuten lang mit 500 g bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgegossen und das Pellet in 1 mL PBS-Puffer resuspendiert, in ein 1.5 mL Eppendorfcup überführt und mit 15000 U/min bei 4 °C für 60 Sekunden zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes und Entfernung letzter Flüssigkeitsreste wurde das Pellet bis zur DNA-Isolation bei -20 °C eingefroren. Zum Schutz vor exogenen Dnase wurden alle weiteren Schritte in autoklavierten Reaktionsgefäßen und mit autoklavierten Puffern durchgeführt. Nach dem Auftauen wurden die Pellets mit je 500 µL Lysepuffer versetzt, resuspendiert und durch anschließende Zugabe von 5 µL Rnase A (10 mg/mL) wurde eine Hydrolyse der noch vorhandenen zellulären RNA bewirkt. Die Lyse der Zellen sowie der Abbau der RNA wurde dann durch eine 40minütige Inkubation und leichtes Schütteln bei 37 °C auf dem Thermomixer bewirkt. Als nächster Schritt folgte die Fällung der Zellproteine durch Zugabe von 125 µL 5 M NaCl-Lösung und einer 60minütigen Ruhephase bei 4 °C. Es folgte eine Zentrifugation für 15 Minuten mit 12000 U/min bei 4 °C nach der dann 500 µL des wässrigen Überstandes zur weiteren Behandlung in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurden. Die weitere Abtrennung von Proteinen erfolgte nach Zugabe von 250 µL Chloroform und 500 µL gepuffertem Phenol (pH 7.5-8) durch zweiminütiges Schütteln. Anschließend wurde 15 Minuten lang mit 12000 U/min bei 4 °C zentrifugiert und danach die organische Phase verworfen. Zum vollständigen Entfernen von Proteinresten wurde nun die gesamte verbliebene Phase mit 650 µL Chloroform versetzt und für 2 Minuten geschüttelt. Nach 15minütigem Zentrifugieren mit 12000 U/min bei 4 °C wurde die organische Phase verworfen und die Fällung der DNA durch Zugabe von auf -20 °C vorgekühltem Isopropanol zum wässrigen Überstand, gestartet. Zur Beschleunigung dieser Fällung diente eine zweistündige Ruhephase bei -80 °C. Nach dem Auftauen der Proben wurde 15 Minuten lang mit 12000 U/min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das zurückbehaltene DNA-Pellet wurde für fünf Minuten an der Luft getrocknet und danach in 30 µL TE-Puffer (pH 8) über Nacht bei 4 °C resuspendiert. Am nächsten Tag wurden zur quantitativen DNA-Bestimmung alle Proben 1:100 verdünnt (jeweils 1 µL der Proben mit je 99 µL TE-Puffer) und im Photometer bei 260 nm der

DNA-Gehalt ermittelt (Doppelbestimmungen). Ebenfalls wurde parallel die Reinheit der DNA über den Koeffizienten des Extinktionsverhältnisses von 260 nm zu 280 nm ermittelt. Die DNA wurde dann in einem 1.75%igen Agarosegel aufgetrennt.

#### (b) Agarose-Gelelektrophorese

Das Gel wurde aus 0.525 g Agarose und 30 mL 0.5 x TBE-Puffer hergestellt. Durch kurzes Aufkochen löste sich die Agarose im Puffer und die danach auf ca. 60 °C abgekühlte Lösung wurde luftblasenfrei in die Elektrophoresekammer gegossen. Es folgte eine 30minütige Aushärtung des Gels bei Raumtemperatur und eine anschließende Lagerung bei 4 °C für 15 Minuten. Parallel erfolgte die Probenvorbereitung für die Beschickung der Geltaschen. Hierfür wurden jeweils 8 µg DNA mit 5 µL 5 x Ladepuffer versetzt und in einem Reaktionsgefäß unter Zugabe von 12 µL TE-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 25 µL gebracht. Jeder Ansatz wurde danach für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert und anschließend im Eisbad abgekühlt. Diese Proben wurden nun auf das erstarrte Gel aufgetragen und das Restvolumen der Geltaschen mit TBE-Puffer aufgefüllt. Als Marker diente der DNA-Leiter-Standard *GeneRuler* (0.1 mg/mL DNA), von dem 2 µL mit 23 µL TE-Puffer vermischt und ohne weitere Behandlung direkt auf das Gel aufgetragen wurde.

Die in dieser Arbeit durchgeführte „Submarine“-Version der Elektrophorese bestand aus einer 15minütigen Einlaufzeit des Gels bei 60 V, nach der das Gel dann vollständig mit 0.5 x TBE-Puffer bedeckt wurde und die Spannung auf 75 V erhöht wurde. Die Laufzeit des Gels betrug jeweils ca. 75 Minuten.

Für die Färbung der im Gel getrennten DNA-Fragmente wurde der Interkalationsfarbstoff Ethidiumbromid verwendet. Die 0.5 µg/mL Ethidiumbromid enthaltende Färbelösung wurde aus 2.5 µL Ethidiumbromidstammlösung (10 mg/mL) und 50 mL TBE-Puffer hergestellt. Das Gel wurde 30 Minuten lang im Taumler gefärbt und danach zweimal für je 10 Minuten mit 75 mL bidestilliertem Wasser gewaschen. Der letzte Schritt bestand in der photographischen Dokumentation der DNA-Banden mit Hilfe des Gel-Scangeräts *Herolab* und der *EasyWin*-Software.

#### 5.2.5 Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)

Die Atomabsorptionsspektrometrie dient zur quantitativen Bestimmung von Elementen aufgrund ihrer spezifischen Absorption in der Gasphase. Sie wurde in dieser Arbeit zur Bestimmung des Gesamtgehalts an zellulärem Zink verwendet.

In der AAS werden in einer elementspezifischen Hohlkatodenlampe, die als Emissionsquelle dient, durch die Anregung von Atomen eines Elements Lichtquanten emittiert, deren Wellenlänge der Hauptspektrallinie des zu untersuchenden Elements entspricht. Diese

emittierten Photonen werden dann von Atomen desselben Elements in der Gasphase absorbiert. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes kann dann durch den Vergleich der gemessenen Absorption mit Eichwerten bekannter Konzentrationen die Menge der absorbierenden Atome quantifiziert werden.

Es gibt zwei unterschiedliche Verfahren zur Atomisierung einer Probe: die Graphitrohr-AAS, bei der die Probe durch elektrische Spannung bis zu 3000 °C aufgeheizt wird sowie die in dieser Arbeit verwendete Flammen-AAS, bei der die Probe durch Verbrennen in einer Acetylenflamme atomisiert wird. Die detaillierten, theoretischen Grundlagen der Atomabsorptionsspektrometrie finden sich unter anderem bei Welz und Sperling (1997).

Es gibt zwei entscheidende Vorteile der Atomabsorptionsspektrometrie in der quantitativen Analyse von Metallionen in komplexen biologischen Proben. Zum einen können andere Metallatome aufgrund ihrer spezifischen Spektrallinien als Störfaktor in der Messung ausgeschlossen werden. Zum anderen wird der gesamte zelluläre Zinkgehalt, einschließlich der fest an Proteine gebundene Anteil, detektiert. Fluorimetrische Konzentrationsbestimmungen, wie z.B. die mittels Zinquin, scheitern hier meist aufgrund unzureichender Dissoziationskonstanten ( $K_D$  des Zink/Zinquin-Komplexes  $11.7 \times 10^{-6}$  M).

Tabelle 5.2.5 gibt die verwendeten Geräteeinstellungen und Parameter für die in dieser Arbeit durchgeführte Zinkdetektion mittels Flammen-AAS wieder.

**Tab. 5.2.5: Geräteparameter für das Flammen-AAS.**

<b>Geräteparameter des PE 2880 für die Flammen-AAS</b>	
Spezifische Wellenlänge für Zn	213.8
Arbeitsstrom der Hohlkathodenlampe für Zn	10 mA
Spaltbreite des Monochromators	0.7 nm
Probenvolumen	100 µL
Probenaufnahme	Durch AS 40 Probenautomat
Gasgemisch des Brenners (Verhältnis)	Acetylen/Sauerstoff (3:1)
Messart	Peakhöhe/Zeit

Als Eichreihe, mit deren Hilfe der Zinkgehalt der gemessenen Proben quantifiziert wurde, dienten Verdünnungen einer Zinkchlorid-Stammlösung (1.0 g/100 mL) in 0.2%iger  $\text{HNO}_3$ . Es wurden Verdünnungen von 100, 500, 1000, 1500 und 2000 ppb Zink in 0.2%iger  $\text{HNO}_3$  hergestellt und die Mittelwerte aus drei Messungen für die Auswertung der anderen Proben verwendet.

Alle weiteren Proben wurden, wie in 5.2.5.1 beschrieben, als Triplet aufgearbeitet. Außerdem wurden aus identisch behandelten Proben jeweils dreimal 100 µL in der AAS vermessen, so dass in die endgültige Auswertung ein Mittelwert aus neun Messpunkten pro Probe einging.

Die komplette Auswertung der Ergebnisse von Mittelwertbildungen über die Berechnung der Standardabweichungen bis hin zur endgültigen Konzentrationsberechnung und graphischen Darstellung, wurde mit dem Programm *MICROSOFT Excel* durchgeführt.

### 5.2.5.1 Probenaufarbeitung für die Flammen-AAS

Nach Vorbehandlung der Zellen, gemäß der in dieser Arbeit durchgeführten verschiedenen Versuche, wurde das Medium verworfen und die Zellen dreimal mit PBS gespült, bevor sie dann in 1.1 mL PBS aufgenommen wurden. Von diesem Volumen wurden 100 µL für den Proteintest in einen 1.5 mL Eppendorfcup überführt und bis zur Messung bei  $-20\text{ °C}$  eingefroren. Die restlichen 1000 µL wurden in einem 2 mL Eppendorfcup für 1 Minute bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µL 65%iger  $\text{HNO}_3$  (suprapur) und 100 µL 30%igem  $\text{H}_2\text{O}_2$  aufgenommen und 1 Stunde bei  $65\text{ °C}$  vorerhitzt und dann über Nacht bei  $85\text{ °C}$  zur Trocknung eingeraucht. Durch Zugabe von  $\text{HNO}_3$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurden zum einen die Zellen aufgeschlossen und zum anderen durch Oxidation der Cystein-Thiolgruppen zu Disulfiden das proteingebundene  $\text{Zn}^{2+}$  freigesetzt. Der so erhaltene Rückstand wurde am nächsten Tag in 500 µL 0.2%iger  $\text{HNO}_3$  aufgenommen und mit Hilfe eines Vortexers und anschließendem fünfminütigem Ultraschallbades in Lösung gebracht. Dann wurden die Proben zur entgültigen Entfernung von festen Rückständen 1 Minute lang mit 10000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert und danach vermessen.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Zinkaufnahme wurden jeweils 70-80% konfluent gewachsene Zellen in 60 mm Kulturschalen verwendet (siehe dazu auch 5.2.1). Alle weiteren Agenzien wurden, wie im Text beschrieben, zugegeben.

### 5.2.6 Proteinbestimmung

Damit in der Auswertung Angaben zu den Zinkkonzentrationen der in der AAS vermessenen Proben gemacht werden können, wurde der Gesamtproteingehalt unter Verwendung von Bicinchoninsäure (BCA) bestimmt (Smith et al. 1985). Der zweistufige Reaktionsmechanismus dieses Tests beruht auf der reduktiven Fähigkeit der in Proteinen enthaltenen Peptidbindungen. Der erste Schritt besteht aus einer Reduktion von zweiwertigem- zu einwertigem Kupfer mittels einer Redoxreaktion. Das entstandene Kupferkation kann dann im zweiten Schritt der Reaktion in alkalischer Umgebung (Optimum bei einem pH-Wert von 11.25) mit zwei BCA-Molekülen einen rotvioletten Komplex bilden. Mit Hilfe eines Photometers lässt sich die Intensität der Farbentwicklung bei 562 nm quantifizieren.

Folgende Lösungen wurden verwendet:

#### Reagenz A:

Reagenz A ist eine wässrige Lösung, bestehend aus 1 % BCA (Dinatriumsalz), 2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{x H}_2\text{O}$ , 0.16% Dinatriumtartrat, 0.4% NaOH und 0.95 %  $\text{NaHCO}_3$ .

Durch Zugabe von 50%iger NaOH wird die Lösung auf einen pH-Wert von 11.25 eingestellt.

### Reagenz B:

Reagenz B ist eine wäßrige Lösung, bestehend aus 4 %  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  gelöst in bidestilliertem Wasser.

### Standard-Arbeitsreagenz:

Das Standard-Arbeitsreagenz ist eine wässrige Lösung, die durch Mischung von Reagenz A und B im Volumenverhältnis 100:2 hergestellt wird.

Die Proteinproben für die AAS werden im Volumen-Verhältnis 1:20 verdünnt und 90  $\mu\text{L}$  davon mit 10  $\mu\text{L}$  1%iger  $\text{NP}_{40}$ -Lösung lysiert. Von den so erhaltenen 100  $\mu\text{L}$  werden jeweils 50  $\mu\text{L}$  mit 950  $\mu\text{L}$  Standard-Arbeitsreagenz vermischt und für 30 Minuten bei 60 °C inkubiert. Nach Abkühlung wird die Menge an gebildetem Kupfer(I) x 2 BCA-Komplex durch Messung der Absorption bei 562 nm bestimmt. Die enthaltene Proteinmenge wird durch Vergleich mit einer Eichreihe aus Rinderserumalbumin (RSA) in PBS-Puffer im Bereich 0.1 bis 1.0 mg/mL ermittelt.

## 5.2.7 Mikroskopie

Wie in der Einleitung beschrieben, kommt es im Verlaufe der Apoptose zu lichtmikroskopisch detektierbaren Veränderungen der zu untersuchenden Zellen. Diese Veränderungen beinhalten chronologisch eine Rückbildung der Zellfortsätze, Kondensation des Chromatins, Kernfragmentation und Membranabschnürungen.

### 5.2.7.1 Phasenkontrastmikroskopie

Mit Hilfe eines inversen Phasenkontrastmikroskops wurde in dieser Arbeit die Morphologie der zu untersuchenden Zellen geprüft. Die Dokumentation eventueller Veränderungen in der Zell-Morphologie, die durch Zugabe von toxischen Konzentrationen der untersuchten Agenzien hervorgerufen wurden, erfolgte durch Photographie, direkt in den Kulturschalen.

## 5.2.8 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

Die in dieser Arbeit durchgeführte Dünnschichtchromatographie diente zur Klärung des im LS 50 B beobachteten Abfalls der Fluoreszenzintensität während der Messungen mit dem PLC-Aktivator 2,4,6-trimethyl-*N*-(meta-3-trifluoromethyl-phenyl)-benzenesulfonamide (*m*-3M3FBS). Da es in Kontrollmessungen ohne Zellen ebenfalls zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von *m*-3M3FBS kam, die dann aber rasch abnahm, wurde davon ausgegangen, dass 1) *m*-3M3FBS eine starke Eigenfluoreszenz emittiert und 2) dass *m*-3M3FBS unter



Einstrahlung von UV-Licht zerfällt.

Die Dünnschichtchromatographie wurde auf zwei, mit Silicia-Gel beschichteten, 20 x 20 cm Aluminiumplatten durchgeführt. Nach Auftragung von 1  $\mu$ L *m*-3M3FBS (10 mM) auf beide Chromatographieplatten wurden diese in einen Chromatographietank mit 100 mL Laufmittel überführt. Zur Sättigung der Gasphase wurde das Laufmittel, bestehend aus Chloroform (94.5%), Aceton (4.5%) und Eisessig (1%), bereits 45 Minuten vor Überführung der Chromatographieplatten in den Tank gegeben. Nach einer Laufzeit von einer Stunde wurden beide Silica-Platten herausgenommen und kurz mit dem Fön getrocknet. Während die Kontrollplatte vor Licht geschützt aufbewahrt wurde, wurde die andere 15 Minuten lang kurzweiligem UV-Licht ausgesetzt (254 nm, 8 Watt, 10 cm Abstand). Nach Ablauf dieser Zeit wurden beide Platten um 90° gedreht und wieder in die Chromatographietanks gestellt (Laufmittel wie oben; gesättigte Gasphase). Nach einer weiteren Stunde wurden beide Chromatographieplatten herausgenommen und die gebildeten Punkte der Zerfallsprodukte wurden durch Selbstfluoreszenz detektiert.

### 5.2.9 Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

Um eine zweite, genauere Kontrolle für den in 5.2.8 beschriebenen Zerfall von *m*-3M3FBS zu erhalten, wurde mit einer UV-behandelten 5 mM Lösung *m*-3M3FBS eine hochauflösende Flüssigkeitschromatographie durchgeführt. Die stationäre Phase (Umkehrphase) der in dieser Arbeit durchgeführten HPLC bestand aus einer handgepackten Lichrosorb RP 18 Säule (100 x 4 mm). Als die optimale Laufmittelzusammensetzung ergab sich, nach Durchführung eines Methanol-Gradienten, ein Gemisch aus 70% Methanol und 30% Wasser. Dieses Elutionsmittel wurde dann bei einer Flussrate von 1.0 mL/Minute und einem Druck von 130 bar zur Trennung verwendet (Schreibergeschwindigkeit: 3 cm/Minute). Das Eluat wurde so aufgenommen, dass man es den aufgetretenen Peaks zuordnen konnte. Diese HPLC-Analytik wurde jeweils dreimal mit 10  $\mu$ L der UV-behandelten Probe, sowie der unbehandelten Probe und einer 5 mM DMSO-Lösung als Kontrolle wiederholt. Die HPLC-Analytik wurde mit der Hilfe von Herrn Jürgen Arning durchgeführt.

### 5.2.10 Massenspektrometrie

Das Prinzip der Massenspektrometrie beruht auf einer Ionisierung und Fragmentierung gasförmiger Moleküle in einem Elektronenstrahl. Die Detektion der Molekülonen und ihrer Fragmente geschieht nach ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung. Das resultierende Massenspektrum gibt die molare Masse der untersuchten Verbindung wieder. Die Ergebnisse der Fragmentierung lassen zusätzlich Rückschlüsse auf die Struktur des Moleküls zu. Die Empfindlichkeit der MS reicht vom fmol-Bereich ( $10^{-15}$  mol L<sup>-1</sup>) bis zu mehreren 100 kDa, und es erfolgt oft eine Kopplung der MS mit anderen Trennverfahren (Bsp.: HPLC-MS).

### 5.2.10.1 Electrospray Ionisation Mass-Spectrometry

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten ESI-MS-Messungen wurde eine Flussrate von 2  $\mu\text{L}/\text{Min}$  gewählt und es wurden jeweils beide Ionen-Polaritäten, negativ sowie positiv, detektiert. Für jede ESI-MS-Messung wurde das positive sowie das negative Ionenspektrum detektiert. Alle vermessenen Proben wurden wie unter a) und b) beschrieben behandelt. Abweichungen in der Behandlung werden im jeweiligen Text beschrieben. Alle Proben wurden in das Spektrometer automatisch über eine Spritzenpumpe eingesprüht, die Flussrate betrug 2  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Die Spannungen im Vakuum-Interface sowie das Stossgas wurden so gewählt das die Molekülionenstabilität maximal war und somit keine Fragmentationen im Spektrum detektiert wurden (es kam dadurch nicht zu einer stoßinduzierten Fragmentation in der Noozle-Skimmer-Region). Alle Die Massenspektren wurden für eine Minute aufgenommen und danach gemittelt, um Schwankungen des Signals zu korrigieren. Die ESI-MS-Analytik wurde mit der Hilfe von Herrn Dr. Thomas Dülcks und Frau Dorit Kemken durchgeführt.

#### Probenvorbereitung:

##### a) Identifikation der Zerfallsprodukte von *m*-3M3FBS

Die ESI-MS diente zur Identifikation der nach der UV-Behandlung von *m*-3M3FBS aufgetretenen und in der Dünnschichtchromatographie (5.2.8) sowie der HPLC-Analyse (5.2.9) detektierten Zerfallsprodukte. Für diesen Zweck wurden die durch die Dünnschichtchromatographie (5.2.8) getrennten Spaltprodukte zusammen mit der jeweiligen Silica-Gel-Oberfläche von der Chromatographieplatte abgekratzt und in 100%igem Methanol in Lösung gebracht und dann für die ESI-MS-Messung verwendet. Die Eluate der in der HPLC-Analyse (5.2.9) detektierten Peaks hingegen wurden unverdünnt, ohne weitere Zugabe von Methanol, in der ESI-MS vermessen.

##### b) Analyse des Einflusses von L-Cystein auf den Zinquin/Zink-Komplex

Zur Analyse der entstandenen Molekülkomplexe nach Zugabe von L-Cystein zu einer Lösung mit Zinquin und Zink wurden alle zu vermessenden Proben in bidestilliertem Wasser angesetzt und dann in einem Verhältnis von 1:1 mit Methanol verdünnt.

### 5.2.11 Statistik

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden, unabhängig voneinander, mindestens dreimal durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse konnten, wie im jeweiligen Text beschrieben, als gleich angesehen werden. Ebenfalls wurden immer mindestens drei unabhängige Messungen für die unterschiedlichen Variablen innerhalb der Versuche durchgeführt. Etwaige Abweichungen davon, werden in den jeweiligen Legenden indiziert.

Die dargestellten Balken des Gesamtzinkgehalts bei AAS-Messungen geben die mittlere zelluläre Zinkkonzentration unter Berücksichtigung des Standardfehlers aus jeweils neun Messungen ( $n = 9$ ) an. Die Kontrolle blieb ohne Zugabe von Zink bzw. Inhibitor/Aktivator.

Die in dieser Arbeit dargestellten Fehlerbalken ergaben sich aus der Berechnung der Standardabweichungen, auf Basis des Programms *Microsoft Excel 97*. Die gemessenen Ergebnisse sind dabei als Stichproben der Gesamtheit aller möglichen Ergebnisse des durchgeführten Experiments anzusehen.

Die Bestimmung der Signifikanz der Unterschiede zwischen Messwerten der gleichen Versuchsreihe und den jeweiligen Kontrollen, erfolgte mit Hilfe eines einseitigen homoskedastischen T-Test von Student (Papula 1997). Diese Berechnungen wurden wiederum von dem Programm *Microsoft Excel 97* durchgeführt. Eine Signifikanz von  $p < 0.01$  wurde mit \*\* markiert, eine Signifikanz von  $p < 0.05$  wurde mit \* in den jeweiligen Abbildungen gekennzeichnet. In speziellen Fällen, in denen der homoskedastischen T-Test von Student einen Grenzwert zur eindeutigen Signifikanz ( $p < 0.01$ ) lieferte, wurde die geschachtelte Varianzanalyse (nested analysis of variances; nested Anova) durchgeführt (Papula 1997). Die Ergebnisse des T-Test von Student wurden in den durchgeführten Fällen aber durch die geschachtelte Varianzanalyse bestätigt.

## 6. Literatur

### A

Abdallah, S.M. und Samman, S. (1993) The effect of increasing dietary zinc on the activity of superoxide and dismutase and zinc concentrations in healthy female subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* 47: 327-332

aCampo, C., Wellinghausen, N., Faber, C., Fischer, A. und Rink, L. (2001) Zinc inhibits the mixed lymphocyte culture. *Biol. Trace Elem. Res.* 79: 15-22

Aiken, S.P., Horn, N.M. und Saunders, N.R. (1992) Effects of Amino Acids on zinc transport in rat erythrocytes. *J. Physiol. Lond.* 445: 69-80

Allen, T., Iftinca, M., Cole, W.C. und Plane, F. (2002) Smooth muscle membrane potential modulates endothelium-dependent relaxation of rat basilar artery via myo-endothelial gap junctions. *J. Physiol.* 545: 975-986

Anderson, R.A., Polansky, M.M. und Bryden, N.A. (1984) Strenuous running: acute effects on chromium, copper, zinc, and selected clinical variables in urine and serum of male runners. *Biol. Trace Elem. Res.* 6: 327-336

Anderson, K.M. (1997) Kinase cascades regulating entry into apoptosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 33-46

Andrews, G.K. (2003) Zinc Signals 2003, International Conference, *Abstract*

Anneren, G. und Edman, B. (1993) Down syndrome – a gene dosage disease caused by trisomy of genes within a small segment of the long arm of chromosome 21, exemplified by the study of the effects from the superoxide type-1 (SOD-1) gene. *AMPIS Suppl.* 40: 71-79

Apostolova, M.D., Ivanova, I.A. und Cherian, M.G. (1999) Metallothionein and apoptosis during differentiation of myoblasts to myotubes: Protection against free radical toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 159: 175-184

Aschner, M., Cherian, M.G., Klaassen, C.D., Palmiter, R.D., Erickson, J.D. und Bush, A.I. (1997) Metallothioneins in brain – the role in physiology and pathology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142: 229-242

Assaf S.Y. und Chung, S.H. (1984) Release of endogenous zinc from brain tissue during activity. *Nature* 308: 734-736

Atar, D., Backx, P.H., Appel, M.M., Gao, W.D. und Marben, E. (1995) Excitation-transcription coupling mediated by zinc influx through voltage dependent calcium channels. *J Biol. Chem.* 270: 2473-2477

Atwood, C.S., Moir, R.D., Huang, X., Scarpa, R.C., Bacarra, N.M., Romano, D.M., Hartshorn, M.A., Tanzi, R.E. und Bush, A.I. (1998) Dramatic aggregation of Alzheimer abeta by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J. Biol. Chem.* 273: 12817-12826

Atwood, C.S., Scarpa, R.C., Huang, X., Moir, R.D., Jones, W.D., Fairlie, D.P., Tanzi, R.E. und Bush, A.I. (2000) Characterization of copper interactions with alzheimer amyloid beta peptides: identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid beta1-42. *J. Neurochem.* 75: 1219-1233

## **B**

Bae, Y.S., Kang, S.W., Seo, M.S., Baines, I.C., Tekle, E., Chock, P.B. and Rhee, S.G. (1997) Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 272: 217-221

Bae, Y.S., Lee, T.G., Park, J.C., Hur, J.H., Kim, Y., Heo, K., Kwak, J.Y., Suh, P.G. und Ryu, S.H. (2003) Identification of a Compound That Directly Stimulates Phospholipase C Activity. *Mol. Pharm.* 63: 1043-1050

Barrocas, A.M., Cochrane, D.E., Carraway, R.E. und Feldberg, R.S. (1999) Neurotensin stimulation of mast cell secretion is receptor mediated, pertussis-toxin sensitive and requires activation of phospholipase C. *Immunopharm.* 41: 131-137

Bell, P. und Sheldrick, W.S. (1984) Preparation and structure of zinc complexes of cysteine derivatives. *Z. Naturforsch. B* 39: 1732-1737

Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L. und Sweet, W. (1968) Differentiated rat glial strain in tissue culture. *Science* 161: 370-371

Bennett, D.R., Baird, C.J., Chan, K.M., Crookes, P.F., Bremner, C.G., Gottlieb, M.M. und Naritoku, W.Y. (1997) Zinc toxicity following massive coin ingestion. *Am J Forensic Med Pathology* 18: 148-153

Berendji, D., Kolb-Bachofen, V., Meyer, K.I., Grapenthin, O., Weber, H., Wahn, V. und Kröncke, K.D. (1997) Nitric oxide mediates intracytoplasmic and intranuclear zinc release. *FEBS Lett.* 405: 37-41

Berg, J.M. und Shi, Y. (1996) The galvanisation of biology: A growing appreciation for the roles of zinc. *Science* 271: 1081-1085

Beyersmann, D. und Haase, H. (2001) Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals* 14: 331-341

Biscardi, J.S., Maa, M.C., Tice, D.A., Cox, M.E., Leu, T.H. und Parsons, S.J. (1999) c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J. Biol. Chem.* 274: 8335-8343

Bobeszko, M., Dygas, A., Nalepa, I. und Baranska, J. (2000) Different regulation of phospholipase D activity in glioma C6 cells by sphingosine, propranolol, imipramine and phorbol ester. *Cell. Sig.* 12: 399-404

Bobilya, D.J., Briske-Anderson, M. und Reeves, P.G. (1993) Ligands influence Zn transport into cultured endothelial cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 202: 159-166

Bogdan, S. und Klambt, C. (2001) Epidermal growth factor receptor signaling. *Curr. Biol.* 11: R292-R295. H., Perkins, G.A. and Lipton, S.A. (2004) Crosstalk between nitric oxide and zinc pathways to neuronal cell death involving mitochondrial dysfunction and p38-activated K<sup>+</sup> channels. *Neuron* 41: 351-365

Bonkale, W.L., Cowburn, R.F., Winblad, B. und Fastbom, J. (1997) Autoradiographic characterization of [<sup>3</sup>H]cGMP binding sites in the rat brain. *Brain Res.* 763: 1-13

Bossy-Wetzel, E., Talantova, M.V., Lee, W.D., Schölzke, M.N., Harrop, A., Mathews, E., Götz, T., Han, J., Ellisman, M.H., Perkins, G.A., and Lipton, S.A. (2004). Crosstalk between nitric oxide and zinc pathways to neuronal cell death involving mitochondrial dysfunction and p38-activated K<sup>+</sup> channels. *Neuron* 41: 351-365

Bowman, C.L., Yohe, L. und Lohr, J.W. (2001) Regulation of cytoplasmic calcium levels by two nitric oxide receptors. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281: C876-C885

Bucci, I., Napolitano, G., Giuliani, C., Lio, S., Minnucci, A., Di Giacomo, F., Calabrese, G., Sabatino, G., Palka, G. und Monaco, F. (1999) Zinc sulphate supplementation improves thyroid hypofunction in hypozincemic Down children. *Biol. Trace Elem. Res.* 67: 257-268

Buchman, A.L., Keen, C., Commisso, J., Killip, D., Ou, C.-N., Rognerud, C.L., Dennis, K. und Dunn, J.K. (1998) The Effect of a Marathon Run on Plasma and Urine Mineral and Metal Concentrations. *J. Am. Coll. Nutr.* 17: 124-127

Burdette, S.C., Walkup, G.K., Spingler, B., Tsien, R.Y. und Lippard, S.J. (2001) Fluorescent Sensors for Zn<sup>2+</sup> Based on a Fluorescein Platform: Synthesis, Properties and Intracellular Distribution. *J. Am. Chem. Soc.* 123: 7831-7841

Burdette, S.C., Frederickson, C.J., Bu, W. und Lippard, S.J. (2003) ZP4, an Improved Neuronal Zn<sup>2+</sup> Sensor of the Zinpyr Family. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 1778-1787

Burdett, S.C. und Lippard, S.J. (2003) Meeting of the minds: Metalloneurochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 3605-3610

Bush, A.I., Pettingell, W.H., Paradis, M.D. und Tanzi, R.E. (1994) Modulation of A beta adhesiveness and secretase site cleavage by zinc. *J. Biol. Chem.* 269: 12152-12158

Bush A.I., Pettingell W.H., Multhaup G., d Paradis M., Vonsattel J.P., Gusella J.F., Beyreuther K., Masters C.L., Tanzi R.E. (1994) Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc. *Science* 256: 1464-1467

Bush, A.I. und Tanzi, R.E. (2002) The galvanization of  $\beta$ -amyloid in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 7317-7319

## C

Cabral, A.L.B., Lee, K.S. und Martins, V.R. (2002) Regulation of the cellular prion protein gene expression depends on chromatin conformation. *J. Biol. Chem.* 277: 5675-5682

Cai, J., Yang, J. und Jones, D.P. (1998) Mitochondrial control of apoptosis : the role of cytochrome c. *Biochem. Biophys. Acta.* 1366: 139-149

Cantrell, A.R., Tibbs, V.C., Westenbroek, R.E., Scheuer, T. und Catterall, W.A. (1999) Dopaminergic Modulation of voltage-gated Na<sup>+</sup> current in rat hippocampal neurons requires anchoring of cAMP-dependent protein kinase. *J. Neurosci.* 19: RC21 1-6

- Canzoniero, L.M., Turetsky, D.M. und Choi, D.W. (1999) Measurement of intracellular free zinc concentrations accompanying zinc-induced neuronal death. *J. Neurosci.* 19: RC31:1-6
- Chacko, M.S. und Adamo, M.L. (2002) Double-stranded RNA decreases IGF-I gene expression in a protein kinase R-dependent, but type I interferon-independent, mechanism in C6 glioma cells. *Endocrinology* 143: 525-534
- Chai, F., Truong-Tran, A.G., Ho, L.H. und Zalewski, P.D. (1999) Regulation of caspase activation and apoptosis by cellular zinc fluxes and zinc deprivation: A review. *Immu. Cell Biol.* 77: 272-278
- Cheng, X.J., Höög, J.O., Nairn, A.C., Greengard, P. und Aperia, A. (1997) Regulation of rat Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity by PKC is modulated by state of phosphorylation of Ser-943 by PKA. *J. Am. Physiol. Soc.* 363: C1981-C1986
- Cherny, R.A., Legg, J.T., McLean, C.A., Fairlie, D.P., Huang, X., Atwood, C.S., Beyreuther, K., Tanzi, R.E., Masters, C.L. und Bush, A.I. (1999) Aqueous dissolution of Alzheimer's disease Abeta amyloid deposits by biometal depletion. *J. Biol. Chem.* 274: 23223-23228
- Cherny, R.A., Atwood, C.S., Xilinas, M.E., Gray, D.N., Jones, W.D., McLean, C.A., Barnham, K.J., Volitakis, I., Fraser, F.W., Kim, Y., Huang, X., Goldstein, L.E., Moir, R.D., Lim, J.T., Beyreuther, K., Zheng, H., Tanzi, R.E., Masters, C.L. und Bush, A.I. (2001) Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* 30: 665-676
- Chesters, J.K., Petrie, L. und Travis, A.J. (1990) A requirement for Zn<sup>2+</sup> for the induction of thymidine kinase but not ornithin decarboxylase in 3T3 cells stimulated from quiescence. *Biochem. J.* 272: 525-527
- Chesters, J.K. (1991) Trace element-gene interactions with particular reference to zinc. *Proc. Nutr. Soc.* 50: 123-129
- Chesters, J.K., Boyne, R., Petrie, L. und Lipson, K.E. (1995) Role of the promoter in the sensitivity of human thymidine kinase to lack of Zn<sup>2+</sup>. *Biochem. J.* 308: 659-664
- Choi, D.W. und Koh, J.Y. (1998) Zinc and brain injury. *Annu. Rev. Neurosci.* 21: 347-375
- Cohen, G.M. (1997) Caspases : the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326: 1-16



Colvin, R.A., Davis, N., Nipper, R.W. und Carter, P.A. (2000) Zinc Transport in the Brain: Routes of Zinc Influx and Efflux in Neurons. *J. Nutr.* 130: 1484S-1487S

Consolazio, C.F. (1983) Nutrition and performance. In: Johnsen, R.E. ed. *Progress in food and nutrition science*. Oxford, United Kingdom: Pergamon Press 7: 1-187

Cousins, R.J. und McMahon, R.J. (2000) Integrative Aspects of Zinc Transporters. *J. Nutr.* 130: 1384S-1387S

Coyle, P., Zalewski, P.D., Philcox, J.C., Forbes, I.J., Ward, A.D., Lincoln, S.F., Mahadevan, I. und Rofe, A.M. (1994) Measurement of zinc in hepatocytes by using a fluorescent probe, Zinquin: Relationship to metallothionein and intracellular zinc. *Biochem. J.* 303: 781-786

Coyle, P., Philcox, J.C., Carey, L.C. und Rofe, A.M. (2002) Metallothionein: The multipurpose protein. *CMLS Cell. Mol. Life Sci.* 59: 627-647

Cross, T.G., Scheel-Toellner, D., Henriquez, N.V., Deacon, E., Salmon, M. und Lord, J.M. (2000) Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp. Cell Res.* 256: 34-41

Csermely, P., Szamel, M., Resch, K. und Somogyi, J. (1988) Zinc can increase the activity of protein kinase C and contributes to its binding to the plasma membrane in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 263: 6487-6490

Cuajungco, M.P., Goldstein, L.E., Nunomura, A., Smith, M.A., Lim, J.T., Atwood, C.S., Huang, X., Farrag, Y.W., Perry, G. und Bush, A.I. (2000) Evidence that the beta-amyloid plaques of Alzheimer's disease represent the redox-silencing and entombment of A $\beta$  by zinc. *J. Biol. Chem.* 275: 19439-19442

Czajkowski, R., Lei, L., Sabala, P. und Baranska, J. (2002). ADP evoked phospholipase C stimulation and adenylyl cyclase inhibition in glioma C6 cells occur through two distinct nucleotide receptors, P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub>. *FEBS Letters* 513: 179-183

## **D**

Danscher, G., Howell, G., Perez-Clausell, J. und Hertel, N. (1985) The dithizone, Timm's sulphide and the selenium methods demonstrate a chelatable pool of zinc in CNS. A proton activation (PIXE) analysis of carbon tetrachloride extracts from rat brains and spinal cord intravitaly treated with dithizone. *Histochemistry* 83: 419-422

Davey, G.E., Murmann, P. und Heizmann, C.W. (2001) Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in human glioblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 276: 30819-30826

DeRuisseau, K.C., Chevront, S.N., Haymes, E.M. und Sharp, R.G. (2002) Sweat iron and zinc losses during prolonged exercise. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 12: 428-437

Dressendorfer, R.A. und Sockolov, R. (1980) Hypozincemia in runners. *Phys. Sportsmed.* 8: 97-100

Dressendorfer, R.H., Petersen, S.R., Lovshin, S.E. und Keen, C.L. (2002) Mineral metabolism in male cyclists during high-intensity endurance training. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 12: 63-72

Driessen, C., Hirv, K., Rink, L. und Kirchner, H. (1994) Induction of cytokines by zinc ions in human peripheral blood mononuclear cells and separated monocytes. *Lymphokine Cytokine Res.* 13: 15-20

Driessen, C., Hirv, K., Kirchner, H. und Rink, L. (1995a) Zinc regulates cytokine induction by superantigens and lipopolysaccharide. *Immunology* 84: 272-277

Driessen, C., Hirv, K., Wellinghausen, N., Kirchner, H. und Rink, L. (1995b) Influence of serum on zinc, toxic shock syndrometoxin-1, and lipopolysaccharide-induced production of IFN-gamma and IL-6 beta by human mononuclear cells. *J. Leukoc. Biol.* 57: 904-908

Du, Y., Ni, B., Glinn, M., Dodel, R.C., Bales, K.R., Zhang, Z., Hyslop, P.A. und Paul, S.M. (1997) alpha2-Macroglobulin as a beta-amyloid peptide-binding plasma protein. *J. Neurochem.* 69: 299-305

## **E**

Earnshaw, W.C., Martins, L.M. und Kaufmann, S.H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 383-424

Earp, H.S., Dawson, T.L., Li, X. und Yu, H. (1995) Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signalling paradigm with implications for breast cancer research. *Breast Cancer Res. Treat.* 35: 115-132

Eide, D., Broderius, M., Fett, J. und Guerinot, M.L. (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5624-5628

Eide, D. (2003) Zinc Signals 2003, International Conference, *Abstract*

Enarie, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. und Nagata, S. (1998) A caspase-activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50

Eng, B.H., Guerinot, M.L., Eide, D. und Saier, M.H. (1998) Sequence Analyses and Phylogenetic Characterization of the ZIP Family of Metal Ion Transport Proteins. *J. Membrane Biol.* 166: 1-7

Erdahl, W.L., Chapman, C.J., Wang, E., Taylor, R.W. und Pfeiffer, D.R. (1996) Ionophore 4-BrA23187 Transports  $Zn^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  with High Selectivity Over  $Ca^{2+}$ . *Biochemistry* 35: 13817-13825

Evans, E.H. (1945) Casualties following exposure to zinc chloride smoke. *Lancet II*: 368-370

## F

Fischer, P.W., Giroux, A. und L'Abbe, M.R. (1984) Effect of zinc supplementation on copper status in adult mam. *Am. J. Clin. Nutr.* 40: 743-746

Fischer, E.H. und Davie, E.W. (1998) Recent excitement regarding metallothionein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 3333-3334

Forbes, I.J., Zalewski, P.D., Giannakis, C., Petkoff, H.S. und Cowled, P.A. (1990) Interaction between protein kinase C and regulatory ligand is enhanced by chelatable pool of cellular zinc. *Biochem. Biophys. Acta.* 1053: 113-117

Fraker, P.J., King, L.E., Laakko, T. und Vomer, T.L. (2000) The dynamik link between the integrity of the immune system and zinc status. *J. Nutr.* 130: 1399S-1406S

Freeland-Graves, J.H., Friedman, B.J., Han, W.H., Shorey, R.L. und Young, R. (1982) Effect of zinc supplementation on plasma high-density lipoprotein cholesterol and zinc. *Am. J. Clin. Nutr.* 35: 988-992

Frederickson, C.J., Kasarskis, E.J., Ringo, D. und Frederickson, R.E. (1987) A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying the histochemically reactive zinc in the brain. *J. Neurosci. Meth.* 20: 91-103.

Frederickson, C.J., Hernandez, M.D. und McGinty, J.F. (1989) Translocation of zinc may contribute to seizure-induced death of neurons. *Brain Res.* 480: 317-321

Frederickson, C.J., Suh, S.W., Silva, D., Frederickson, R.E. und Thompson R.B. (2000) Importance of zinc in the central nervous system: The zinc-containing neuron. *J. Nutr.* 130: 1471S-1483S

Frederickson, C.J. und Bush, A.I. (2001) Synaptically released zinc: physiological functions and pathological effects. *Biometals* 14: 353-366

Fukahori, M., Itoh, M., Oomagari, K. Und Kawasaki, H. (1988) Zinc content in discrete hippocampal and amygdaloid areas of the epilepsy (El) mouse and normal mouse. *Brain Res.* 455: 381-384

Fukahori, M. und Itoh, M. (1990) Effects of dietary zinc status on seizure susceptibility and hippocampal zinc content in the El (epilepsy) mouse. *Brain Res.* 529: 16-22

Fukuda, H., Nishida, A., Saito, H., Shimizu, M. und Yamawaki, S. (1994) Imipramine stimulates phospholipase C activity in rat brain. *Neurochem. Int.* 25: 567-571

Furumai, R., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Yoshida, M. und Horinouchi, S. (2001) Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 87-92

## **G**

Gachot, B., Tauc, M., Morat, L. und Poujeol, P. (1991) Zinc uptake by proximal cells isolated from rabbit kidney: effects of cysteine and histidine. *Eur. J. Physiol.* 419: 583-587

Gag, A.K. und Aggarwal, B.B. (2002) Reactive oxygen intermediates in TNF signaling. *Mol. Immunol.* 39: 509-517

Galvani, P., Fumaagalli, P. und Santagostino, A. (1995) Vulnerability of mitochondrial complex I on PC12 cells exposed to manganese. *Eur. J. Pharmacol.* 293: 377-383

Giacconi, R., Cipriano, C., Muzzioli, M., Gasparini, N., Orlando, F. und Mocchegiani, E. (2003) Interrelationships among brain, endocrine and immune response in ageing and successful ageing: role of metallothionein III isoform. *Mech. Age. Devel.* 124: 371-378

Goodwin, J.S., Hunt, W.C., Hooper, P. und Garry P.J. (1985) Relationship between zinc intake, physical activity and blood levels of high density lipoprotein cholesterol in a healthy elderly population. *Metabolism* 34: 519-523

Gore, A., Moran, A., Hershinkel, M. und Sekler, I. (2004) Inhibitory mechanism of Store Operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels by zinc. *J. Biol. Chem.* In press

Green, L.A. und Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1319-1312

Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M.L. and Eide, D. (1998) Identification of a family of zinc transporter genes from Arabidopsis that respond to zinc deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7220-7224

Grummt, F., Weinmann-Dorsch, C., Schneider-Schaulies, J. und Lux, A. (1986) Zinc as a second messenger of mitogenic induction. *Exp. Cell Res.* 163: 191-200

Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L. und Hedige, M.A. (1997) Cloning and characterization of mammalian proton coupled metal ion transporter. *Nature* 388: 482-488

Gutknecht, J. (1981) Inorganic mercury ( $\text{Hg}^{2+}$ ) transport through lipid bilayer membranes. *J. Membr. Biol.* 61: 61-66

## H

Haase, H. (2001) Zinkhomöostase in Säugerzellen: Untersuchungen zur Aufnahme, intrazellulären Verteilung und Toxizität. GCA-Verlag, ISBN 3-89863-024-2

Haase, H. und Beyersmann, D. (1999) Uptake and intracellular distribution of labile and total Zn(II) in C6 rat glioma cells investigated with fluorescent probes and atomic absorption. *Biometals* 12: 247-254

- Haase, H., Wätjen, W. und Beyersmann, D. (2001) Zinc Induces Apoptosis That Can Be Suppressed by Lanthanum in C6 Rat Glioma Cells. *Biol. Chem.* 382:1227-1234
- Haase, H. und Beyersmann, D. (2002) Intracellular zinc distribution and transport in C6 rat glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296: 923-928
- Haase, H. und Maret, W. (2003) Intracellular zinc fluctuations modulate phosphotyrosine phosphatase activity in insulin/insuline-like growth factor-1 signaling. *Exp. Cell. Res.* 291: 289-298
- Hackel, P.O., Zwick, E., Prenzel, N. und Ullrich, A. (1999) Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 184-189
- Hackman, R.M. und Keen, C.L. (1986) Changes in serum zinc and copper levels after zinc supplementation in training and non-training men. In: Katch, F. ed Sport, health and nutrition: 1984 Olympic Scientific Congress proceedings. Champaign, IL: Human Kinetics Press 2: 89-99
- Hamilton, K. (1994) Down's syndrome: selenium supplementation and trace elements. *CP Currents* 4: 46
- Hanas, J.S., Hazuda, D.J., Bogenhagen, D.F., Wu, F.Y.H. und Wu, C.W. (1983) Xenopus transcription factor A requires zinc for binding to the 5S gene. *J. Biol. Chem.* 259: 14120-14125
- Haralambie, G. (1981) Serum zinc in athletes in training. *Int. J. Sports Med.* 2: 135-138
- Helmbrecht, K. (1997) Die konstitutive und stressinduzierte Expression der Stressproteine HSC70 und HSP70 bei der Proliferation und Differenzierung von Ratten-C6-Gliomazellen. Doktorarbeit, Universität Bremen.
- Hempelmann, R.G., Seebeck, J., Kruse, M.L., Ziegler, A. und Mehdorn, H.M. (2001) Role of potassium channels in the relaxation induced by the nitric oxide (NO) donor DEA/NO in the isolated rat basilar artery. *Neurosci. Lett.* 313: 21-24
- Hershinkel, M., Moran, A., Grossman, N. und Sekler, I. (2001) A zinc-sensing receptor triggers the release of intracellular  $Ca^{2+}$  and regulates ion transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11749-11754

- Hetland, O., Brubak, E.A., Refsum, H.E. und Stromme, S.B. (1975) Serum and erythrocyte zinc concentrations after prolonged heavy exercise. In: Howard, H. und Poortmanns, J.R. eds. *Metabolic adaptation to prolonged physical exercise*. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag: 367-370
- Hjortsø, E., Qvist, J., Bud, M.I., Thomsen, J.L., Andersen, J.B., Wiberg-Jørgensen, F., Jensen, N.K., Jones, R., Reid, L.M. und Zapol, M.M. (1988) ARDS after accidental inhalation of zinc chloride smoke. *Intensive Care Med* 14: 17-24
- Ho, E. and Ames, B.N. (2002) Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFκB, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 16770-16775
- Holzberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Geloën, A., Even, P.C., Cervera, P. und Le Bouc, Y. (2003) IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421: 182-187
- Hooper, P.L., Visconti, L., Garry, P.J. und Johnson, G.E. (1980) Zinc lowers high density lipoprotein cholesterol levels. *JAMA* 244: 1960-1961
- Hori, N., Galeno, T. und Carpenter, D.O. (1987) Responses of pyriform cortex neurons to excitatory amino acids: voltage dependence, conductance changes, and effects of divalent cations. *Cell Mol. Neurobiol.* 7: 73-90
- Howell, G.A., Welch, M.G. und Frederickson, C.J. (1984) Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices. *Nature* 308: 736-738
- Huang, X., Atwood, C.S., Moir, R.D., Hartshorn, M.A., Vonsattel, J.P., Tanzi, R.E. und Bush, A.I. (1997a) Zinc-induced Alzheimer's Aβ<sub>1-40</sub> aggregation is mediated by conformational factors. *J. Biol. Chem.* 272: 26464-26470
- Huang, L. und Gitschier, J. (1997b) A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse. *Nat. Genet.* 17: 292-297
- Huang, X., Cuajungco, M.P., Atwood, C.S., Moir, R.D., Tanzi, R.E. und Bush, A.I. (2000) Alzheimer's Disease, β-Amyloid Protein and Zinc. *J. Nutr.* 130: 1488S-1492S

Hubbard, S.R., Bishop, W.R., Kirschmeier, P., George, S.J. and Hendrickson, W.A. (1991) Identification and characterization of zinc binding sites in protein kinase C. *Science* 254: 1776-1779.

## I

Isaacson, A. und Sandow, A. (1978) Effects of zinc on response of skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 46: 655-677

Itoh, M. und Ebadi, M. (1982) The selective inhibition of hippocampal glutamic acid decarboxylase in zinc-induced epileptic seizures. *Neurochem. Res.* 7: 1287-1298

## J

Jacke, K., Witte, K., Huser, L., Behrends, S. und Lemmer, B. (2000) Contribution of the renin-angiotensin system to subsensitivity of soluble guanylyl cyclase in TGR(mREN2)27 rats. *Euro. J. Pharmacol.* 403: 27-35

Jacob, R.A., Sandstead, H.H., Munoz, J.M., Klevay, L.M. und Milne, D.B. (1981) Whole-body surface loss of trace elements in normal males. *Am. J. Clin. Nutr.* 34: 1379-1383

Jacob, C., Maret, W. und Vallee, B.L. (1998) Control of zinc transfer between thionein, metallothionein and zinc proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 3489-3494

Jansen S., Arning, J. und Beyersmann, D. (2003) Effects of the Ca Ionophore A23187 on Zinc-induced Apoptosis in C6 Glioma Cells. *Biol. Trace Elem. Res.* 96: 133-142

Jansen S., Arning J., Kemken, D., Dülcks, T. und Beyersmann, D. (2004a) Phospholipase C activator 2,4,6-trimethyl-N-(meta-3-trifluoromethyl-phenyl)-benzene-sulfonamide decays under ultraviolet light and shows strong self-fluorescence. *Anal. Biochem.* 330: 353-355

Jansen S., Arning J., Dülcks, T. und Beyersmann, D. (2004b) S-nitrosocompounds interfere with zinc probing by Zinquin. *Anal. Biochem.* 332: 145-152

Jansen S., Arning J., und Beyersmann, D. (2004c) Zinc homeostasis in C6 glioma cells: phospholipase C activity regulates cellular zinc export. *Biometals.* Zur Publikation eingereicht



Jiang, L.J., Maret, W. und Vallee, B.L. (1998) The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 3483-3488

Jiang, L.J., Vasák, M., Vallee, B.L. and Maret, W. (2000) Zinc transfers potentials of the and clusters of metallothionein are affected by domain interactions in the whole molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 2503-2508

## K

Kadrobova, J., Madaric, A., Sustrova, M. und Ginter, E. (1996) Changed serum element profile in Down's syndrome. *Biol. Trace Elem. Res.* 54: 201-206

Kambe, T., Narita, H., Yamaguchi, I.Y., Hirose, J., Amano, T., Sugiura, N., Sasaki, R., Mori, K., Iwanaga, T. und Nagao, M. (2002) Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic beta cells. *J. Biol. Chem.* 277: 19049-19055

Karlson, J., Damiant, R. und Saltin, B. (1968) Lactic dehydrogenase activity in muscle after prolonged exercise in man. *J. Appl. Physiol.* 25: 88-91

Kawanabe, Y., Hashimoto, N. und Masaki, T. (2003) Molecular mechanisms for the activation of Ca<sup>2+</sup>-permeable nonselective cation channels by endothelin-1 in C6 glioma cells. *Biochem. Pharmacol.* 65: 1435-1439

Keilin, D. und Mann, T. (1940) Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. *Biochem. J.* 34: 1163-1176

Kim, Y.H., Kim, E.Y. Gwag, B.J., Sohn, S. und Koh, J.Y. (1999a) Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: Mediation by free radicals. *Neurosci.* 89: 175-182

Kim, E.Y., Koh, J.Y., Kim, Y.H., Sohn, S., Joe, E. und Gwag, B.J. (1999b) Zn<sup>2+</sup> entry produces oxidative neuronal necrosis in cortical cell culture. *Eur. J. Neurosci.* 11: 327-334

Kim, E.Y., Chang, S.Y., Chung, J.M., Ryu, B.R., Joo, C.K., Moon, H.S., Kang, K., Yoon, S.H., Han, P.L. und Gwag, B.J. (2001) Attenuation of Zn<sup>2+</sup> Neurotoxicity by Aspirin: Role of N-type Ca<sup>2+</sup> Channel and the Carboxyl Acid Group. *Neurobiol. Disease* 8: 774-783

Kirschke, C.P. und Huang, L. (2003) ZnT7, a novel mammalian zinc transporter, accumulates zinc in the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 278: 4096-4102

Kiziaki, H., Tadakuma, T., Okada, C., Muramatsu, J. Und Ishimura, Y. (1989) Activation of a suicide process of thymocytes through DNA fragmentation by calcium ionophores and phorbol ester. *J. Immunol.* 143: 1790-1794

Klaassen, C.D., Liu, J.L. und Choudhuri, S. (1999) Metallothionein: An Intracellular Protein to Protect Against Cadmium Toxicity. *Annu. Rev. Toxicol.* 39: 267-294

Koh, J.Y., Suh, S.W., Gwag, B.J., He, Y.Y., Hsu, C.Y. und Choi, D.W. (1996) The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science* 272: 1013-1016

Krauss, G. (2003) *Biochemistry of signal transduction.* Wiley-VCH Verlag.

Kröncke, K.D., Fehsel, K., Schmidt, T., Zenke, F.T., Dastling, I., Wesener, J.R., Bettermann, H., Breunig, K.D. und Kolb-Bachofen, V. (1994) Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of zinc finger-type yeast transcription activator LAC9. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 200: 1105-1110

Kröncke, K.D. und Kolb-Bachofen, V. (1999) Measurement of nitric oxide-mediated effects on zinc homeostasis and zinc-finger transcription factors. *Meth. Enzymol.* 301: 126-135

Krotkiewski, M., Gudmundsson, M., Backstrom, P. und Mandroukas, K. (1982) Zinc and muscle strength and endurance. *Acta. Physiol. Scand.* 116: 309-11

## L

Lander, E.S. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921

Lattard, V., Longin-Sauvageon, C., Lachuer, J., Delatour, P. und Benoit, E. (2002) Cloning, sequencing, and tissue-dependent expression of flavin-containing monooxygenase (FMO) 1 and FMO3 in the dog. *Drug Metab. Dispos.* 30: 119-128

Lee, J.Y., Cole, T.B., Palmiter, R.D., Suh, S.W. und Koh, J.Y. (2002) Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 7705-7710

- Lee, S.S., Kennedy, S., Tolonen, A.C. und Ruvkun G. (2003) DAF-16 target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism. *Science* 300: 644-647
- Liang, L., Fu, K., Lee, D.K., Sobieski, R.J., Dalton, T. und Andrews G.K. (1996) Activation of the complete mouse metallothionein gene locus in the maternal deciduum. *Mol. Reprod. Dev.* 43: 25-37
- Liu, S.T., Howlett, G. und Barrow, C.J. (1999) Histidine-13 is a crucial residue in the zinc ion-induced aggregation of the A beta peptide of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 38: 9373-9378
- Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. und Kroemer, G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441-446
- Lopez, I., Mak, E.C., Ding, J., Hamm, H.E. und Iomasey, J.W. (2001) A novel bifunctional phospholipase C that is regulated by Galpha 12 and stimulates the Ras/mitpgeen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 276: 2758-2765
- Lovell, M.A., Robertson, J.D., Teesdale, W.J., Campbell, J.L. und Markesbery, W.R. (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J. Neurol. Sci.* 158: 47-52
- Lovell, M.A., Xie, C. und Markesbery, W.R. (1999) Protection against amyloid beta peptide toxicity by zinc. *Brain Res.* 823: 88-95
- Lucas, M. (2000) The role of C-type protein kinases in apoptosis. In: *Handbook of Experimental Pharmacology: Apoptosis and its modulation by drugs*. Herausgeber: Cameron, R.G. und Feuer, G., Springer Verlag, Berlin, 142: 109-126
- Luhr, O.R., Antonson, K., Karlsson, M., Aardal, S., Thorsteinsson, A., Forstell, C.G., Bonde, J. und die ARF study group (1999) Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark and Iceland. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1849-1861
- Lukaski, H.C., Bolonchuk, W.W., Klevay, L.M., Milne, D.B. und Sandstead, H.H. (1984) Changes in plasma zinc content after exercise in men fed a low-zinc diet. *Am. J. Physiol.* 247: E88-E93

Lukaski, H.C., Hoverson, B.S., Gallagher, S.K. und Bolonchuk, W.W. (1990) Physical Training and copper, iron, and zinc status of swimmers. *Am. J. Clin. Nutr.* 51: 1093-1099

Lukaski, H.C. (2000) Magnesium, zinc, and chromium nutriture and physical activity. *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 585S-593S

## M

Macaulay, M.B. und Mant, A.K. (1964) Smoke-bomb poisoning. A fatal case following the inhalation of zinc chloride smoke. *J Roy Army Med Corps* 110: 27-32

Mahadev, K., Zilbering, A., Zhu, L. und Goldstein, B.J. (2001) Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. *J. Biol. Chem.* 276: 21938-21924

Mahadevan, I.B., Kimber, M.C., Lincoln, S.F., Tiekink, E.R.T., Ward, A.D., Betts, W.H., Forbes, I.J. und Zalewski, P.D. (1996) The synthesis of Zinquin ester and Zinquin acid, zinc(II)-specific fluorescing agents for use in the study of biological zinc(II). *Aust. J. Chem.* 49: 561-568

Malík, R., Vlasicová, K. und Sedo, A. (2002) Functional Cross-talk of Ca<sup>2+</sup>-Mobilization Endothelin Receptors in C6 Glioma Cells. *Physiol. Res.* 51: 73-78

Marienfeld, U., Walter, U. und Simm, A. (2001) Inhibition of rat cardiac fibroblast growth by cAMP – but not by cGMP-dependent protein kinase. *Basic Res. Cardiol.* 96: 184-191

Maret, W. (1994) Oxidative metal release from metallothionein via zinc-thiol/disulfide interchange. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 237-241

Maret, W. und Vallee, B.L. (1998) Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 3478-82

Maret, W., Jacob, C., Vallee, B.L. und Fischer, E.H. (1999) Inhibitory sites in enzymes: Zinc removal and reactivation by thionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1936-1940

Maret, W. (2000) The function of zinc metallothionein: A link between cellular zinc and redox state. *J. Nutr.* 130: 1455S-1458S

Maret, W. (2001) Crosstalk of the group IIa and IIb metals calcium and zinc in cellular signalling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 12325-12327

- Maret, W. (2003) Cellular Zinc and Redox States Converge in the Metallothionein/Thionein Pair. *J. Nutr.* 133: 1460S-1462S
- Margoshes, M. und Vallee, B.L. (1957) A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 79: 4813-4814
- Martell, A.E. und Smith, R.M. (1974) Critical stability constants. Vol.5, Amino Acids, Plenum Press, New York, pp. 21 und 47.
- Masters, B.A., Quaife, C.J., Erickson, J.C., Kelly, E.J., Froelick, G.J., Zambrowicz, B.P., Brinster, R.L. und Palmiter, R.D. (1994) Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *J. Neurosci.* 14: 5844-5857
- Matkovich, S.J. und Woodcock, E.A. (2000) Ca<sup>2+</sup>-activated but not G protein-mediated inositol phosphate responses in rat neonatal cardiomyocytes involve inositol 1,4,5-trisphosphate generation. *J. Biol. Chem.* 275: 10845-10850
- McConkey, D.J., Hartzell, P., Jondal, M. und Orrenius, S. (1989) Inhibition of DNA fragmentation in thymocytes and isolated thymocyte nuclei by agents that stimulate protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 264: 13399-13402
- McDonald, R. und Keen, C.L. (1988) Iron, zinc and magnesium nutrition and athletic performance. *Sports Med.* 5: 171-184
- McMahon, R.J. und Cousins, R.J. (1998) Mammalian zinc transporters. *J. Nutr.* 128: 667-70.
- Miyamura, J.B., McNutt, S.W. und Wenkam, N.S. (1987) Altered zinc status of soldiers under field conditions. *J. Am. Diet Assoc.* 87: 395-397
- Mocchegiani, E., Muzzioli, M. und Giacconi, R. (2000) Zinc, metallothioneins, immune response, survival and aging. *Biogerontology* 1: 133-143
- Mocchegiani, E., Giacconi, R., Cipriano, C., Muzzioli, M., Fattoretti, P., Bertoni-Freddari, C., Isani, G., Zambenedetti, P. und Zatta, P. (2001) Zinc-bound metallothioneins as potential biological markers of aging. *Brain Res. Bul.* 55: 147-153
- Moir, R.D., Atwood, C.S., Romano, D.M., Laurans, M.H., Huang, X., Bush, A.I., Smith, J.D. und Tanzi, R.E. (1999) Differential effects of apolipoprotein E isoforms on metal-induced aggregation of A beta using physiological concentrations. *Biochemistry* 38: 4595-4603

Morelli, S., Buitrago, C., Boland, R. und de Boland, A.R. (2001) The stimulation of MAP kinase by 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> in skeletal muscle cells is mediated by protein kinase C and calcium. *Mol. Cell. Endocrin.* 173: 41-52

Motzkus, D., Maronde, E., Grunenberg, U., Lee, C.C., Forssmann, W.G. und Albrecht, U. (2000) The human PER1 gene is transcriptionally regulated by multiple signaling pathways. *FEBS Let.* 486: 315-319

Mueller, E.J. und Seger, D.L. (1985) Metal fume fever – a review. *J Emerg Med* 2: 271-274

Mundie, T.G. und Hare, B. (2001) Effects of resistance exercise on plasma, erythrocyte, and urine Zn. *Biol. Trace Elem. Res.* 79: 23-28

Musgrave, I.F., Genieser, H.G., Maronde, E. und Seifert, R. (1993) Preparations of Rp-cyclic adenosine 3',5'-phosphorothioate (Rp-cAMPS) can contain biologically active amounts of adenosine. *FEBS* 3: 227-230

Myoshi, I., Kagaya, A., Kohchi, C., Morinobu, S. und Yamawaki, S. (2001) Characterization of 5-HT<sub>2A</sub> receptor desensitisation and the effect of cycloheximide on it in C6 cells. *J. Neural. Transm.* 108: 249-260

## N

Nagata, S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* 256: 12-18

Nakajima, Y., Uchiyama, M., Shirai, Y., Sakuma, Y. und Kato, M. (2000) Acetylcholine increases intracellular Ca<sup>2+</sup> in the rat pituitary folliculostellate cells in primary culture. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280: E608-E615

Napolitano, G., Plaka, G., Grimaldi, S., Giuliani, C., Laglia, G., Calabrese, G., Satta, M.A., Neri, G. und Monaco, F. (1990) Growth delay in Down syndrome and zinc sulphate supplementation. *Amer. J. Med. Genet.* S7: 63

Nasir, M.S., Fahrni, C.J., Suhy, D.A., Kolodsick, K.J., Singer, C.P. und O'Halloran, T.V. (1999) The chemical cell biology of zinc: structure and intracellular fluorescence of a zinc-quinolinesulfonamide complex. *J. Biol. Inorg. Chem.* 4: 775-783

National Research Council (1989) Recommended dietary allowances. 10<sup>th</sup> ed. Washington, DC: National Academy Press USA.

Nebot, V.S., Andón, B. und Barbosa, J. (2003) Characterization of metallothionein isoforms from rabbit liver by liquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 796: 379-393

Neldner, K.H. und Hambidge, K.M. (1975) Zinc therapy of acrodermatitis enteropathica. *N. Engl. J. Med.* 292: 879-882

## O

Oberleas, D., Muhrer, M.E. und O'Dell, B.L. (1966) Dietary metal-complexing agents and zinc availability in the rat. *J. Nutr.* 90: 56-62

O'Dell, B.L. (2000) Role of Zinc in Plasma Membrane Function. *J. Nutr.* 130: 1432S-1436S

Ohana, E., Segal, D., Palty, R., That, D.T., Moran, A., Sensi, S.L., Weiss, J.H., Hershfinkel, M. und Sekler, I. (2003) A Sodium/Zinc Exchange Mechanism is Mediating Extrusion of Zinc in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* In press

Ohkuma, S. und Katsura, M. (2001) Nitric oxide and peroxynitrite as factors to stimulate neurotransmitter release in the CNS. *Progress in Neurobiology* 64: 97-108

## P

Palmer, T.M. und Stiles, G.L. (1999) Stimulation of  $A_{2A}$  adenosine receptor phosphorylation by protein kinase C activation: evidence for regulation by multiple protein kinase C isoforms. *Biochemistry* 38: 14833-14842

Palmiter, R.D. und Findley, S.D. (1995) Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J.* 14: 639-649

Palmiter, R.D., Cole, T.B. und Findley, S.D. (1996a) ZnT-2 a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration. *EMBO J.* 15: 1784-91.

Palmiter, R.D., Cole, T.B., Quaipe, C.J. und Findley, S.D. (1996b) ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14934-14939

Papula, L. (1997) *Mathematik für Ingenieure und Naturwissenschaftler Band 3. 2.Auflage*, Vieweg Verlag Braunschweig/Wiesbaden, Deutschland ISBN: 3-528-14937X.

- Paramanatham, R., Sit, K.H. und Bay, B.H. (1997) Adding Zn<sup>2+</sup> induces DNA fragmentation and cell condensation in cultured human Cxhang liver cells. *Biol. Trace Elem. Res.* 58: 135-147
- Parker, K.K., Norenberg, M.D. und Vernadakis, A. (1980) „Transdifferentiation“ of C6 glial cells in culture. *Science* 208: 179-181
- Pattison, S.E., Telles, S., Friar, S., Stowell, C. und Beckley, R. (1998) Zinc diffusion through lipid bilayers. *Arch. Biochem. Biophys.* 351: 41-46
- Peake, J.M., Gerrard, D.F. und Griffin, J.F. (2003) Plasma zinc and immune markers in runners in response to a moderate increase in training volume. *Int. J. Sport Med.* 24(3): 212-216
- Pearce, L.L., Gandley, R.E., Han, W., Wasserloos, K., Stitt, M., Kanai, A.J., McLaughlin, M.K., Pitt, B.R. und Levitan, E.S. (2000) Role of metallothionein in nitric oxide signalling as revealed by a green fluorescent fusion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 477-482
- Peters, S., Koh, J. und Choi, D.W. (1987) Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons. *Science* 236: 589-593
- Perry, D.K., Smyth, M.J., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Duriez, P., Pirier, G.G. und Hannun, Y.A. (1997) Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease caspase-3: A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272: 18530-18533
- Petrie, L., Chesters, J.K. und Franklin, M. (1991) Inhibition of myoblast differentiation by lack of zinc. *Biochem J.* 276: 109-111
- Poon, H.F., Calabrese, V., Scapagnini, G. und Butterfield, D.A. (2004) Free radicals: key to brain aging and heme oxygenase as a cellular response to oxidative stress. *J. Gerontol.* 5: 478-493
- Potocnik, F.C.V., Van Rensburg, S.J., Taljaard, J.J.F. und Emsley, R.A. (1997) Zinc and platelet membrane microviscosity in Alzheimer's disease. The in vivo effect of zinc on platelets membranes and cognition. *S. Afr. Med. J.* 87: 1116-1119
- Powell, S.R. (2000) The antioxidant properties of zinc. *J. Nutr.* 130: 1447S-1454S
- Purice, M., Maximillan, C., Dumitru, I. und Ioan, D. (1988) Zinc and copper in plasma and erythrocytes of Down's syndrome children. *Endocrinologie* 26: 113-117



**Q**

Quaife, C.J., Findley, S.D., Erickson, J.C., Froelick, G.J., Kelly, E.J., Zambrowicz, B.P. und Palmiter, R.D. (1994) Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* 33: 7250-7259

**R**

Raff, M. (1998) Cell suicide for beginners. *Nature* 396: 119-122

Raulin, J. (1869) Etudes cliniques sur la vegetation. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.* 11: 93-229

Rawal, S.B., Singh, M.V., Tyagi, A.K., Roy, J., Dimiri, G.P. und Selvamurthy, W. (1999) Effects of time exposure to high altitude on zinc and copper concentrations in human plasma. *Aviat. Space Environ. Med.* 70: 1161-1165

Reyes, J.G. (1996) Zinc transport in mammalian cells. *Am J. Physiol.* 270: C401-C410

Richardson, J.H. und Drake, P.D. (1979) The effects of zinc on fatigue of striated muscle. *J Sports Med. Phys. Fitness* 19: 133-134

Rink, L. und Gabriel, P. (2000) Zinc and the immune system. *Proc. Nutr. Soc.* 59: 541-552

Rink, L. und Gabriel, P. (2001) Extracellular and immunological actions of zinc. *Biometals* 14: 367-83

Rodriguez, T.I., Pinilla, G.E., Maynar, M.M., Garcia-Monco, C.R.M. und Sanchez, M.A. (1996) Evaluation of the influence of physical activity on the plasma concentrations of several trace metals. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 73: 299-303

Rogers, E., Eide, D. und Guerinot, M.L. (2000) Altered selectivity in an Arabidopsis metal transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 12356-12360

**S**

Samet, J.M., Dewar, B.J., Wu, W. und Graves, L.M. (2003) Mechanisms for Zn<sup>2+</sup>-induced signal initiation through the epidermal growth factor receptor. *Toxicol. App. Pharmacol.* 191: 86-93.

- Sato, K., Ishikawa, K., Ui, M. und Okajima, F. (1999) Shingosine 1-phosphate induces expression of early growth response-1 and fibroblast growth factor-2 through mechanism involving extracellular signal-regulated kinase in astroglial cells. *Mol. Brain Res.* 74: 182-189
- Schmidt, C. und Beyersmann, D. (1999) Transient peaks in zinc and metallothionein levels during differentiation of 3T3L1 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 364: 91-98
- Sekler, I. (2003) Zinc Signals 2003, International Conference, *Abstract*
- Sensi, S.L., Canzoniero, L.M.T., Yu, S.P., Ying, H.S., Koh, J.Y., Kerchner, G.A. und Choi, D.W. (1997) Measurement of intracellular free zinc in living cortical neurons : Routes of entry. *J. Neurosci.* 17: 9554-9564
- Sensi, S.L., Yin, H.Z., Carreido, S.G., Rao, S.S. und Weiss, J.H. (1999a) Preferential Zn<sup>2+</sup> flux through Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA/kainate channels triggers prolonged mitochondrial superoxide production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2414-2419
- Sensi, S.L., Yin, H.Z. und Weiss, J.H. (1999b) Glutamate triggers preferential Zn<sup>2+</sup> flux through Ca<sup>2+</sup> permeable AMPA channels and consequent ROS production. *Neuroreport* 10: 1723-1727
- Sensi, S.L., That, D.T., Sullivan, P.G., Jonas, E.A., Gee, K.R., Kaczmarek, L.K. und Weiss, J.H. (2003) Modulation of mitochondrial function by endogenous Zn<sup>2+</sup> pools. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 6157-6162
- Seve, M. (2003) Zinc Signals 2003, International Conference, *Abstract*
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J. und Swindlehurst, C. (1992) Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359: 268-269
- Sheline, C.T., Behrens, M.M. und Choi, D.W. (2000) Zinc-induced cortical neuronal death: Contribution of energy failure attributable to loss of NAD<sup>+</sup> and inhibition of glycolysis. *J. Neurosci.* 20: 3139-3146
- Sherman, A.R. (1992) Zinc, copper and iron nutrition and immunity. *J. Nutr.* 122: 604-609
- Sinet, P.M. (1982) Metabolism of oxygen derivatives in Down's syndrome. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 185: 83-94

Singh, A., Smoak, B.L., Patterson, K.Y., LeMay, L.G., Veillon, C. und Deuster, P.A. (1991) Biochemical indices of selected trace elements in men: effect of stress. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 126-131

Singh, A., Papanicolaou, D.A., Lawrence, L.L., Howell, E.A., Chrousos, G.P. und Deuster (1999) Neuroendocrine responses to running in women after zinc and vitamin E supplementation. *Med. Sci. Sports Exerc.* 31: 536-542

Slamon, N.D. und Pentreath, V.W. (2000) Antioxidant defense against antidepressants in C and 1321N1 cells. *Chem. Biol. Interact.* 127: 181-199

Spahl, D.U., Berendji-Grün, D., Suschek, C.V., Kolb-Bachofen, V. und Kröncke, K.D. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 13952-13957

Stabile, A., Pesaresi, M.A., Stabile, A.M., Pastore, M., Sopo, S.M., Ricci, R., Celestini, E. und Segni, G. (1991) Immunodeficiency and plasma zinc levels in children with Down's syndrome. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 58: 207-216

Stamler, J.S. (1994) Redox signalling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78: 931-936

Su, W., Tseng, L.L., Lin, M.C., Chang, H.J., Lee, K.C., Chou, K.J., Lo, Y.K., Cheng, J.S., Chang, H.T., Wang, J.L., Liu, C.P., Chen, W.C. und Jan, C.R. (2002) Effect of nordihydroguaiaretic acid on intracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations in C6 glioma cells. *Neurochem. Int.* 40: 249-254

Suhy, D.A., Simon, K.D., Linzer, D.I.H. und O'Halloran, T.V. (1999) Metallothionein is part of a zinc-scarvenging mechanism for cell survival under conditions of extreme zinc deprivation. *J. Biol. Chem.* 274: 9183-9192

Sundermann, F.W. (1995) The influence of zinc on apoptosis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 25: 134-142

Szerdahelyi, P. und Kasa, P. (1984) Histochemistry of zinc and copper. *Int. Rev. Cytol.* 89: 1-33

## T

Tang, X. und Shay, N.F. (2001) Zinc has an insulin-like effect on glucose transport mediated by phosphoinositol-3-kinase and Akt in 3T3-L1 fibroblasts and adipocytes. *J. Nutr.* 131: 1414-1420.

- Takeda, A., Tamano, H., Enomoto, S. und Oku, N. (2001) Zinc-65 imaging of rat brain tumors. *Cancer Res.* 61: 5065-5069
- Tatar M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M.P., Yin, C.M. und Garofalo, R.S. (2001) A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* 292: 107-110
- Taylor, A. (1996) Detection and monitoring of disorders of essential elements. *Ann. Clin. Biochem.* 33: 486-510
- Taylor, A. (1997) Measurements of zinc in clinical samples. *Ann. Clin. Biochem.* 34: 142-150
- Thiel, R.J. und Fowkes, S.W. (2004) Down syndrome and epilepsy: a nutritional connection? *Med. Hypo.* 62: 35-44
- Thornberry, N.A. und Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316
- Trump, B.F. und Berezsky, I.K. (1995a) Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J.* 9: 219-228
- Trump, B.F. und Berezsky, I.K. (1995b) Calcium, cell death, and tumor promotion. *Prog. Clin. Biol. Res.* 391: 121-31
- Truong-Tran, A.Q., Ho, L.H., Chai, F. und Zalewski, P.D. (2000) Cellular zinc fluxes and the regulation of apoptosis/gene-directed cell death. *J. Nutr.* 130: 1459S-1466S
- Tsujikawa, K., Imai, K., Katatani, M., Kajmori, Y., Mimura, T., Fukuyama, R. und Shimizu, N. (1991) Localization of metallothionein in nuclei of growing primary cultured adult rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 283: 239-242
- Tsujimoto, Y. und Shimizu, S. (2000) Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett.* 466: 6-10
- Turan, B., Fliss, H. und Desilets, M. (1997) Oxidants increase intracellular free Zn<sup>2+</sup> concentration in rabbit ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* 272: H2095-H2106

**U**

Uchida, Y., Takio, K., Titani, K., Ihara, Y. und Tomonaga, M. (1991) The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* 7: 337-347

**V**

Vallee, B.L. und Falchuk, K.H. (1993) The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev.* 73: 79-118

Van den Hammer, C.J.A., Hoogeraad, T.U. und Klompjan, E.R.K. (1984) Persistence of the antagonistic influence of zinc on copper absorption after cessation of zinc supplementation for more than five days. *Biol. Trace Elem. Res.* 1: 99-106

Van der Zaal, B.J., Neuteboom, L.W., Pinas, J.E., Chardonens, A.N., Schat, H., Verkleij, J.A.C. und Hooykaas, P.J.J. (1999) Overexpression of a novel arabidopsis gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiol.* 119: 1047-1055

Van Rij, A.M., Hall, M.T., Dohm, G.L., Bray, J. und Poiries, W.J. (1986) Changes in zinc metabolism following exercise in human subjects. *Biol. Trace Elem. Res.* 10: 99-106

Vaughan, D.W. und Peters, A. (1981) The structure of neuritic plaque in the cerebral cortex of aged rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 40: 472-87

Verhaeg, G.W., Parat, M.O., Richard, M.J. und Hainaut, P. (1998) Modulation of p53 protein conformation and DNA-binding activity by intracellular chelation of zinc. *Mol. Carcinog.* 21: 205-214

**W**

Wang, J.P., Chang, L.C., Huang, L.J. und Kuo, S.C. (2001) Inhibition of extracellular Ca<sup>2+</sup> entry by YC-1, an activator of soluble guanylyl cyclase, through a cyclic GMP-independent pathway in rat neutrophils. *Biochem. Pharmacol.* 62: 679-684

Weiss, J.H., Hartley, D.M., Koh, J. und Choi, D.W. (1993) AMPA receptor activation potentiates zinc neurotoxicity. *Neuron* 10: 43-49

- Wellinghausen, N., Fischer, A., Kirchner, H. und Rink L. (1996a) Interaction of zinc ions with human peripheral blood mononuclear cells. *Cell Immunol.* 171: 255-61
- Wellinghausen, N., Schromm, A.B., Seydel, U., Brandenburg, K., Luhm, J., Kirchner, H. und Rink L. (1996b) Zinc enhances lipopolysaccharide-induced monokine secretion by alteration of fluidity state of lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 157: 3139-45
- Wellinghausen, N., Driessen, C., Rink, L. (1996c) Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells by zinc and related cations. *Cytokine.* 8: 767-71
- Wellinghausen, N., Martin, M. und Rink, L. (1997) Zinc inhibits interleukin-1-dependent T cell stimulation. *Eur. J. Immunol.* 27: 2529-2535
- Wellinghausen, N. und Rink, L. (1998) The significance of zinc for leukocyte biology. *J. Leukoc. Biol.* 64: 571-577
- Wellinghausen, N., Kern, W.V., Jochle, W. und Kern, P. (2000) Zinc Serum level in human immunodeficiency virus-infected patients in relation to immunological status. *Biol. Trace Elem. Res.* 73: 139-149
- Wells, A. (1999) EGF Receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31: 637-643
- Westbrook, G.L. und Mayer, M.L. (1987) Micromolar concentrations of  $Zn^{2+}$  antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. *Nature* 328: 640-643.
- Wu, Q., Coffey, L.L. und Reith, M.E. (1997) Cations affect [3H]mazindol and [3H]WIN 35,428 binding the human dopamine transporter in a similar fashion. *J. Neurochem.* 69: 1106-1118
- Wu, W., Graves, L.M., Jaspers, I., Devlin, R.B., Reed, W. und Samet, J.M. (1999) Activation of the EGF receptor signaling pathway in human airway epithelial cells exposed to metals. *Am. J. Physiol.* 277: L924-L931
- Wu, W., Graves, L.M., Gill, G.N., Parsons, S.J. und Samet, J.M. (2002) Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on tyrosine 845 is required for zinc-induced Ras activation. *J. Biol. Chem.* 277: 24525-24257
- Wyllie, A.H. (1998) An endonuclease at least. *Nature* 391: 10-21

**Y**

Yan, L., Patel, K.N., Zhang, Q., Scholz, P.M. und Weiss, H.R. (2001) Interaction between cyclic GMP protein kinase and cyclic AMP may be diminished in stunned cardiac myocytes. *European J. Pharmacol.* 426: 11-19

Yokoyama, M., Koh, J. und Choi, D.W. (1986) Brief exposure to zinc is toxic to cortical neurons. *Neurosci. Lett.* 71: 351-355

Yu, W.H., Lukiw, W.J., Bergeron, C., Niznik, H.B. und Fraser, P.E. (2001) Metallothionein III is reduced in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 894: 37-45

**Z**

Zalewski, P.D., Forbes, I.J. und Betts, W.H. (1993) Correlation of apoptosis with change in intracellular labile Zn(II) using Zinquin [(2-methyl-8-p-toluenesulphonamido-6-quinolyloxy) acetic acid], a new specific fluorescent probe for Zn(II). *Biochem. J.* 296: 403-408

Zatta, P., Lucchini, R., van Rensburg, S.J. und Taylor, A. (2003) The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese, and zinc. *Brain Res. Bull.* 62: 15-28

Zeng, J., Heuchel, R., Schaffner, W. und Kägi, J.H.R. (1991) Thionein (apometallothionein) can modulate DNA binding and transcription activation by zinc finger containing factor Sp 1. *FEBS Lett.* 279: 310-312

Zhao, H. und Eide, D. (1996a) The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2454-2458

Zhao, H. und Eide, D. (1996b) The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271: 23203-23210

---

## 7. Eigene Publikationen

Jansen S., Arning, J. und Beyersmann, D. (2003) Effects of the Ca Ionophore A23187 on Zinc-induced Apoptosis in C6 Glioma Cells. *Biol. Trace Elem. Res.* 96: 133-142

Jansen S., Arning J., Kemken, D., Dülcks, T. und Beyersmann, D. (2004a) Phospholipase C activator 2,4,6-trimethyl-N-(meta-3-trifluoromethyl-phenyl)-benzene-sulfonamide decays under ultraviolet light and shows strong self-fluorescence. *Anal. Biochem.* 330: 353-355

Jansen S., Arning J., Dülcks, T. und Beyersmann, D. (2004b) S-nitrosocompounds interfere with zinc probing by Zinquin. *Anal. Biochem.* 332: 145-152

Jansen S., Arning J., und Beyersmann, D. (2004c) Zinc homeostasis in C6 glioma cells: phospholipase C activity regulates cellular zinc export. *Biometals*. Zur Publikation eingereicht



---

## 8. Kongressbeiträge

Jansen, S., Arning, J. und Beyersmann, D. (2003) L-Cysteine competes for zinc from Zinquin-zinc-complex. ZincSignals03 International Conference, Grand Cayman Island, BWI.

Jansen, S., Arning, J. und Beyersmann, D. (2003) Zinc uptake and zinc-induced apoptosis: modulation by signal transduction. ZincSignals03 International Conference, Grand Cayman Island, BWI.

Jansen, S. (2003) Effects of Ca-ionophore A23187 on Zn<sup>2+</sup>-induced apoptosis in C6 glioma cells. „Second Circular“-Kongress für Biochemische Pharmakologie und Toxikologie, Schloss Reisenburg, Günzburg/Ulm.

Jansen, S. und Beyersmann, D. (2002) Effects of signal transduction modulators on cellular zinc uptake. Mosbacher Kolloquium, Mosbach/Baden.

---

## 9. Curriculum vitae

- 01.10.2001 – 30.09.2004     **Doktorand/Promotion** an der Universität Bremen im Institut für Biochemie - Center for Biomolecular Interactions Bremen
- 01.10.1997 – 30.09.2001     **Biologiestudium** an der Universität Bremen  
Abschluss: Diplom Biologe mit der Note 1.0
- 01.10.1995 – 30.09.1997     **Dienst als Sportsoldat** in der Sportfördergruppe der Bundeswehr in Eckernförde
- 01.07.1995 – 30.09.1995     **Grundwehrdienst** in der Marineversorgungsschule in List/Sylt
- 15.08.1992 – 30.06.1995     Besuch der **gymnasialen Oberstufe** im *Gymnasium an der Hamburger Straße* in Bremen  
Abschluss: Abitur mit der Note 2.2
- 01.07.1991 – 31.07.1992     Besuch der **Dobyns-Bennett High School** in Kingsport/Tennessee, USA
- 01.08.1985 – 30.06.1991     Besuch des *Gymnasiums an der Julius Brecht Allee* in Bremen
- 15.08.1981 – 30.07.1985     Besuch der **Grundschule An der Gete** in Bremen

---

## **10. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Zuhilfenahme unerlaubter Hilfsmittel erarbeitet habe.

---

Bremen, den 20.09.2004

One of my favourite sayings I got off a soda bottle: NO DEPOSIT, NO RETURN. To me that means that you'll get out of life about what you're willing to put in. All champions have overcome great sacrifices to win their victories. So when someone comes up and talks to me about their goals and dreams, I simply ask them one question: "What are you willing to do about it?"

John Namer