

**Identifikation und Untersuchung der
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase als
suszeptibles Zielprotein für Peroxynitrit**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

vorgelegt von Darius Peter Buchczyk
aus Ruda
Düsseldorf 2002

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Dr. H. Sies

Korreferent: Prof. Dr. C. P. Hollenberg

Tag der mündlichen Prüfung: 19. November 2002

1	Einleitung	1
1.1	<i>Peroxynitrit: Entstehung und Wirkung</i>	1
1.2	<i>Pathologische Bedeutung von Peroxynitrit</i>	5
1.3	<i>Schutz vor Peroxynitrit</i>	8
1.4	<i>Ziele der Arbeit</i>	9
2	Material und Methoden	10
2.1	<i>Reagentien</i>	10
2.2	<i>Synthese von Peroxynitrit</i>	10
2.3	<i>Zellkultur</i>	11
2.3.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
2.3.2	<i>Säugerzellen</i>	13
2.4	<i>Probenbehandlung</i>	15
2.4.1	Behandlung von Hefezellen mit Peroxynitrit und H ₂ O ₂	15
2.4.2	Bolusgabe von Peroxynitrit	15
2.4.3	Infusion von Peroxynitrit	15
2.4.4	Behandlung von isolierter GAPDH mit ONOO ⁻	16
2.5	<i>Analytik</i>	17
2.5.1	Messung der GAPDH-Aktivität	17
2.5.2	Bestimmung freier Sulfhydrylgruppen	17
2.5.3	Proteinbestimmung	18
2.5.4	Aggregation von Glutathion-S-Transferase-Huntingtin-Fusionsprotein <i>in vitro</i> (Aggregations-Assay)	18
2.5.5	Fällung von Glutathion-S-Transferase-Huntingtin-Fusionsprotein mit Glutathionsepharose	18
2.5.6	Aggregation von Glutathion-S-Transferase-Huntingtin in Hefezellen	19
2.5.7	Proteolyse isolierter GAPDH	20
2.6	<i>Gelelektrophorese und Immunochemische Methodik</i>	20

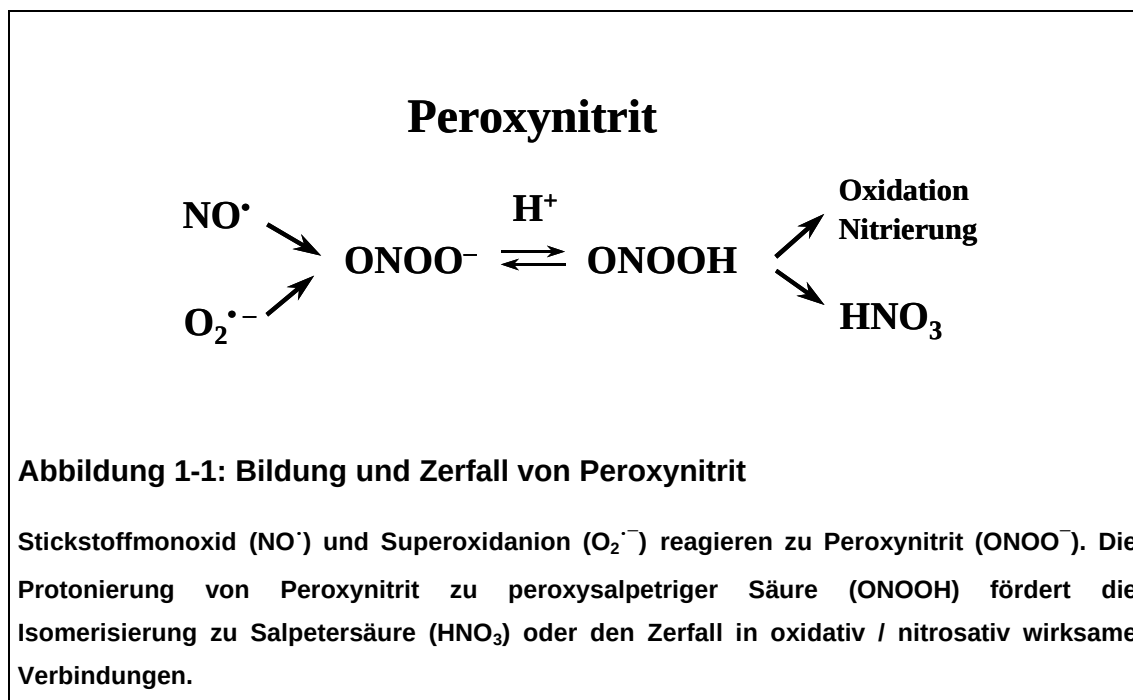
2.6.1	Aufbereitung von Proben	20
2.6.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Elektrotransfer	21
2.6.3	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	22
2.6.4	Dot-Blot	22
2.6.5	Immunanfärbung	23
2.6.6	Entfernen von Antikörpern von der Membran („Strippen“)	23
2.6.7	Immunpräzipitation	23
2.6.8	Quantifizierung von Western Blots	24
3	Ergebnisse	25
3.1	<i>Identifikation eines sensitiven Zielmoleküls für Peroxynitrit in Saccharomyces cerevisiae</i>	25
3.1.1	Peroxynitrit-vermittelte Schädigung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
3.1.2	Proteinumsatz in mit Peroxynitrit behandelten Hefezellen	29
3.1.3	Identifikation eines nitrierten Proteins als Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	34
3.1.4	Einfluss von GAPDH auf die Aggregation von Huntingtin	37
3.2	<i>Untersuchung der Wirkung von Peroxynitrit in Säugerzellen</i>	41
3.2.1	Wirkung von Peroxynitrit auf Rattenastrozyten	42
3.2.2	Untersuchung durch Peroxynitrit vermittelter Effekte nach Ischämie/Reperfusion im Maushirn durch transiente thromboembolische Okklusion der Arteria cerebri media	44
3.3	<i>Analyse durch Peroxynitrit verursachter Schäden an GAPDH</i>	47
3.4	<i>Schutz vor Peroxynitrit</i>	51
4	Diskussion	56
4.1	<i>Vergleich der Stressinduktion durch Peroxynitrit und Wasserstoffperoxid in Hefezellen</i>	56
4.2	<i>Identifikation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als susceptibles Zielprotein für die Wirkung von Peroxynitrit</i>	60

4.3	<i>Einfluß Peroxynitrit-modifizierter GAPDH auf die Aggregation von Huntingtin</i>	62
4.4	<i>Sequenz Peroxynitrit-vermittelter Modifikationen an GAPDH</i>	64
4.5	<i>Schutz vor Peroxynitrit</i>	68
5	Zusammenfassung	70
6	Literatur	71
7	Anhang	82
7.1	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	82
7.2	<i>Danksagung</i>	83
7.3	<i>Eidestättliche Erklärung</i>	84
7.4	<i>Lebenslauf</i>	85
7.5	<i>Publikationen und Präsentationen</i>	86
7.5.1	Artikel	86
7.5.2	Poster-Präsentationen	87
7.5.3	Vorträge (Konferenzen/Symposia)	87

1 Einleitung

1.1 Peroxynitrit: Entstehung und Wirkung

Peroxynitrit (Oxoperoxonitrat (1-) oder ONOO^-) ist eine reaktive Verbindung, die aus dem Superoxidanion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) und Stickstoffmonoxid ($\text{NO}^\bullet$) wie in Abbildung 1-1 dargestellt in einer diffusionslimitierten Reaktion ($k = \sim 7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) entsteht (Huie und Padmaja, 1993). In der deprotonierten Form ist Peroxynitrit relativ stabil und kann bei pH-Werten um 12 bei -80°C über Monate gelagert werden. Durch Protonierung wird das Molekül instabil und isomerisiert zu Nitrat (NO_3^-) oder zerfällt zu hochreaktiven Hydroxylradikal und Stickstoffdioxid (Beckman *et al.*, 1990). Auf diese Weise vermag Peroxynitrit mit jeder Klasse von Biomolekülen zu reagieren (Koppenol *et al.*, 1992). Zur aktuellen Übersicht über die Reaktivität von Peroxynitrit siehe Greenacre und Ischiropoulos (2001) und Radi *et al.* (2001).



Es wird angenommen, dass ONOO^- in biologischen Systemen vor allem intravasal unter Beteiligung von Phagozyten und endothelialen Zellen, die Radikale wie das Superoxidradikal und Stickstoffmonoxid freisetzen, entsteht (Beckman *et al.*,

1994b). Die Entstehung ist insbesondere durch einen Anstieg der Stickstoffmonoxid-Konzentration begünstigt (Koppenol, 1998), denn unter diesen Umständen erhöht die hohe NO-Konzentration die Wahrscheinlichkeit einer Reaktion von $\text{NO}^\bullet$ mit $\text{O}_2^{\bullet-}$, bevor die Superoxidradikale durch Superoxiddismutasen zu H_2O_2 dismutiert werden (McCord und Fridovich, 1969). Peroxynitrit vermag Zellmembranen zu passieren (Goss *et al.*, 1999) und mit Nukleinsäuren, Proteinen und Lipiden, auch im Inneren der Zellen, zu reagieren. Der Schädigungsmechanismus von Peroxynitrit ist schematisch in Abbildung 1-2 zusammengefasst. Die Bildung von Peroxynitrit durch körpereigene Zellen ist vorteilhaft im Rahmen der Immunabwehr gegen Mikroorganismen, kann aber auch kollaterale Schäden an Zellen des zu schützenden Organismus verursachen.

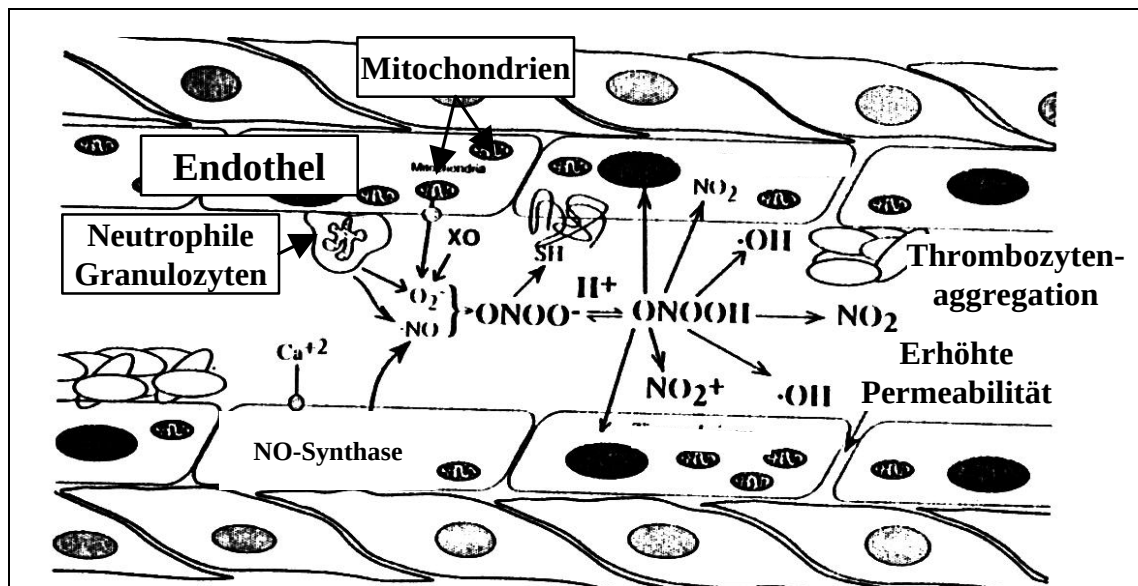


Abbildung 1-2: Intravasale Entstehung und Wirkung von Peroxynitrit (Modifiziert nach Beckman, 1996)

Dargestellt ist der Mechanismus, nach dem Peroxynitrit intravasal aus Superoxidanion (generiert von neutrophilen Granulozyten sowie Mitochondrien endothelialer Zellen) und Stickstoffmonoxid (synthetisiert von endothelialer NO-Synthase und neutrophilen Granulozyten) entsteht, zu reaktiven Produkten zerfällt und das umgebende Gewebe schädigt. Es kommt zu Oxidation von Proteinen, verstärkter Thrombozytenaggregation und Schädigung des Endothels.

Gegen solche Schäden, die insbesondere unter inflammatorischen Bedingungen mit massiver Freisetzung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen entstehen, muß der Organismus geschützt werden. Die Schutzmechanismen lassen sich dabei nach Art der Wirkung in die drei Kategorien der Prävention, der Interzeption und der Reparatur von Schäden einordnen (Arteel *et al.*, 1999). Bei der Prävention wird die Produktion von ONOO^- gesenkt. Das kann zu einen durch eine Senkung der Konzentration an freiem NO durch Hemmung von NO-Synthasen oder durch direktes Abfangen von NO erreicht werden. Die andere Möglichkeit der Prävention ist die Minderung der Konzentration an freiem $\text{O}_2^{\bullet-}$ durch das Zersetzen von $\text{O}_2^{\bullet-}$ durch Superoxiddismutasen (White *et al.*, 1994) oder Inhibition der Produktion von $\text{O}_2^{\bullet-}$ z.B. durch Allopurinol (White *et al.*, 1996). Bei der Interzeption wird Peroxynitrit durch Reaktion mit verschiedenen Schutzfaktoren eliminiert, so dass die Konzentration an Peroxynitrit niedrig gehalten wird. Beispiele für solche Schutzfaktoren sind niedermolekulare Verbindungen, wie CO_2 (Denicola *et al.*, 1996), Ascorbat (Bartlett *et al.*, 1995) oder Ebselen (Masumoto *et al.*, 1996), aber auch Proteine wie Myeloperoxidase (Floris *et al.*, 1993) oder Glutathionperoxidase (Briviba *et al.*, 1998).

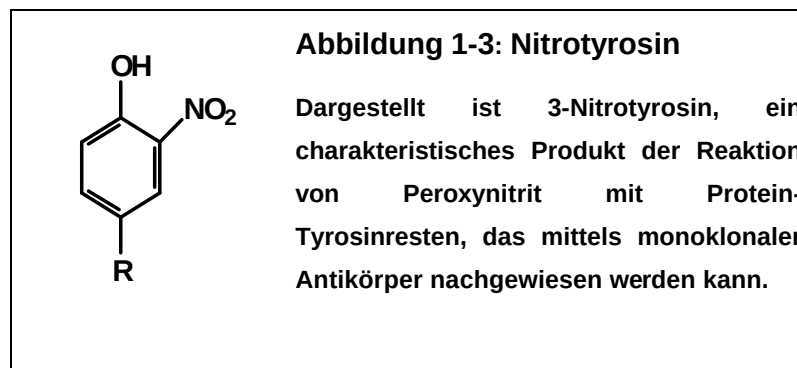
In der dritten Stufe der Protektion vor Peroxynitrit dienen Reparatursysteme der Beseitigung von Schäden an Proteinen (da Silva und Abdalla, 1998; Graham *et al.*, 1993) oder DNA (Epe *et al.*, 1996). Oxidation und Nitrierung von Proteinen durch Peroxynitrit bewirken die partielle oder völlige Denaturierung und damit oft eine massive Einschränkung der Funktionalität von Proteinen. Sind die Schäden nicht zu umfangreich, könnten derart geschädigte Proteine in ihrer Struktur und Funktionalität wieder hergestellt werden. Daran sind molekulare Chaperone beteiligt, eine Klasse von Proteinen, die andere Proteine bei Faltung in die native Konformation unterstützt (zur Übersicht über Chaperone siehe Gething und Sambrook, 1992; Hendrick und Hartl, 1995; Naylor und Hartl, 2001). Chaperone oder Hitzeschockproteine (Hsp), werden konstitutiv exprimiert und sind essentiell für die Synthese von funktionalen Proteinen. Die Expression der Hsp's wird allerdings als Reaktion auf extreme Bedingungen wie Hitze, osmotischen oder oxidativen Streß verstärkt. Auf diese Weise wird naszierenden oder sekundär entfalteten Proteinen auch bei ungünstigen Bedingungen eine Faltung in die native Form ermöglicht. Diese Funktion ist ebenfalls essentiell für die Zelle, denn die nicht vollständig gefalteten Proteine haben eine hohe Affinität, aneinander zu binden und Aggregate zu bilden.

Diese fallen aus, sind nicht mehr abbaubar und potentiell cytotoxisch. Eine Klasse der Chaperone, die Chaperonine, nehmen ungefaltete Proteine in einer zentralen Kavität auf und ermöglichen ihnen so eine ungestörte Faltung. Eine andere Klasse, mit einer Masse von etwa 70 kDa (Hsp70), bindet an freiliegende, hydrophobe Stellen partiell entfalteter Proteine und verhindert, dass diese an andere hydrophobe Partner binden und es dadurch zur Bildung von unlöslichen Aggregaten kommt. In dieser Form werden die Proteine löslich gehalten, bis sie entweder wieder ihre native Konformation einnehmen oder abgebaut werden. Andere Chaperone scheinen sogar eine spezialisierte Funktion gegen oxidativen Stress zu haben. So wird Hsp 33, dessen struktureller Aktivierungsmechanismus kürzlich aufgeklärt werden konnte (Graumann *et al.*, 2001), durch oxidative Bedingungen über Disulfide dimerisiert und dadurch erst aktiviert (Jakob *et al.*, 1999).

Extensiv geschädigte Proteine allerdings können selbst mit Hilfe von molekularen Chaperonen nicht mehr in die native Form überführt werden und müssen abgebaut werden. Der Abbau von Proteinen kann auf zweierlei Arten erfolgen. Zum einen können membranassoziierte Proteine und Zellorganellen über den lysosomalen Weg abgebaut werden (zur Übersicht: Klionsky und Emr, 2000), zum anderen werden Proteine mit Ubiquitin, einem Polypeptid von 76 Aminosäuren, für den Abbau durch das Proteasom, eine multikatalytische Protease, markiert (zur Übersicht siehe Finley und Chau, 1991; Varshavsky *et al.*, 2000). Oxidantien wie Wasserstoffperoxid und Diamid wirken modulierend auf das Ubiquitinierungssystem von Zellen. Über eine Verringerung des Verhältnisses von reduziertem Glutathion (GSH) zu oxidiertem Glutathion (GSSG) wird eine Abnahme der Menge an ubiquitinierten Proteinen bewirkt (Jahngen-Hodge *et al.*, 1997; Obin *et al.*, 1998). Die Ubiquitinierung ist allerdings keine notwendige Voraussetzung für den Abbau durch das Proteasom. Oxidation und Nitrierung von Proteinen durch Peroxynitrit alleine können auch schon deren beschleunigten Abbau zur Folge haben, wobei das 20S-Proteasom für den Abbau ausreichend ist (Davies, 2001). Durch höhere Konzentrationen Peroxynitrits hervorgerufene Modifikationen allerdings bewirken das Gegenteil. Die geschädigten Proteine können nur noch schlechter oder nicht mehr abgebaut werden (Grune *et al.*, 1998; Grune *et al.*, 2001).

Trotz seiner hohen Reaktivität ist Peroxynitrit ein selektiv wirksames Agens: Einige Proteine werden bevorzugt mit ONOO^- modifiziert, so dass schon bei niedrigen Konzentrationen von Peroxynitrit der Schaden für die Zelle erheblich sein

kann. Ein Beispiel ist die Prostacyclin-Synthase, die bei sehr niedrigen Peroxynitritkonzentrationen nitriert und inaktiviert wird (Zou *et al.*, 1997). Diese Selektivität ist nicht nur abhängig von Struktur und Zusammensetzung der betroffenen Proteine – nach außen hin orientierte Tyrosinreste in Nachbarschaft einer negativen Ladung werden stärker durch Peroxynitrit nitriert als andere (Souza *et al.*, 1999) –, auch die intrazelluläre Konzentration und Lokalisation des Zielproteins sowie Interaktionen mit anderen Molekülen haben Einfluß auf die Reaktivität mit ONOO^- . So fördert die Cu/Zn-Superoxid-Dismutase die Schädigung von Neurofilament, das ohne Präsenz des Enzyms weniger suszeptibel für Peroxynitrit ist (Crow *et al.*, 1997). Als spezifischer Marker für die Wirkung von Peroxynitrit wird dabei Nitrierung von Tyrosinresten zu 3-Nitrotyrosin (Abbildung 1-3) angesehen (Ischiropoulos, 1998). Die Tyrosin-Nitrierung von Proteinen ist immunochemisch detektierbar und bietet eine Möglichkeit, Peroxynitrit-sensitive Proteine zu identifizieren.



1.2 Pathologische Bedeutung von Peroxynitrit

Durch ONOO^- geschädigte Proteine wie α -Synuclein, Hauptbestandteil der Lewy-Körperchen bei sporadischem Morbus Parkinson, reichern sich in der Zelle an und neigen dazu, unlösliche Aggregate zu bilden (Paxinou *et al.*, 2001). Ein ähnlicher Mechanismus wird als beteiligter Faktor bei der Pathogenese einer ganzen Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert, für die eine Akkumulation von unlöslichen Proteinen typisch ist wie z.B. Morbus Alzheimer, Chorea Huntington oder Morbus Parkinson (Layfield *et al.*, 2001). Bei diesen Erkrankungen wird eine Beteiligung von Peroxynitrit diskutiert (Beckman *et al.*, 1994a; Torreilles *et al.*, 1999).

Nitrotyrosin, als Marker für die Wirkung von Peroxynitrit (Abbildung 1-3), konnte bei Patienten mit Morbus Alzheimer in fibrillären Aggregaten im Gehirn (Good *et al.*, 1996) und im Liquor nachgewiesen werden (Tohgi *et al.*, 1999a). Andere Beispiele für das vermehrte Vorkommen von Nitrotyrosin sind die amyotrophe Lateralsklerose (Tohgi *et al.*, 1999b), Morbus Parkinson (Giasson *et al.*, 2000; Good *et al.*, 1998) oder Prionerkrankung nach Scrapie-Infektion (Guentchev *et al.*, 2000).

Im Mausmodell für die Chorea Huntington ist ebenfalls 3-Nitrotyrosin gefunden worden, wobei interessanterweise die Krankheitssymptome durch Hemmung der NO-Produktion gemindert werden (Deckel *et al.*, 2000; Deckel *et al.*, 2001), was dafür spricht, dass ONOO^- an der Pathogenese dieser Erkrankung beteiligt ist. Chorea Huntington, auch Morbus Huntington oder Veitstanz, ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung mit 100%iger Penetranz, bei der vor allem GABAerge Ganglienzellen des Nucleus caudatus, Globus pallidus und Putamens geschädigt werden. Die Folge sind schwere motorische, kognitive und emotionale Störungen und letztlich der Tod. Ein genetisches Merkmal der Patienten ist das Auftreten von zahlreichen Trinukleotidwiederholungen im Exon 1 des Huntingtin-Gens auf dem kurzen Arm von Chromosom 4. Diese Basentriplett-Wiederholungen, CAG, werden auf Proteinebene als Polyglutaminbereiche translatiert und sind ab einer Länge von ca. 40 Glutaminen Auslöser der Erkrankung. Die Schwere des Krankheitsverlaufs und die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung in jungen Jahren nehmen mit Länge der Polyglutaminwiederholungen zu (Quinn und Schrag, 1998). Gemeinhin wird angenommen, dass mit der Länge dieser Polyglutaminbereiche die Neigung von Huntingtin, Aggregate zu bilden, die vor allem im Zellkern abgelagert werden, zunimmt. Die Akkumulation dieser Aggregate korreliert auf bis jetzt nicht vollständig verstandene Weise mit der Pathogenese der Erkrankung. Neben Huntingtin werden auch zahlreiche andere Proteine in diesen Aggregaten gefunden. Beispiele sind das Huntingtin-assoziierte Protein HAP-1 (Li *et al.*, 1995) oder das Huntingtin-interagierende Protein HIP-1 (Kalchman *et al.*, 1997; Wanker *et al.*, 1997). Daneben wird auch, die im Rahmen dieser Arbeit als susceptibles Zielprotein für Peroxynitrit identifizierte GAPDH, von Huntingtin gebunden (Burke *et al.*, 1996; Mazzola und Sirover, 2001).

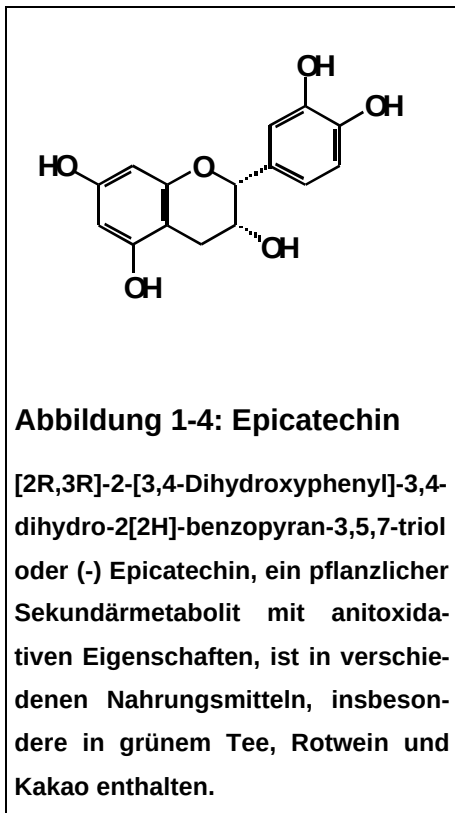
Ob HAP-1, HIP-1 oder andere Proteine einen wesentlichen Einfluß auf die Aggregation von Huntingtin haben ist bislang aber weitgehend ungeklärt. Ebenfalls unklar ist, ob Oxidation und/oder Nitrierung des Huntingtins oder eines Huntingtin-

bindenden Proteins diesen Prozeß beeinflussen. Ein Protein, das sensitiver gegen Peroxynitrit ist als andere und auch eine hohe Affinität zu Huntingtin hat, könnte zur Klärung dieser Frage und letztlich zum Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankung beitragen.

Ein weiterer pathologischer Prozeß, bei dem ONOO^- von Bedeutung ist, ist die Ischämie gefolgt von Reperfusion, wie sie beispielsweise im ZNS bei Schlaganfällen vorkommt. Wie bei inflammatorischen Prozessen werden bei der Reperfusion massiv Sauerstoffradikale wie das Superoxidanion freigesetzt, die nicht mehr ausreichend durch Superoxiddismutase entgiftet werden können und in verstärktem Ausmaß mit NO reagieren. Dabei wird ONOO^- in großen Mengen generiert (Samdani *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1997). Neben der Nitrierung von Tyrosinresten kommt es auch zu Oxidationen (Ischiropoulos *et al.*, 1995; Souza und Radi, 1998) und Oligomerisierungen von Proteinen. Ein Beispiel für eine solche Oligomerisierung tritt bei der Mn-Superoxiddismutase auf (Macmillan-Crow und Thompson, 1999), einem Enzym, dessen Funktion Schutz vor reaktiven Sauerstoffverbindungen, insbesondere Superoxidradikalen, ist.

Die durch Peroxynitrit verursachten Modifikationen können Proteine damit auf unterschiedliche Weise schädigen. Proteine, die sich durch eine erhöhte Suszeptibilität gegen ONOO^- auszeichnen, stellen Schwachstellen bei oxidativen/nitrosativen Belastungen dar. Die Kenntnis ihrer Identität ist ein Ansatzpunkt zum Verständnis und somit zur Therapie dieser Erkrankungen. Schutz dieser vulnerablen Punkte durch Supplementation exogener Schutzfaktoren oder die Verstärkung endogener Schutzsysteme vermögen, das Ausmaß Peroxynitrit-vermittelter Schäden bei diesen Erkrankungen zu mindern.

1.3 Schutz vor Peroxynitrit



Peroxynitrit-vermittelte Schäden an Proteinen können verhindert werden, wenn Substanzen präsent sind, die mit NO oder O_2^- reagieren und so die Entstehung von ONOO^- verhindern oder ONOO^- selbst abfangen. Niedermolekulare Verbindungen wie Polyphenole, die mit der Nahrung aufgenommen werden können, sind dabei für eine therapeutische Verwendung von besonderem Interesse.

Polyphenole werden zumindest zum Teil für das „französische Paradoxon“ verantwortlich gemacht, das die niedrige kardiovaskuläre Mortalität, trotz eines hohen Anteils gesättigter Fettsäuren am Nahrungsfett, bei mediterranen Populationen beschreibt. Als

protektiver Faktor wird der dort übliche höhere Konsum von Rotwein gesehen, über den hohe Dosen an Polyphenolen, darunter auch Epicatechin, aufgenommen werden (Formica und Regelson, 1995). Das Flavanol Epicatechin (Abbildung 1-4) und seine Oligomere, kommen in hohen Konzentrationen daneben auch in kakaoreichen Schokoladen und grünem Tee vor (Scalbert und Williamson, 2000). Epicatechin wird nach Aufnahme mit der Nahrung im Darm resorbiert (Carbonaro *et al.*, 2001) und steht dann systemisch als Schutzsubstanz zur Verfügung.

Solche Flavonoide können im Sinne einer Prävention nach Arteel *et al.* (1999) sowohl mit Stickstoffmonoxid (van Acker *et al.*, 1995) als auch mit Superoxidradikalen reagieren (Robak und Gryglewski, 1988) oder im Sinne einer Interzeption direkt mit ONOO^- reagieren (Haenen *et al.*, 1997; Pannala *et al.*, 1997). Insbesondere können Epicatechin und seine Oligomere effizient Peroxynitrit-vermittelte Oxidationen und Nitrierungen verhindern (Arteel *et al.*, 2000; Arteel und Sies, 1999). Obwohl Epicatechin für eine Reihe von pathologischen Prozessen als präventiv wirksame Substanz angesehen wird, ist der Mechanismus seiner protektiven Wirkung weitgehend ungeklärt.

1.4 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein sensitives Zielprotein für die Wirkung von Peroxynitrit anhand der Peroxynitrit-spezifischen Nitrierung von Tyrosinresten gesucht. Dabei wurde zunächst die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* als Modell eukaryontischer Zellen verwendet. Ein Protein, das in stärkerem Maße als andere nitriert wurde, wurde identifiziert. Von diesem Protein war bekannt, dass es eine hohe Affinität für Huntingtin hatte. Der Einfluß der Suszeptibilität des Proteins gegen Peroxynitrit sollte in Hinsicht auf einen Einfluß auf die Aggregation von rekombinant in Hefezellen exprimierten Huntingtin untersucht werden. Die Kinetik des Aggregationsprozesses sowie die Bindung des identifizierten Zielproteins an Huntingtin nach Behandlung der Zellen mit Peroxynitrit wurde analysiert.

Ferner wurden Untersuchungen in komplexeren Modellen durchgeführt, die die hohe Sensitivität des identifizierten Proteins bestätigen sollten: Kultivierte Säugerzellen wurden niedrigen Fließgleichgewichtskonzentrationen synthetisch hergestellten Peroxynitrits ausgesetzt. Diese Proben sowie Maushirne mit Ischämie/Reperfusionsschäden nach Apoplex wurden auf Spuren der Wirkung von Peroxynitrit untersucht.

Die untersuchten Modelle unterscheiden sich beträchtlich in den verwendeten bzw. auftretenden Peroxynitritkonzentrationen. Weil zu erwarten war, dass Peroxynitrit das Zielprotein in Abhängigkeit von der Konzentration auf verschiedene Art schädigt, wurde mit dem isolierten Säugerprotein untersucht in welchen Konzentrationsbereichen bestimmte Modifikationen sowie eine funktionelle Inaktivierung des Proteins auftreten. Als sensitiver Parameter für die pathologische Relevanz einer Modifikation des identifizierten Zielproteins durch Peroxynitrit wurde darüber hinaus die Suszeptibilität des Peroxynitrit-behandelten Proteins für das 20S-Proteasom untersucht.

Die gewonnen Erkenntnisse wurden für die Analyse der protektiven Wirkung von Epicatechin verwendet. Das identifizierte Protein wurde, nach Charakterisierung des Schädigungsmusters durch Peroxynitrit, zur Klärung der Frage eingesetzt, ob die protektive Wirkung des Epicatechins über die Minderung der Oxidation oder Nitrierung vermittelt wird.

2 Material und Methoden

2.1 Reagentien

Die verwendeten Substanzen wurden, falls nicht anders angegeben, von Sigma (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Die verwendeten Lösungen wurden mit Reinstwasser, auf einer Milli-Q Anlage (Millipore, Eschborn) aufbereitet. Die benutzten Primärantikörper wurden wie im folgenden angegeben bezogen. Sekundärantikörper stammten von Sigma (Deisenhofen) und ICN (Costa Mesa, CA, USA). Das verwendete Epicatechin stammt aus grünem Tee und wurde von Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.2 Synthese von Peroxynitrit

Es wurde für alle Lösungen ddH₂O verwendet. Peroxynitrit wurde nach dem Protokoll von Koppenol und Mitarbeitern synthetisiert (Koppenol *et al.*, 1996). Kurz wurden je 125 mL NaNO₂ (0,6 M) und saure H₂O₂-Lösung (2,4 % (v/v) H₂O₂, 2,6 % (v/v) HCl) mittels Peristaltikpumpen (Fluß: 34 mL /min) unter schnellem Rühren in 250 mL NaOH-Lösung mit MnO₂ infundiert. Dabei wurden NaNO₂ und die H₂O₂-Lösung unmittelbar vor Einlauf in die NaOH-Lösung mit einem T-förmigen Schlauchstück vereinigt. Nach Synthese wurden die Ansätze mind. 30 min bei 4°C gerührt, um überschüssiges H₂O₂ zu entfernen bis keine Blasenbildung mehr erfolgte. Anschließend erfolgte Abtrennung des MnO₂ durch Filtration und Lagerung bei –80°C. Lösungen höherer Konzentration wurden durch Ausfrieren hergestellt. Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Extinktionsbestimmung bei 302 nm ($\epsilon_{302} = 1670 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Die gewünschte Konzentration wurde durch Verdünnung mit KOH-Lösung (0,2 % (w/v)) eingestellt.

2.3 Zellkultur

2.3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Anzucht der Hefezellen erfolgte in Flüssigmedien oder auf festen Nährböden bei 30°C. Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien war:

Vollmedium (YEPD): 1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Pepton, 2 % (w/v) Glucose (w/v). Synthetisches Minimalmedium (SM): 0,67 % (w/v) Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, 2 % (w/v) Glucose, Adenin, Histidin, Tryptophan, Uracil, Lysin, Methionin und Leucin (je 50 µg /mL vor dem Autoklavieren). Feste Nährböden enthielten zusätzlich 2 % (w/v) Agar. Zur Selektion wurde die entsprechende Aminosäure oder Base dem Medium nicht zugesetzt.

Die Transformation wurde nach der Lithiumacetat-Methode durchgeführt (Ito *et al.*, 1983). 10 mL einer exponentiell wachsenden Kultur wurden bei einer OD₆₀₀ von 0,4-0,8 abzentrifugiert, die Zellen einmal in H₂O gewaschen, in 200 µL 0,1 M LiOAc in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA) resuspendiert und für 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde 1µg Plasmid-DNA und 10 µL denaturierte Heringssperma-DNA (10 mg/mL; 5 min bei 95°C, dann 5 min bei 4°C inkubiert) zugegeben und erneut 30 min bei 30°C inkubiert. Nach Zugabe von 1,5 mL 40 % (w/v) PEG4000 in 0,1 M LiOAc in TE und 45 min Inkubation bei 30°C erfolgte über 5 min ein Hitzeschock bei 42 °C. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert, in 200 µL H₂O aufgenommen und auf Selektionsmedien plattiert.

Alle verwendeten Plasmide wurden freundlicherweise von Prof. Hartl (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt. YEp105 leitet sich von YEp96 ab (Ecker *et al.*, 1987) und ist ein *TRP1*-markiertes 2µ-Plasmid, welches c-Myc-Epitop markiertes Ubiquitin unter *CUP1*-Promotor-Kontrolle exprimiert (Hochstrasser *et al.*, 1991). Die Expression von Yep105 wurde durch Zugabe von CuSO₄ (100 µM) zum jeweiligen Medium induziert. Zur Herstellung von YEp-105-HD53Q wurde Exon 1 des menschlichen htt-Gens, kodierend für einen 53 Glutamine langen Polyglutaminbereich, in YEp105 kloniert (Muchowski *et al.*, 2000). Das Glutathion-S-Transferase Expressionskonstrukt pGEX-HD53Q leitet sich von YEp105-HD53Q ab (Muchowski *et al.*, 2000).

2.3.1.1 Herstellung von Zelllysaten aus *S. cerevisiae*

Die Zellen wurden nach Behandlung abzentrifugiert, in 10 mM NaN_3 gewaschen und in 100 μL Lysispuffer (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4 mit 10 mM NaN_3 und je 1 $\mu\text{g/mL}$ Aprotinin und Leupeptin; 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid) resuspendiert. Glasperlen (0,45 mm Durchmesser) wurden bis zum Flüssigkeitsspiegel zugegeben und die Zellen wurden für 3 min bei 4 °C auf einem Vibrax bei maximaler Leistung aufgeschlossen. Alternativ wurden die Proben zum Aufschluß 3 x 20 s bei maximaler Leistung gevortext und zwischenzeitlich auf Eis gehalten. Die Extrakte wurden dann mit 100 μL Lysispuffer versetzt, gevortext und 5 min bei 14 000 Upm zentrifugiert und zur Messung freier Thiole (2.5.2), der Proteinkonzentration (2.5.3) oder der GAPDH-Aktivität (2.5.1) verwendet oder zur Western Blot-Analyse eingesetzt (2.6).

2.3.1.2 Viabilität von Hefezellen

Etwa 10^8 Zellen (2 OD_{600}) aus exponentiell wachsenden Kulturen wurden nach Behandlung mit ONOO^- abzentrifugiert, in PBS gewaschen und in 1 mL PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen seriell in 1:10-Schritten bis 1:100 000 verdünnt. 100 μL wurden jeweils auf YEPD plattiert und die Zellen wurden für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, die zu Kolonien herangewachsen waren, ausgezählt. Als Kontrolle diente die Behandlung mit zerfallenem ONOO^- .

2.3.1.3 Quantitativer Paarungs-Assay

Etwa 10^7 Zellen (0,2 OD_{600}) des Paarungstyps $\text{MAT}\alpha$ (DBY2058) aus exponentiell wachsenden Kulturen wurden nach Behandlung mit Peroxynitrit, mit der gleichen Anzahl exponentiell wachsenden Zellen des Paarungstyps MATa (JD52: *ura3-52 his3-d200 leu2-3, 112 trp1-d63 lys2-801*) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt, 2 min bei 5000 Upm zentrifugiert, mit frischem YEPD-Medium überschichtet und erneut abzentrifugiert. Nach 4 h Inkubation bei 30°C wurden die Proben gevortext, abzentrifugiert, in SM-Medium ohne Glucose gewaschen und in 1 mL des gleichen Mediums resuspendiert. Anschließend wurden

die Proben in 1:10-Verdünnungsschritten seriell bis 1:100 000 verdünnt, ausplattiert und für 3 d bei 30°C inkubiert. Auf SM^{+ura}-Platten konnten nur Zygoten wachsen, auf SM^{+ura+his}-Platten Zygoten und ungepaarte α -Zellen. Die Paarungsaktivität wurde als Zygoten / (Zygoten + α -Zellen) angegeben.

2.3.1.4 Wachstumskurven von Hefezellen

Die Zellen wurden nach Behandlung mit YEPD gewaschen, auf eine Dichte von etwa $1,5 \times 10^7$ Zellen / mL (0,3 OD₆₀₀) in YEPD angeimpft und bei 30°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Zunahme der Zelldichte wurde durch photometrische Messung bei 600 nm bestimmt, Proben wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen und zur Analyse aufbereitet (2.3.1.1).

2.3.2 Säugerzellen

Junge primäre Rattenastrozyten wurden von der Gruppe um Prof. Dr. Müller (Arbeitsgruppe Neurochemie, Universität Düsseldorf) bezogen und in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM, Sigma, München) unter Zusatz von hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS, 10 % (v/v); Biochrom/Seromed, Berlin und Greiner, Frickenhausen), L-Glutamin (2 mM), Streptomycin (20 mg/l) und Penicillin (20000 IU/l) kultiviert. Die Zellen wurden in 600 mL-Kulturflaschen in 30 mL Medium gehalten und etwa 7 Tage nach Aussäen bei etwa 80% - 100% Konfluenz, trypsinisiert und gesplittet. Zur Behandlung wurden die Zellen auf Deckel von 35 mm-Kulturschalen ausplattiert, die mit 0,01 % (w/v) Kollagen (Sigma, Deisenhofen) vorbehandelt waren und in 60 mm Kulturschalen herangezogen. Für Gefrierkulturen wurden 1-2 Mio Zellen in 1 mL Gefriermedium (90% (v/v) FCS, 10% (v/v) DMSO) suspendiert, eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Das Kultivieren eingefrorener Zellen erfolgte nach Auftauen in 250 mL-Kulturflaschen. Werden Astrozyten in einer 600 mL-Flasche (175 cm² Wachstumsfläche) zur Konfluenz herangezogen, trypsinisiert und gezählt, so gelangt man zu einer Gesamtzahl von etwa 6×10^6 Zellen je Flasche; das entspricht einer Wachstumsdichte von ca. 34000 Zellen/cm². Die Wachstumsflächen weiterer verwendeter Kulturschalen und -flaschen sind nach Angaben des Herstellers (Greiner, Frickenhausen) 75 cm² für eine 250 mL-Flasche,

58 cm² für eine 9 cm-Platte (9,4 cm Durchmesser), 21 cm² für eine 6 cm-Platte (6 cm Durchmesser) und 8,7 cm² für eine 3 cm-Platte (3,5 cm Durchmesser).

WB-F344 Rattenleberepithelzellen wurden von Dr. I.A. Cotgreave und Dr. L. Wärngård, Institut für Umweltmedizin, Karolinska Institut (Stockholm, Schweden), bezogen und wie oben beschrieben kultiviert. Aorta-Endothelzellen der Maus, freundlicherweise von Professor Kolb-Bachhofen (Immunologische Arbeitsgruppe der Hautklinik im BMFZ, Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt, wurden gleichermaßen kultiviert. Abweichend wurde RMPI-1640-Medium (Sigma, Deisenhofen) statt DMEM und 20 % statt 10 % (v/v) FCS verwendet. WB-F344 wurden freundlicherweise von Prof. I.A. Cotgreave (Institut für Umweltmedizin, Karolinska Institut, Stockholm, Schweden) zur Verfügung gestellt.

2.3.2.1 Viabilität von Säugerzellen (MTT-Assay)

Vitale Zellen vermögen MTT (3-[4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) mittels mitochondrialer und mikrosomaler Dehydrogenaseaktivität (Levitz und Diamond, 1985) in das entsprechende blaue, schwerlösliche Formazan umzuwandeln. Zur Messung der Vitalität wurden Zellen in 35 mm Kulturschalen bis zur Konfluenz herangezogen, entsprechend behandelt, nach 24 h gewaschen und mit 800 µL 0,5 mg/mL MTT (in ascorbatfreiem Medium) für etwa 2 h im Brutschrank inkubiert. Als Negativkontrolle diente MTT-Lösung in Medium. Bei ausreichender Blaufärbung wurde durch Zusatz von 800 µL Lysislösung (0,1 % (w/v) HCl; 10 % (w/v) SDS) die Reaktion gestoppt und die Zellen lysiert. Die Ansätze wurden im Brutschrank inkubiert, bis ausgefallenes Formazan in Lösung gegangen war. Schließlich wurde die Extinktion bei 560 nm gemessen und zum Ausgleich von durch Präzipitate entstehender Absorption die Extinktion bei 690 nm abgezogen. Bei Messung von Zellen, die in anderen Kulturgefäßen herangezogen und behandelt worden waren, wurde das Volumen der MTT-Lösung und der Lysislösung entsprechend angepaßt.

2.4 Probenbehandlung

2.4.1 Behandlung von Hefezellen mit Peroxynitrit und H₂O₂

Exponentiell wachsende Hefezellen (OD₆₀₀ 0,4-0,8) wurden in Phosphatpuffer (0,4 M K₂HPO₄ / KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen und auf eine Dichte von $2,5 \times 10^7$ Zellen/mL resuspendiert. Peroxynitrit wurde in KOH-Lösung (0,2 % (w/v)) zu Lösungen bis zu 50 mM Peroxynitrit verdünnt und unter konstantem Rühren zu der Hefesuspension gegeben. Die Applikation von Peroxynitrit erfolgte durch Mikroboli (z.B. wurden 145 µL alle 10 s über 3 min zu einem Volumen von 27 mL bis zu einem Endvolumen von 30 mL gegeben). Es wurden dabei kumulative Konzentrationen bis 5 mM Peroxynitrit erreicht. In Experimenten zur Inaktivierung von GAPDH in Hefezellen wurde Peroxynitrit durch eine Mikropumpe (Fluß: 1 mL/min) unter Rühren in eine Hefesuspension infundiert, um ein Fließgleichgewicht von Peroxynitrit aufrecht zu erhalten. Es wurden keine pH-Änderungen durch Zugabe von Peroxynitrit gemessen. Wasserstoffperoxid (Sigma, Deisenhofen) wurde in H₂O verdünnt und zur entsprechenden Endkonzentration ins Medium gegeben.

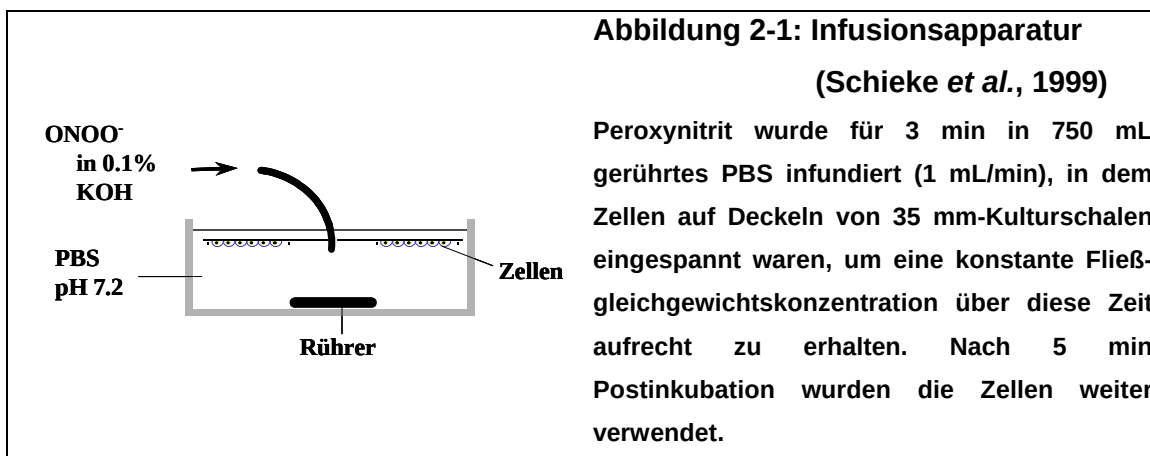
2.4.2 Bolusgabe von Peroxynitrit

Die Zellen wurden in 35 mm-Kulturschalen zur Konfluenz herangezogen, mit PBS gewaschen und dann in 1 mL PSG-Puffer (100 mM Kaliumphosphat pH 7,4, 10 mM NaCl, 5 mM Glucose) mit einem Bolus von 10 µL ONOO⁻ behandelt. Nach 5 min Postinkubation wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und entweder bis zur Messung der Viabilität (2.3.2.1) mit frischem Medium für 24 h bei 37°C inkubiert oder durch Zugabe von 100 µL 2 x Probenpuffer lysiert. Das Lysat wurde im Anschluß kurz (2 s) sonifiziert, um die Viskosität zu mindern und zur Western Blot-Analyse (2.6.2) verwendet.

2.4.3 Infusion von Peroxynitrit

Die Behandlung von kultivierten Säugerzellen erfolgte nach dem Protokoll von Schieke und Mitarbeitern per Infusion (Schieke *et al.*, 1999). Die Zellen wurden auf Deckeln von 35 mm-Kulturschalen zur Konfluenz herangezogen (2.3.2), mit PBS

gewaschen und mit dem Boden nach oben unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche von 750 mL PBS (20°C) in die Infusionsapparatur eingespannt (Abbildung 2-1).



Daraufhin wurde unter mäßig starkem Rühren über 3 min ONOO^- mit einer Flußrate v von 1 mL/min infundiert (Abbildung 2-1). Fließgleichgewichtskonzentrationen wurden dabei nach der folgenden Formel berechnet:

$$[\text{ONOO}^-] = v / K_d$$

Mit der Zerfallskonstante K_d (25°C, pH 7,4) des Peroxynitrits von $0,41 \text{ s}^{-1}$ (Denicola *et al.*, 1996), der Infusion von ONOO^- -Lösung (120 mM) bei einem Fluß von 1 mL/min in 750 mL PBS ($v = 2,67 \text{ } \mu\text{M/s}$) ergab sich eine Fließgleichgewichtskonzentration von $6,5 \text{ } \mu\text{M}$. Nach 5-minütiger Postinkubation unter Rühren wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für Western Blot-Analysen (2.6) oder zur Messung der GAPDH-Aktivität (2.6.1) aufbereitet. Kontrollen wurden folgendermaßen durchgeführt: In PBS wurde wie beschrieben ONOO^- infundiert. Nach mind. 10 min Rühren war das ONOO^- komplett zerfallen und die Zellen wurden für 5 min unter Rühren in diesem Puffer inkubiert. Der pH der Lösung wurde mit pH-Indikator-Stäbchen kontrolliert und stieg dabei nicht über 8.

2.4.4 Behandlung von isolierter GAPDH mit ONOO^-

Isolierte Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel wurde von Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. GAPDH wurde in Kaliumphosphatpuffer mit einem Bolus ONOO^- unter vortexen behandelt. Im Detail wurde in einem 15 mL Einwegreaktionsgefäß mit Spitzboden (Greiner) 1346 μL

Kaliumphosphatpuffer (0,25 M, pH 7,4) mit 554 μL GAPDH-Lösung (1,3 mg/mL in PBS) gemischt. Dazu wurden unter vortexen 100 μL ONOO⁻ als Bolus gegeben. Es gab keine messbare pH-Änderung. Die Proben wurden 30 s weiter gevortext, 5 min postinkubiert und dann für Western Blot-Analysen verwendet (2.6) oder bei -20°C gelagert und für Proteolyse-Assays verwendet (2.5.7). Aliquots wurden für die fluorometrische Bestimmung von Dityrosin verwendet. Die Proben wurden dabei mit dem gleichen Volumen Tris-Puffer (0,4 M, pH 9) versetzt und die Fluoreszenz wurde gemessen (Excitation 325 nm / Emission 410 nm).

2.5 Analytik

2.5.1 Messung der GAPDH-Aktivität

Es wurde nach dem Protokoll von Souza und Mitarbeitern (Souza und Radi, 1998) vorgegangen. Zum Testpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,5; 10 mM Natriumarsenat; 0,1 mM DTPA; 1 mM NAD⁺) wurde Zelllysatz zugegeben und die Reaktion wurde durch Zugabe von Glycerinaldehyd-3-Phosphat (Endkonzentration 1 mM) gestartet. Die enzymatische Aktivität wurde anhand der Reduktion von NAD⁺ zu NADH anhand der Steigung der Extinktionszunahme bei 340 nm ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) in den ersten 30 s der Reaktion berechnet.

2.5.2 Bestimmung freier Sulfhydrylgruppen

Thiolgruppen wurden nach der Methode von Ellman in Zelllysaten bestimmt (Boyne und Ellman, 1972). 100 μL Dithionitrobenzoesäure (Sigma, Deisenhofen; 2,2 mM) in Ethanol wurde zu 900 μL Probe gegeben, 20 min bei RT inkubiert und die Extinktion bei 412 nm gemessen ($\epsilon_{412} = 13600 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Die Probe wurde je nach Konzentration gegebenenfalls in PBS vorverdünnt. Der Gehalt an DTNB-reaktiven Verbindungen wurde auf den Proteingehalt der Proben (2.5.3) bezogen.

2.5.3 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen erfolgten unter Einsatz kommerziell erhältlicher Lösungen (BioRad, Protein Assay und DC-Protein Assay) gegen Standards aus Rinderserumalbumin. Überschlagsbestimmungen wurden nach Whitaker und Granum (1980) durch UV-Absorptionsmessungen durchgeführt; Proteinkonzentrationen berechnen sich hierbei nach:

$$\text{Protein (mg/mL)} = (E_{235\text{nm}} - E_{280\text{nm}})/2.51.$$

2.5.4 Aggregation von Glutathion-S-Transferase-Huntingtin-Fusionsprotein *in vitro* (Aggregations-Assay)

Glutathion-S-Transferase-Huntingtin-Fusionsprotein (GST-HD-Fusionsprotein, 3 μM ; aufgereinigte Stammlösung (1,18 mg/mL); von Prof. F. U. Hartl zur Verfügung gestellt) wurde bei 30°C mit 2,5 U PreScission Protease (Amersham, Freiburg) in Aggregations-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0,5 μM Leupeptin, 0,5 μM Pepstatin A) in einem Gesamtvolumen von 20 μL für bis zu 20 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μL SDS-Puffer (4 % (w/v) SDS, 50 mM DTT) und 5 min Inkubation bei 95°C gestoppt. Anschließend wurde die Lösung mit Unterdruck in einer Slot-Blot-Apparatur durch Celluloseacetatfilter (Schleicher und Schuell, Dassel; Porengröße 0,2 μm) filtriert. Monomeres Protein kann diesen Filter passieren, während Proteinaggregate aufgehalten werden. Die Filter wurden mit BSA-Lösung (1 % (w/v) BSA in PBS) für 1 h geblockt. Detektion von Huntingtin erfolgte mit Serum HD730 (Wanker *et al.*, 1999) und ECL-System (Amersham, Freiburg).

2.5.5 Fällung von Glutathion-S-Transferase-Huntingtin-Fusionsprotein mit Glutathionsepharose

Die Fällung mit Glutathionsepharose wurde folgendermaßen durchgeführt: Die Proben (3 μM GST-HD53Q-Fusion, 3 μM GAPDH) wurden in Aggregationspuffer (2.5.4) für 120 min bei 30°C in einem Volumen von 50 μL inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Aggregationspuffer auf 500 μL aufgefüllt und durch Zugabe von 20 μL Glutathion-Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Schweden, 50 % slurry)

gefällt. Die Pellets wurden 1x mit Puffer A (50 mM Tris-HCl; pH 8; 5 mM EDTA; 150 mM NaCl; 0,5 % (w/v) Desoxycholat; 1 % (v/v) Triton X-100); 1x mit Puffer B (Puffer A ohne Desoxycholat) und 2x mit Puffer C (Puffer B ohne Triton X-100) gewaschen, dann für 10 min mit 100 µL Elutionslösung (50 mM Tris-HCl pH 8; 15 mM Glutathion) eluiert. Die Proben (3 µM GST-HD53Q-Fusion; 3 µM GAPDH) wurden in Aggregationspuffer (2.5.4) für 120 min bei 30°C in einem Volumen von 50 µL inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Aggregationspuffer auf 500 µL aufgefüllt. Es wurden 2 µg Anti-GAPDH-Antikörper pro Ansatz verwendet. Die Waschschrte wurden mit Aggregationspuffer durchgeführt.

2.5.6 Aggregation von Glutathion-S-Transferase-Huntingtin in Hefezellen

JN54-Zellen (*MATa*, *his 3-11*, *3-15 leu 2-3*, *2-112 lys 2*, *trp1-D1*, *ura 3-52*), mit Yep105-HD53Q oder Yep96 transfiziert, wurden in SM-Vollmedium (-Trp) bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.35-0.5 herangezogen, und die Expression von Huntingtin wurde durch Zugabe von 400 µM CuSO₄ induziert. Nach 3 h Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen geerntet und mit Peroxynitrit (Mikroboli), wie unter 2.4.1 beschrieben behandelt. Im Anschluß wurden die Zellen auf eine OD₆₀₀ von 0.5 resuspendiert und zu verschiedenen Zeiten wurden nach OD₆₀₀-Messung 10⁹ Zellen (20 OD₆₀₀) entnommen, mit H₂O gewaschen und als Pellet bei -20°C gelagert. Zu den Pellets wurde 200 µL Lysispuffer (50 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 0,5 µM Leupeptin; 0, 5 µM Pepstatin A; 5 % (v/v) Glycerin) gegeben. Glasperlen (0,45 mm Durchmesser) wurden bis zum Flüssigkeitsspiegel zugegeben, und die Zellen wurden für 3 x 20 s bei maximaler Leistung gevortext. Anschließend wurde der Rohextrakt durch 30 min Zentrifugation bei 14 000 Upm in eine lösliche und eine unlösliche Fraktion getrennt. Von den Fraktionen wurde nach Bradford die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 2.5.3). Gleiche Proteinmengen (10 µg) von allen Fraktionen wurden zur Western Blot-Analyse verwendet. Vom Rohextrakt und der unlöslichen Fraktion wurden jeweils 20 µg bzw. 10 µg nach Zugabe von 200 µL 0,1 % (w/v) SDS-Lösung wie unter 2.5.4 beschrieben für den Aggregations-Assay verwendet.

2.5.7 Proteolyse isolierter GAPDH

Die Proteolyseexperimente wurden von der Gruppe um PD. Dr. T. Grune (Charité, Berlin) durchgeführt. Die Proben wurden für 16 h bei 4°C gegen Kaliumphosphatpuffer (5 mM, pH 7,4; 10 mM KCl) dialysiert, wobei der Puffer nach 3 h erneuert wurde. Der Abbau von GAPDH wurde gemessen, indem 200 µg GAPDH mit 7 µg Proteasom in 300 µL Proteolysepuffer (50 mM HEPES pH 7,8; 20 mM KCl; 5 mM MgOAc; 1 mM DTT) für 2 h bei 37°C inkubiert wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines gleichen Volumens Trichloressigsäure gestoppt (Endkonzentration 10 %). Nach Zentrifugation (15 min, 14000 Upm) wurden die Überstände mit HEPES (1M, pH 7,8) neutralisiert und zur Markierung primärer Amine mit Fluorescamin (0,3 mg/mL in Aceton) in einer Endkonzentration von 0,1 mg/mL versetzt, gevortext und fluorimetrisch gemessen (Ex. 390 nm / Em. 470 nm). Leucinlösung wurde dabei zur Erstellung einer Kalibrierungsreihe verwendet. Die Messung wurde um Leerwerte korrigiert:

Fluoreszenz durch Freisetzung primärer Amine = (Fluoreszenz: Substrat + Proteasom) – (Fluoreszenz: Substrat) - (Fluoreszenz: Proteasom)

20S-Proteasom wurde von der Gruppe um PD. Dr. T. Grune präpariert (Grune *et al.*, 1998; Hough *et al.*, 1987) und freundlicherweise bereitgestellt.

2.6 Gelelektrophorese und Immunochemische Methodik

2.6.1 Aufbereitung von Proben

Aufschluß von Hefezellen erfolgte wie unter 2.3.1.1 beschrieben. 200 µL 2 x Probenpuffer (4 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Glycerin; 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,2 % (w/v) Bromphenolblau; 20 mM DTT) wurden hinzugefügt, und die Proben wurden 5 min bei 95°C erhitzt, 5 min bei 13000 Upm abzentrifugiert, und der Überstand wurde sofort zur Western Blot-Analyse verwendet oder bei –20°C gelagert.

Proteinextrakte von behandelten Säugerzellen wurden durch direkte Lyse der Zellen mit 2 x Probenpuffer hergestellt. Für eine 35 mm Kulturschale wurden dabei 100 µL 2 x Probenpuffer verwendet. Sollte vor SDS-PAGE eine Proteinbestimmung durchgeführt werden, wurden die Zellen in 100 µL Lysisbuffer (PBS, pH 7,5; je 1 µg/mL Aprotinin und Leupeptin; 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid)

mit einem Zellschaber abgekratzt, in ein Eppendorfgefäß überführt und durch 3-maliges Einfrieren (-20°C) und Auftauen (20°C) und anschließendes Sonifizieren (20 s, halbmaximale Leistung) lysiert. Nach Proteinbestimmung wurden die Lysate auf die gewünschte Proteinkonzentration mit Lysispuffer eingestellt und mit 2 x Probenpuffer versetzt.

2.6.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Elektrottransfer

Die Zusammensetzung der eingesetzten SDS-Polyacrylamid-Gele erfolgte wie beschrieben (Laemmli, 1970; Towbin *et al.*, 1979):

Trenngel (12 % Acrylamid): 4% (v/v) Sol 1; 2.5% (v/v) Sol 2; 3.5% (v/v) H₂O; 7×10^{-3} % (v/v) APS; 7×10^{-4} % (v/v) N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED). Sammelgel (4% Acrylamid): 1.34% (v/v) Sol 1; 3% (v/v) Sol 3; 5.66% (v/v) H₂O; 7.5×10^{-3} % (v/v) APS; 7.5×10^{-4} % (v/v) TEMED. Zusammensetzung der einzelnen Lösungen: Sol 1: 30 % (w/v) Acrylamid; 0,8 % (w/v) Bisacrylamid; Sol 2: 0,4 % (w/v) SDS; 1,5 M Tris (8 mM EDTA) pH 8.8. Sol 3: 0,4 % (w/v) SDS; 1,5 M Tris (8 mM EDTA) pH 6.8. Elektrodenpuffer: 0,2 M Glycin; 0,1 M Tris; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8.8; APS: 10-12% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat. Nach Elektrophorese wurden die Proteine im Gel entweder angefärbt oder auf eine Membran elektrotransferiert. Zur Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue wurden die Proteine im Gel durch Schwenken in einer Lösung aus 0,1% (w/v) Coomassie Serva Blue R in 10% (v/v) Eisessig; 30-40% (v/v) Methanol oder Ethanol und 50-60 % Wasser für 15-30 min fixiert und angefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Schwenken des Gels in Entfärberlösung (10% (v/v) Eisessig; 30% (v/v) Ethanol oder Methanol) entfernt. Nach Elektrophorese wurde das zu blottende Gel kurz in Transferpuffer (25 mM Tris; 0,2 M Glycin; 20% (v/v) Methanol; pH 8,5) äquibriert und zusammen mit in Gelgröße zurechtgeschnittenen und in Transferpuffer genäßten 3 mm-Blottingpapieren (Schleicher & Schuell, Dassel) sowie gleichermaßen behandelter Nitrocellulose-Membran (Hybond ECL, Amersham, Braunschweig) zum Blottingaufbau zusammengestellt. Drei Blottingpapiere wurden luftblasenfrei auf die Anode gebracht, gefolgt von Membran, Gel und zwei weiteren Blottingpapieren. Der Elektrottransfer wurde bei ca. 60-100 mA je Minigel für 60-90 min (Richtwert: 0.8 mA/cm² für 1-2 h, die Spannung übersteigt hierbei keine 15 V) in einer Pharmacia-Multiphor-Kammer (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Zur Kontrolle auf

erfolgreichen Transfer wurde die Membran nach Blot für 1 min in essigsaurer Ponceau S-Lösung (0,1% (w/v) Ponceau S in 5% (v/v) Essigsäure) geschwenkt und dann in Wasser entfärbt. Proteinspuren und -banden wurden rot sichtbar. Statt Nitrocellulosemembranen können auch stabilere PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membranen verwendet werden. Sie sind mit 100% Methanol sowie Säure (z.B. aus Coomassie-Färbelösung) ohne weiteres behandelbar. Das Blotting verläuft wie bei NC-Membranen, allerdings muß die Membran vor Verwendung je einige Sekunden in Methanol und in Wasser (Entfernen überflüssigen MeOHs) angefeuchtet und ein paar Minuten in Transferpuffer (enthält 20% (v/v) MeOH) äquilibriert werden. Zur Transferkontrolle kann hier eine vollständige Coomassie-Anfärbung erfolgen; hierzu wird die Membran für ca. 5 min in Coomassie-Färber (0,1% (w/v) Coomassie Serva Blue R; 10% (v/v) Essigsäure; 40% (v/v) Methanol) geschwenkt und entfärbt (Entfärber: 10% (v/v) Essigsäure; 30% (v/v) Methanol o. Ethanol). Die nun sehr gut sichtbaren Proteinbanden verschwinden im Verlauf der Immunanfärbung (z.T. bereits im Blockierungsschritt) durch Konkurrenz zwischen Farbstoff- und Proteinmolekülen.

2.6.3 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung (2.6.2) wurden die Gele 30 min in Lösung 1 (40 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure) fixiert und 20 min in Lösung 2 inkubiert (30 % (v/v) Ethanol; 0,125 % (v/v) Glutardialdehyd; 0,1 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 6,8 % (w/v) NaAc). Daraufhin wurde 3 x 5 min mit H_2O gewaschen und 20 min in Lösung 3 (0,25 % (w/v) AgNO_3 ; 0,04 % (w/v) Formaldehyd) inkubiert. Das Gel wurde kurz mit H_2O gewaschen (2 x 1 min) und dann 5-30 min in Lösung 4 (2,5 % (w/v) Na_2CO_3 ; 0,02 % (w/v) Formaldehyd) inkubiert. Nach ausreichender Färbung wurde die Reaktion durch Inkubation in Lösung 5 (15 % (w/v) EDTA) gestoppt. Die gefärbten Gele wurden mit dem Geldokumentationssystem Diana II (Raytest, Straubenhagen) dokumentiert.

2.6.4 Dot-Blot

1 μL einer mit Probenpuffer versetzten Probe (2.6.2) oder native Proteinlösung wurden direkt auf Nitrocellulosemembran (Hybond ECL, Amersham,

Braunschweig) pipettiert und luftgetrocknet. Im Anschluß wurden die Proben wie unter 2.6.5 beschrieben behandelt und detektiert.

2.6.5 Immunanfärbung

Auf den Elektrobplot folgte ein kurzes Waschen der Membran in TBST (TBS (20 mM Tris; 137 mM NaCl; pH 7,6) + 0,1% (v/v) Tween-20). Die Membran wurde nun für 1-3 h bei RT in Blockierpuffer (5% (w/v) Magermilchpulver (Biorad, Hamburg) in TBST) geschwenkt, gefolgt von Inkubation mit 1:500 bis 1:1000 in Blockierpuffer verdünntem primären Antikörper über Nacht bei 4°C oder 2 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit TBST (je 5-10 min bei RT) wurde für 1-2 h mit in Blockierpuffer verdünntem sekundären Antikörper (in der Regel 1:1000 bis 1:5000) inkubiert.

2.6.6 Entfernen von Antikörpern von der Membran („Strippen“)

Zum Entfernen von Antikörpern von der (Nitrocellulose-) Membran zum Zwecke des Detektierens anderer Proteine mit neuen Antikörpern wurde die Membran für 30 min im Wasserbad bei 55°C in Stripping-Puffer (100 mM β -Mercaptoethanol; 2% (w/v) SDS; 62.5 mM Tris pH 6,8) geschwenkt. Danach wurde 2-3 Mal für ca. 10 min in großen Volumina von TBST bei RT gewaschen und mit dem Blockierungsschritt für die neue Immunanfärbung begonnen. Da mit dem Strippen auch geblottetes Protein verlorengelht, sollte zunächst immer das in vermutlich niedrigeren Mengen vorliegende Antigen nachgewiesen werden.

2.6.7 Immunpräzipitation

Die Proben wurden in IP-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 5 % (v/v) Glycerin; 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid; je 1 μ g/mL Aprotinin und Leupeptin) auf eine Konzentration von 0,5-2 mg/mL Protein verdünnt und mit 20 μ L Protein G-Sepharose (50 % „slurry“; Pharmacia, Uppsala, Schweden) für 2 h bei 4°C vorgeklärt. Anschließend wurden 5-20 μ g monoklonale Anti-3-Nitrotyrosin-Antikörper (Biomol, Hamburg) dazugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Elution erfolgte nach Fällung der Immunkomplexe durch Zugabe von

20 µL Protein G-Sepharose (50 % „slurry“) und 2 h Inkubation bei 4°C, sowie 3-maligem Waschen mit IP-Puffer durch Aufkochen der Proben für 5 min bei 95°C. Zum Zweck der amino-terminalen Sequenzierung wurden die Proben über SDS-PAGE (12 % Acrylamid) aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Proteinfärbung erfolgte mittels Coomassie-Färbung. Die gefärbten Banden wurden ausgeschnitten, getrocknet und bei 4°C bis zur Sequenzierung gelagert. Die Sequenzierung wurde von der Gruppe um Dr. F. Lottspeich am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, durchgeführt.

2.6.8 Quantifizierung von Western Blots

Quantifizierung von Western Blots erfolgte nach Einscannen der belichteten Filme mit dem Programm Scion Image 4.0.2 (Scion Corporation, Maryland, USA).

3 Ergebnisse

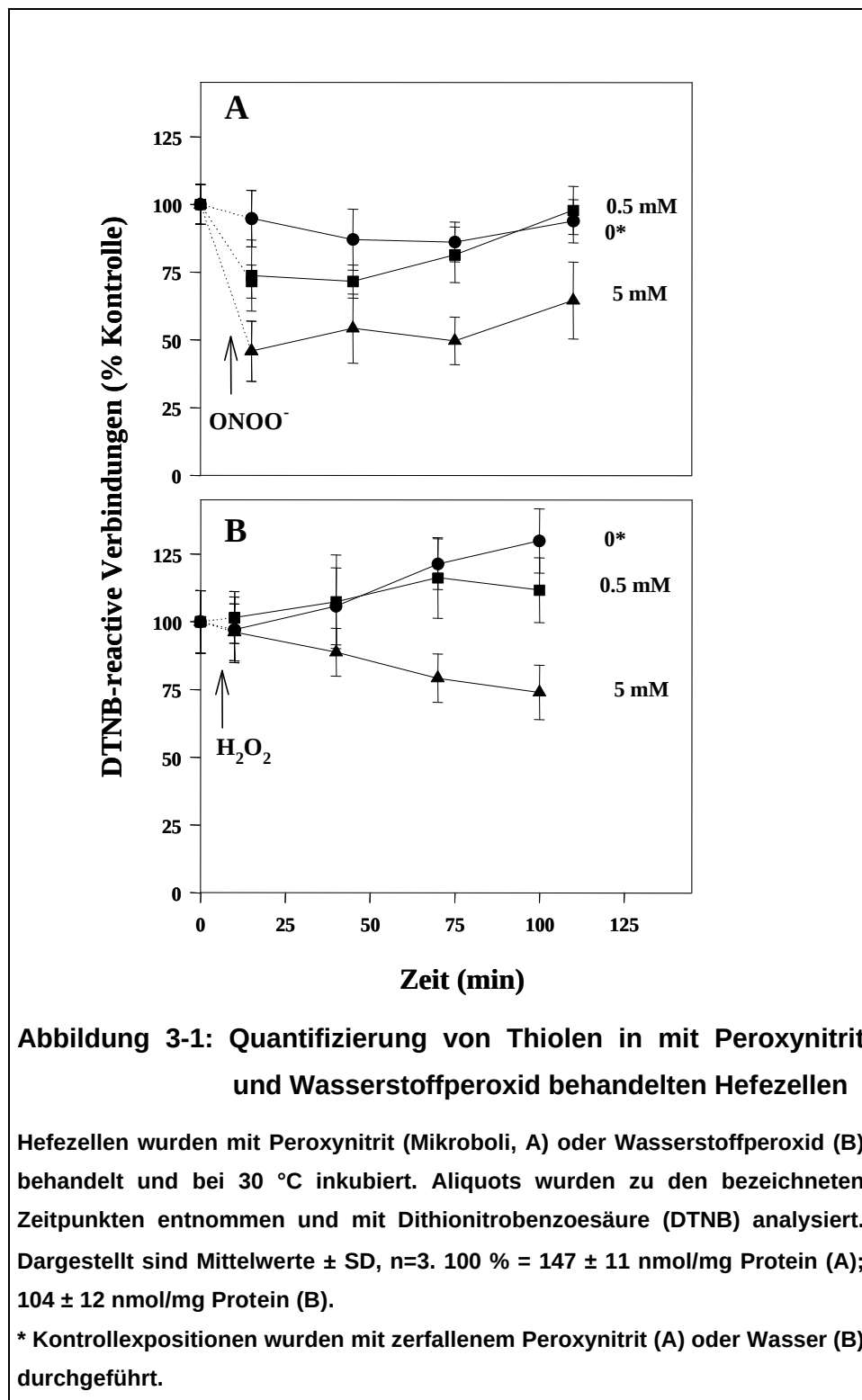
3.1 Identifikation eines sensitiven Zielmoleküls für Peroxynitrit in *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Identifikation eines Proteins, das in stärkerem Maße als andere mit ONOO^- reagiert, wurde die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* gewählt. Als Modell bietet dieser Organismus den Vorteil, molekularbiologischen und genetischen Untersuchungen gut zugänglich zu sein. Darüber hinaus läßt sich dieser Pilz in Suspension kultivieren und mit ONOO^- behandeln, was aufgrund der geringen Lebensdauer von ONOO^- bei neutralem pH eine gleichmäßige Exposition der suspendierten Zellen ermöglicht.

3.1.1 Peroxynitrit-vermittelte Schädigung von *Saccharomyces cerevisiae*

Peroxynitrit hat bei neutralem pH und Temperaturen zwischen 20 und 37°C eine Halbwertszeit im Bereich von 0,8 s (Koppenol *et al.*, 1992) und ist in der Lage, mit jeder Klasse von Biomolekülen zu reagieren. Aufgrund der hohen Reaktivität musste zunächst sichergestellt werden, dass Peroxynitrit das Innere der Hefezelle erreicht und dort Wirkung entfalten kann. Insbesondere die Nitrierung und Hydroxylierung aromatischer Aminosäurereste von Proteinen ist charakteristisch für die Wirkung von ONOO^- (Greenacre und Ischiropoulos, 2001). Ein weiterer wichtiger aber unspezifischerer Reaktionsmodus ist die Oxidation von Sulfhydrylgruppen. Diese nitrierende und oxidierende Wirkung von Peroxynitrit wurde an intrazellulären Indikatoren gemessen. Zunächst wurde die Konzentration freier Thiole gemessen. Exponentiell wachsende Hefezellen (DBY2058; *MATa*, *ura3-52 his4-619*) wurden wie unter 2.4.1 beschrieben behandelt. Nach Behandlung mit Peroxynitrit oder Wasserstoffperoxid wurden freie Thiole in Form von Dithionitrobenzoesäure- (DTNB) reaktiven Verbindungen in Zelllysaten als Parameter für die intrazelluläre Wirkung von Peroxynitrit gemessen (2.5.2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-1 dargestellt. Eine Behandlung mit Peroxynitrit verminderte den Gehalt an Sulfhydrylgruppen konzentrationsabhängig innerhalb weniger Minuten. Eine ähnliche Minderung war

auch mit Wasserstoffperoxid zu erreichen, allerdings waren dafür längere Inkubationszeiten (ca. 1 h) notwendig (Abbildung 3-1 B).



Die Oxidation von zellulären Sulfhydrylgruppen hat potentiell schädigenden Einfluss auf die Zelle, wofür auch die folgenden Versuche sprachen: Die Viabilität von Hefezellen (DBY2958), die mit ONOO^- oder Wasserstoffperoxid behandelt wurden (2.4.1), wurde durch Ausplattieren über die Zahl der Zellen bestimmt, die in der Lage waren zu Kolonien auf Agarplatten heranzuwachsen (2.3.1.2). Die Viabilität der Zellen nahm sowohl durch Behandlung mit ONOO^- als auch mit H_2O_2 mit steigender Konzentration ab. Kumulative ONOO^- -Konzentrationen von 2 mM oder darunter erwiesen sich als nicht toxisch (Tabelle 3-1). Die Viabilität nach fünfminütiger Behandlung mit H_2O_2 fiel schon bei einer Konzentration von 1 mM H_2O_2 um 50 %. Längere Inkubationszeiten (1 und 2 h) führten bei dieser Konzentration zu einer Abnahme auf 8 bzw. 0,8 % (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: Viabilität von Hefezellen nach Behandlung mit Peroxynitrit oder Wasserstoffperoxid^a

Lebendzellzahl nach Behandlung mit:				
Konzentration [mM]	ONOO^-	H_2O_2 5 min	H_2O_2 60 min	H_2O_2 120 min
0	100 ^b	100	100	100
0,5	94 ± 8 ^c	-	-	-
1	96 ± 10 ^c	49	8	0,8
2	98	-	-	-
3	25	-	-	-
4	1,6	-	-	-
5	0,8 ± 0,3 ^c	38	1	0
10	-	15	2	0

^a Hefezellen wurden mit Peroxynitrit (Mikrobioli) oder Wasserstoffperoxid behandelt.

Nach Ausplattieren der behandelten Zellen auf Vollmedium und 3 d Inkubation bei 30°C wurde durch Auszählen der gewachsenen Kolonien die Lebendzellzahl bestimmt und prozentual auf die Kontrolle bezogen. Angegeben sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

^b Behandlung mit 5 mM zerfallenem ONOO^-

^c Mittelwert ± SD; n = 3

- nicht bestimmt

Die Fähigkeit der behandelten Zellen, zu Zygoten zu fusionieren, wurde als nächstes getestet. Bei der Fusion zweier haploider Zellen unterschiedlichen Paarungstypes zu einer Zygote müssen Hefezellen eine ganze Reihe komplex gesteuerter Prozesse koordinieren. Die Zellen arretieren in G1, Paarungspheromone werden polarisiert sekretiert, das Zytoskelett wird umgelagert, die Zellwände werden lokal aufgelöst und die Membranen müssen fusionieren (Herskowitz, 1995; Kurjan, 1993). Diese Prozesse erfordern ein hohes Maß an Koordination und werden wahrscheinlich schon bei geringen schädigenden Einflüssen beeinträchtigt. Mit einem Nährmedium auf dem nur Zygoten wachsen können, läßt sich der Anteil der Zellen bestimmen, die die Paarung durchführen können (2.3.1.3). Schon bei Applikation einer kumulativen ONOO^- -Konzentration von 0,5 mM betrug der Anteil von α -Zellen (DBY2058), die noch zu Zygoten fusionieren konnten bezogen auf die Zerfalls-Kontrolle ca. 60 %. Bei einer Konzentration von 2 mM, die für die Zellen noch nicht toxisch war (vgl. Tabelle 3-1), lag der Anteil bei nur noch 5 % (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: Paarungsaktivität von Hefezellen nach Behandlung mit Peroxynitrit

ONOO ⁻ -Konzentration [mM]	Paarungsaktivität
	[Zygoten/ingesetzte α -Zellen] (% Zerfallskontrolle)
0 ^a	0,18 (100)
0,1	0,19 (105)
0,5	0,12 (63)
2	0,009 (5)

Hefezellen (DBY2058, Paarungstyp α) wurden mit Peroxynitrit (MikroboIi) behandelt und anschließend mit Paarungstyp α -Zellen (JD52) für 4 h inkubiert. Dann wurden die Zellen auf Selektionsmedien ausplattiert, und nach 3 d Inkubation bei 30°C wurde durch Auszählen der gewachsenen Kolonien die Lebendzellzahl bestimmt. Die Paarungsaktivitäten wurden als Zahl der Zygoten pro Zahl (Zygoten + α -Zellen) und als Mittelwerte von Doppelbestimmungen angegeben.

^a Zerfallskontrolle (5 mM)

3.1.2 Proteinumsatz in mit Peroxynitrit behandelten Hefezellen

Die Konzentration von Thiolen in Hefezellen wird durch Behandlung mit Peroxynitrit reduziert (vgl. Abbildung 3-1). Parallel wird dadurch auch die Viabilität und Paarungsaktivität von Hefezellen vermindert (vgl. Tabelle 3-1 und Tabelle 3-2). Faktoren, die zum Schutz der Zelle beitragen können, sind eine verstärkte Expression von Hitzeschockproteinen, insbesondere von Hsp70, und verstärkte Ubiquitinierung von Proteinen. Es wurde untersucht, inwiefern Peroxynitrit im Hinblick auf die Expression von Hsp70 und eine Anhäufung von ubiquitinierten Proteinen in Hefezellen eine andere Stressantwort als Wasserstoffperoxid auslöst. Zu diesem Zweck wurden Zellen (DBY2058) nach Behandlung mit Peroxynitrit oder Wasserstoffperoxid (2.4.1) zur Western Blot-Analyse aufbereitet (2.6). Detektiert wurde mit einem Antikörper, der sowohl die konstitutive als auch die induzierbare Form von Hsp70 erkennt. Nach Behandlung mit einer kumulativen Peroxynitrit-Konzentration von 0,5 mM und stärker noch bei 1 mM kam es zur Induktion von Hsp70 (Abbildung 3-2A). Wasserstoffperoxid hingegen führte erst ab 10 mM zu einer geringen Anhäufung von Hsp70 (Abbildung 3-2B).

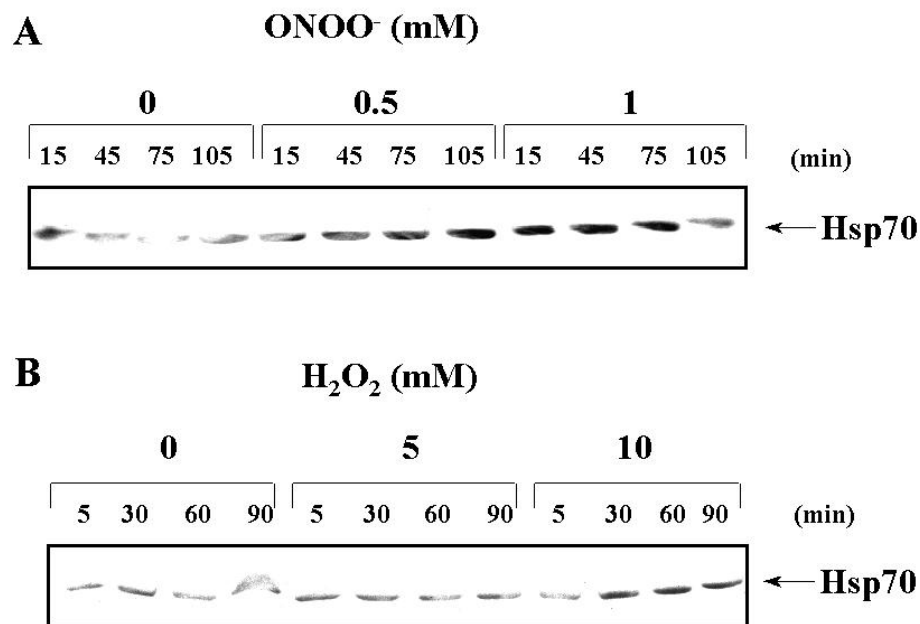
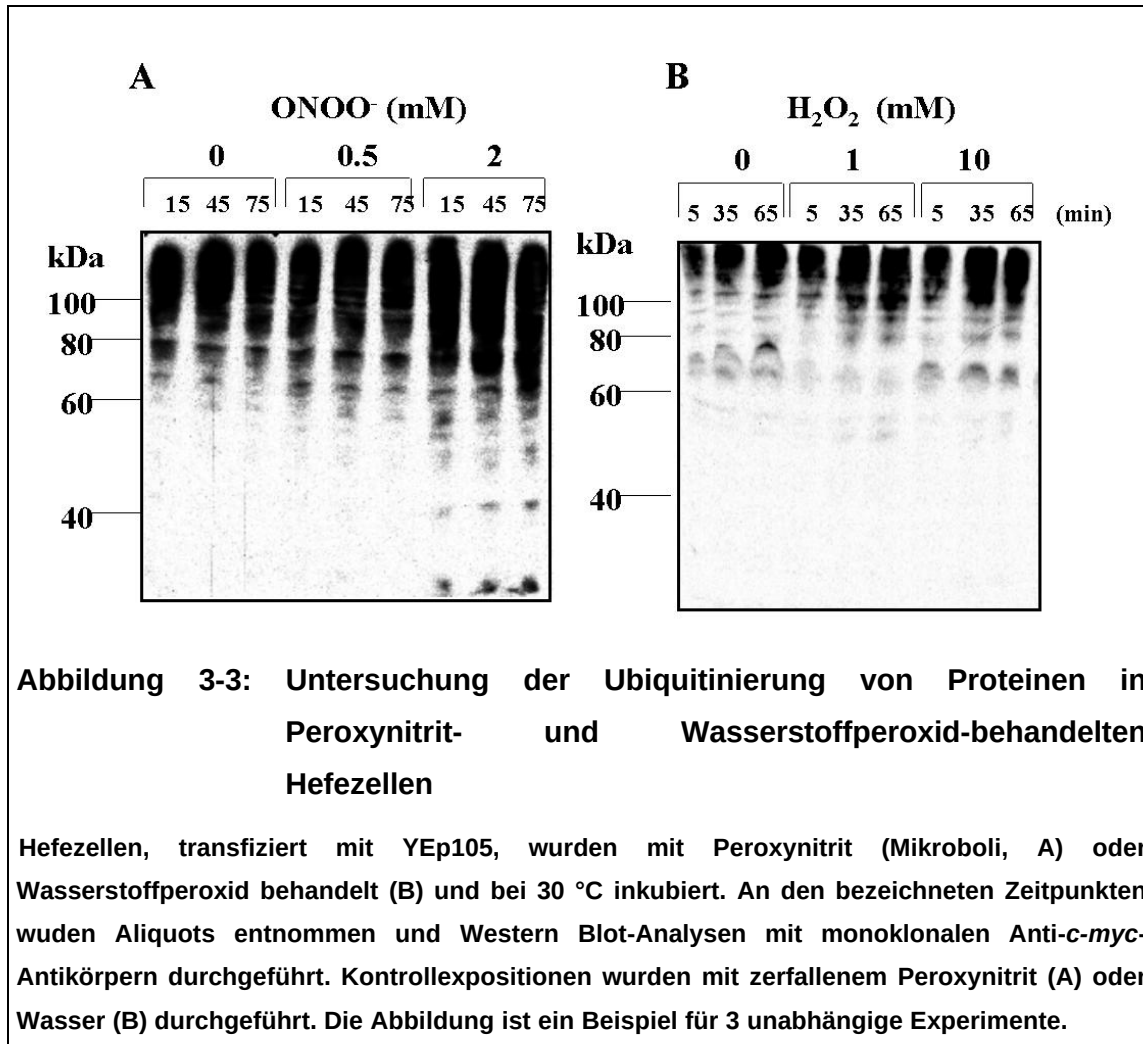


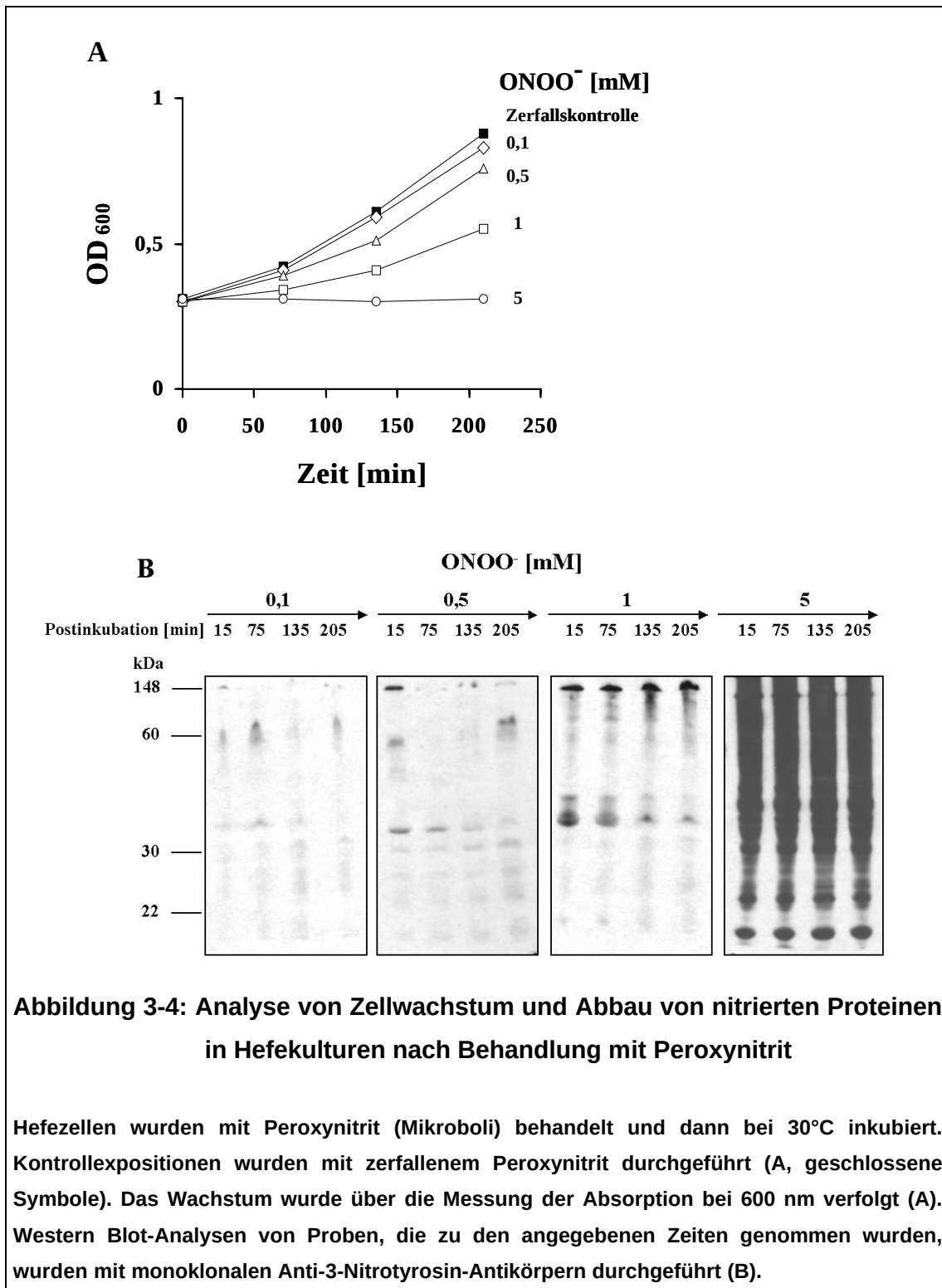
Abbildung 3-2: Untersuchung der Induktion von Hsp70 durch Peroxynitrit- oder Wasserstoffperoxid-Behandlung in Hefezellen

Hefezellen wurden mit Peroxynitrit-Mikroboli (A) oder Wasserstoffperoxid (B) behandelt und bei 30 °C inkubiert. An den bezeichneten Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und Western Blot-Analysen mit monoklonalen Anti-Hsp70-Antikörpern durchgeführt. Kontrollexpositionen wurden mit zerfallenem Peroxynitrit (A) oder Wasser (B) durchgeführt. Die Abbildung ist ein Beispiel für 3 unabhängige Experimente.

In Übereinstimmung damit führte die Behandlung mit Peroxynitrit zu einer Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen (Abbildung 3-3A), während eine Induktion der Ubiquitinierung durch Wasserstoffperoxid nicht beobachtet wurde (Abbildung 3-3B). In diesen Experimenten wurden Hefezellen (6211: *MATa*; *Leu2-3 trp1delta90 his3delta200 ade2 ura3-52 SUC2delta9*), die mit YEp105 transfiziert waren und *c-myc*-markiertes Ubiquitin überexprimierten (vgl. 2.3.1), verwendet. Die Detektion von ubiquitinierten Proteinen im Western Blot erfolgte mit Antikörpern gegen *c-myc*.



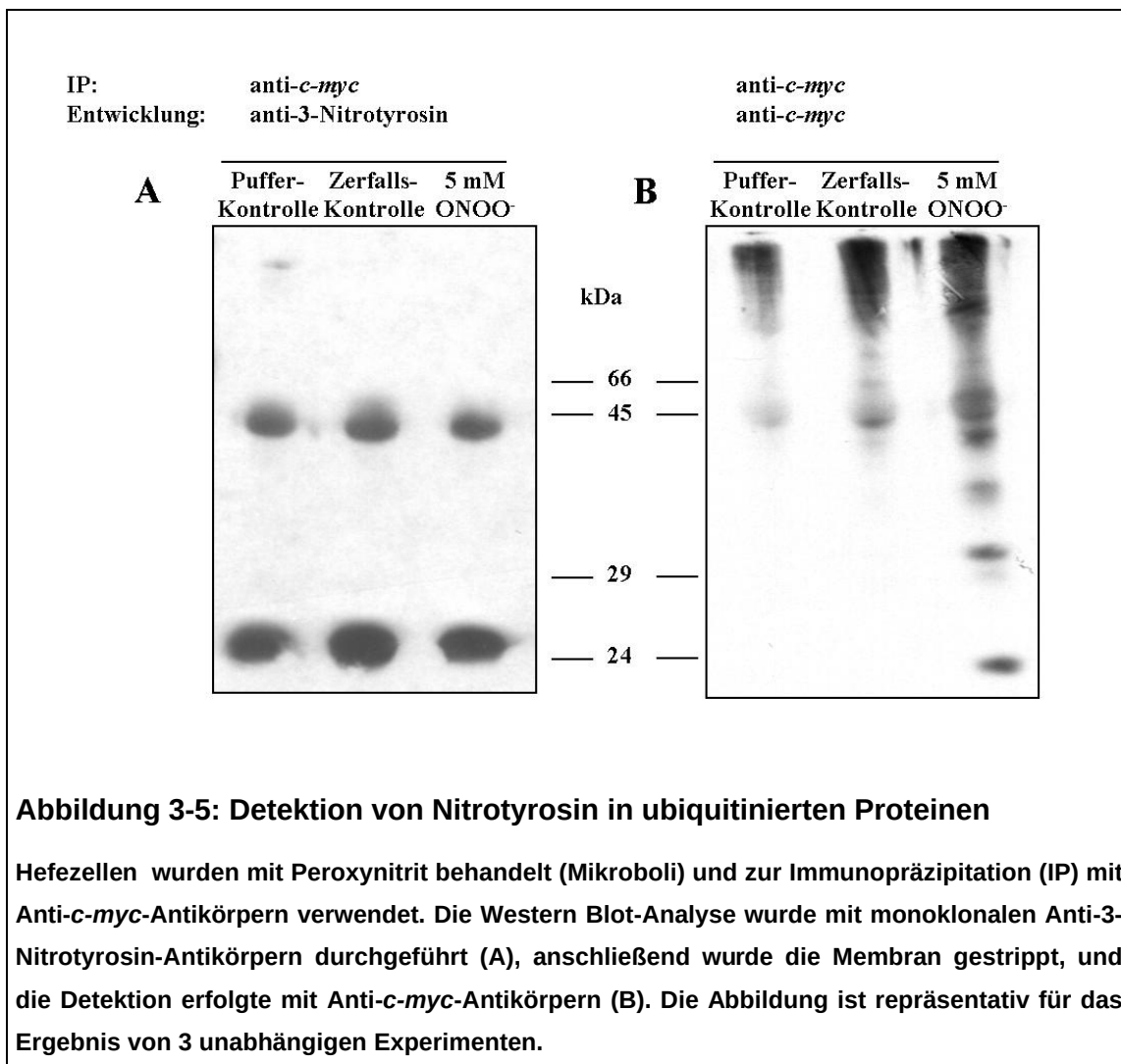
Die Ursache einer solchen Akkumulation kann eine direkte Schädigung der betreffenden Proteine durch ONOO⁻ sein. Ein charakteristisches Zeichen für die Einwirkung von Peroxynitrit auf Proteine ist die Nitrierung von Tyrosinresten (Greenacre und Ischiropoulos, 2001). In Zellen, die nach Behandlung mit ONOO⁻ weiter wachsen konnten, wurde untersucht, ob nitrierte Proteine abgebaut werden. Logarithmisch wachsende Hefekulturen (DBY2058) wurden mit ONOO⁻ behandelt (2.4.1), auf eine OD₆₀₀ von 0,3 resuspendiert und bei 30°C weiter wachsen gelassen. Das Wachstum wurde anhand der Zunahme der optischen Dichte gemessen (Abbildung 3-4 A). Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben genommen und zur Western Blot-Analyse mit Antikörpern gegen 3-Nitrotyrosin aufgearbeitet (Abbildung 3-4 B). Eine kumulative Konzentration von 0,1 mM ONOO⁻ inhibierte das Wachstum nur geringfügig, wobei



kaum nitrierte Proteine zu erkennen waren. Bei einer Konzentration von 0,5 mM war das Wachstum verlangsamt, gleichzeitig waren vermehrt nitrierte Proteine 15 min nach Behandlung nachzuweisen, die aber nach 75 min Wachstum nicht mehr

detektierbar waren. Bei 1 mM kam es zu einer deutlichen Inhibition der Wachstumsrate, die aber noch nicht zu einer verminderten Viabilität führte (vgl. Tabelle 3-1). Nitrierte Proteine waren verstärkt und länger nachweisbar. Bei einer Konzentration von 5 mM war kein Wachstum mehr messbar.

Es wurde untersucht, ob nach einer Behandlung mit Peroxynitrit die gehäuft auftretenden ubiquitinierten Proteine auch in stärkerem Maße nitriert sind.

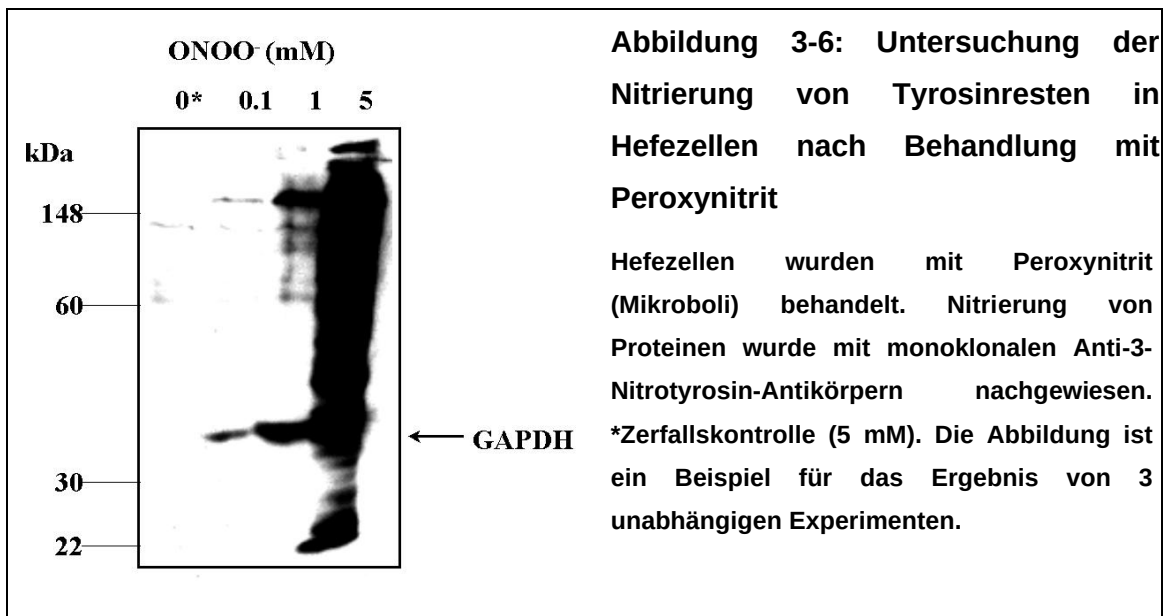


Dazu wurden Proteinextrakte von behandelten Zellen (6211 mit YEp105 transfiziert) hergestellt und eine Immunopräzipitation (2.6.7) mit Antikörpern gegen *c-myc*-markiertes Ubiquitin (vgl. Abbildung 3-3) durchgeführt. Im Anschluß wurden die Präzipitate mittels Western Blotting auf das Vorhandensein von 3-Nitrotyrosin untersucht. Nitrierte Proteine wurden durch die Immunopräzipitation von

ubiquitinierten Proteinen nicht vermehrt präzipitiert (Abbildung 3-5 A). Nach Entfernen der Antikörper (Strippen) wurde dieselbe Membran zur Kontrolle der Immunopräzipitation mit Antikörpern gegen *c-myc* untersucht. In Übereinstimmung mit vorherigen Ergebnissen (Abbildung 3-3 A), enthielten Zellen, die mit Peroxynitrit behandelt wurden, mehr ubiquitinierte Proteine als die Kontrollen (Abbildung 3-5 B). Obgleich Peroxynitrit-Behandlung zu einer Akkumulation von ubiquitinierten und auch nitrierten Proteinen führte, wurden nitrierte Proteine nicht bevorzugt ubiquitiniert.

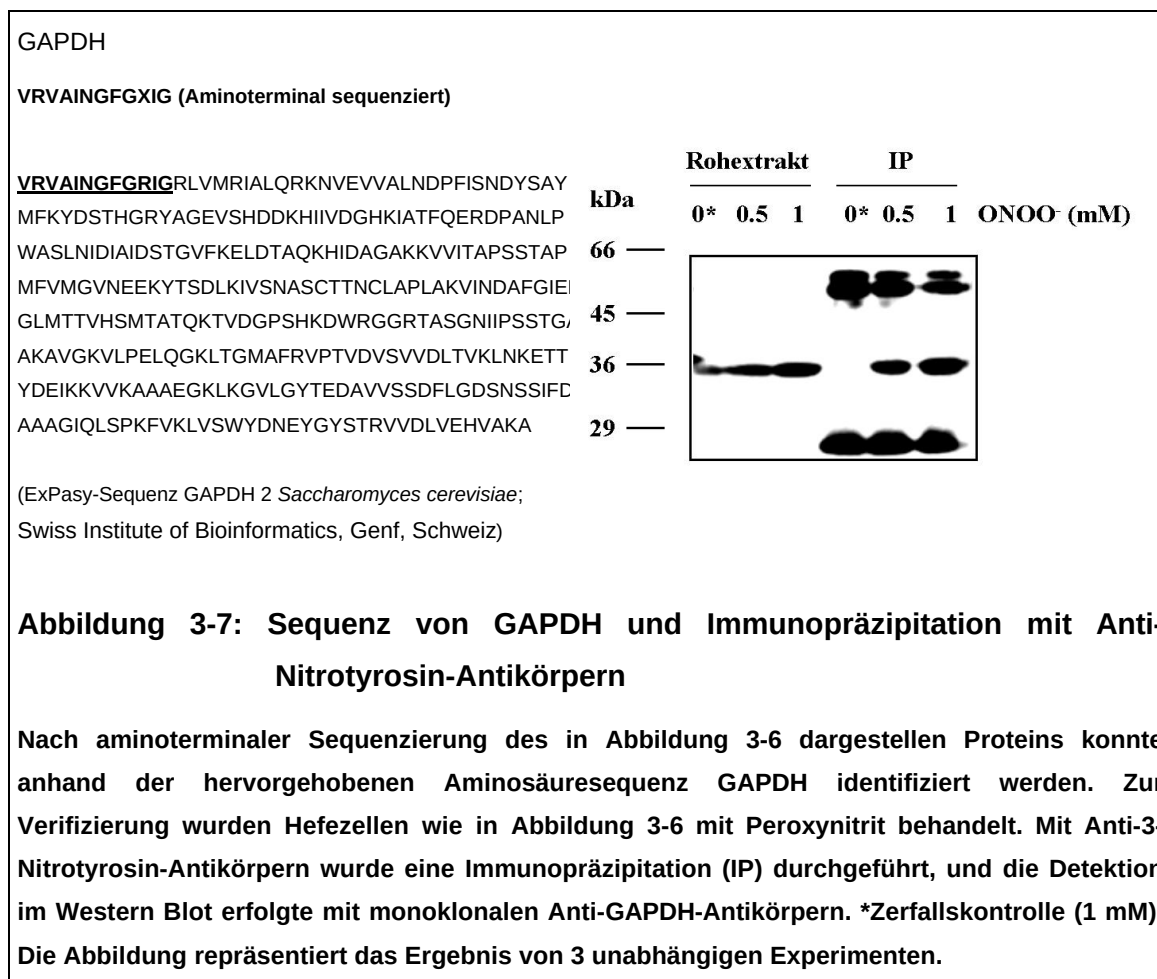
3.1.3 Identifikation eines nitrierten Proteins als Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

Exponentiell wachsende Hefezellen wurden mit verschiedenen kumulativen Konzentrationen ONOO^- behandelt (2.4.1). Im Anschluß wurden die Proben mittels Western Blot auf das Vorhandensein von 3-Nitrotyrosin untersucht. Einige Proteine wurden bereits durch Behandlung mit niedrigeren Konzentrationen Peroxynitrits als andere nitriert (Abbildung 3-6).



Eine Proteinbande, die schon bei Behandlung mit niedrigen Konzentrationen stark immunoreaktiv für Anit-Nitrotyrosin-Antikörper war, wurde identifiziert. Nach Immunopräzipitation von nitrierten Proteinen mit monoklonalen

Anti-3-Nitrotyrosin-Antikörpern aus Zelllysaten von peroxynitritbehandelten Zellen (2.6.7) wurden die Proben nach Auftrennung über SDS-Page auf eine PVDF-Membran geblottet und mit Coomassie-Blau gefärbt (2.6.2). Banden, die nur bei Lysaten aus ONOO⁻-behandelten Zellen auftraten, nicht aber bei Lysaten der Zerfallskontrolle, wurden ausgeschnitten und von der Gruppe um Dr. F. Lottspeich, MPI für Biochemie in Martinsried, amino-terminal ansequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung war in zwei unabhängigen Experimenten die Aminosäuresequenz VRVAINGFGXIG. Das dieser Aminosäuresequenz zuzuordnende Protein ist die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH; EC 1.2.1.12). Western Blot-Analysen mit Anti-GAPDH-Antikörpern nach Immunopräzipitation mit Anti-Nitrotyrosin-Antikörpern aus Proteinextrakten von peroxynitritbehandelten Zellen bestätigten das Ergebnis der Sequenzierung (Abbildung 3-7).



Im Folgenden wurde der Einfluss von ONOO^- auf die enzymatische Aktivität der GAPDH untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mittels einer Perfusorpumpe einer konstanten Fließgleichgewichtskonzentration von ONOO^- ausgesetzt (2.4.1). Die GAPDH-Aktivität aus Zelllysaten von behandelten Proben wurde wie unter 2.5.1 beschrieben gemessen. In Übereinstimmung mit einer erhöhten Sensitivität von GAPDH gegen Nitrierung wird dieses Enzym auch effizient durch Peroxynitrit inaktiviert. In Hefezellen, die in Suspension über 3 min verschiedenen Fließgleichgewichtskonzentrationen von Peroxynitrit ausgesetzt wurden, erfolgte eine 50 %ige Verminderung der GAPDH-Aktivität bereits bei 5 μM ONOO^- (Abbildung 3-8).

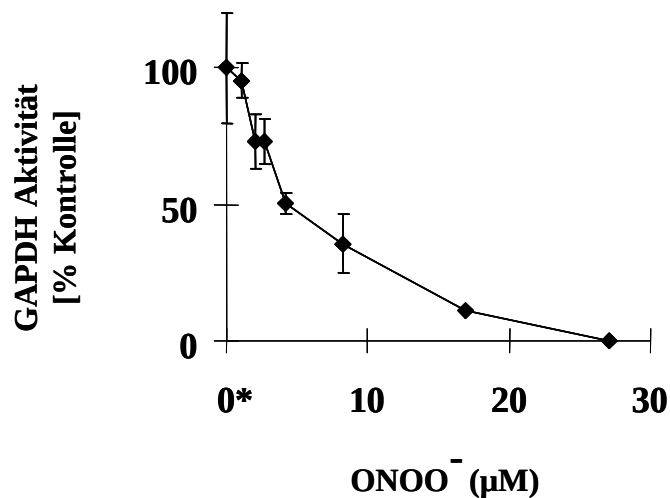


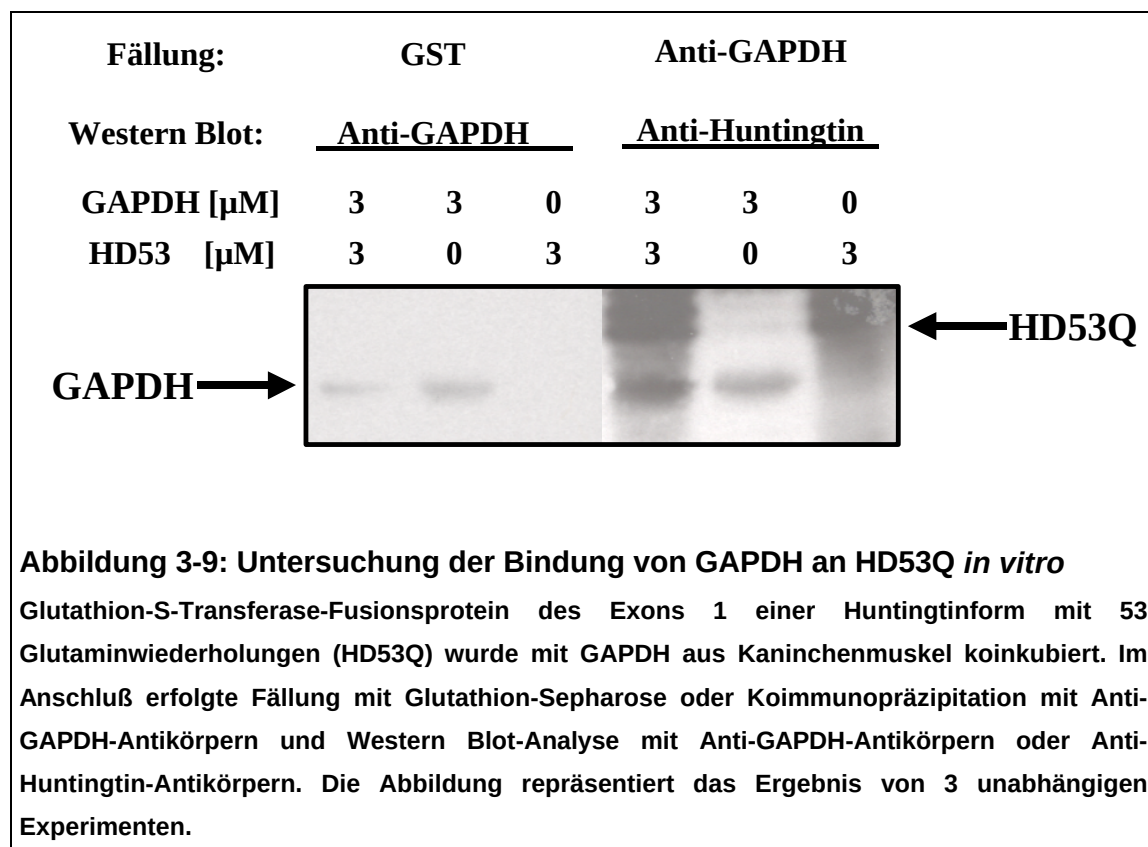
Abbildung 3-8: Untersuchung der Inaktivierung von GAPDH in mit Peroxynitrit behandelten Hefezellen

Hefezellen wurden über 3 min verschiedenen Fließgleichgewichtskonzentrationen Peroxynitrits ausgesetzt. Die enzymatische Aktivität wurde photometrisch bei 340 nm durch Anstieg der NADH-Konzentration bestimmt. 100 % = 1400 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SD, $n = 3$. *Inkubation in Puffer mit zerfallenem Peroxynitrit (5 mM Endkonzentration)

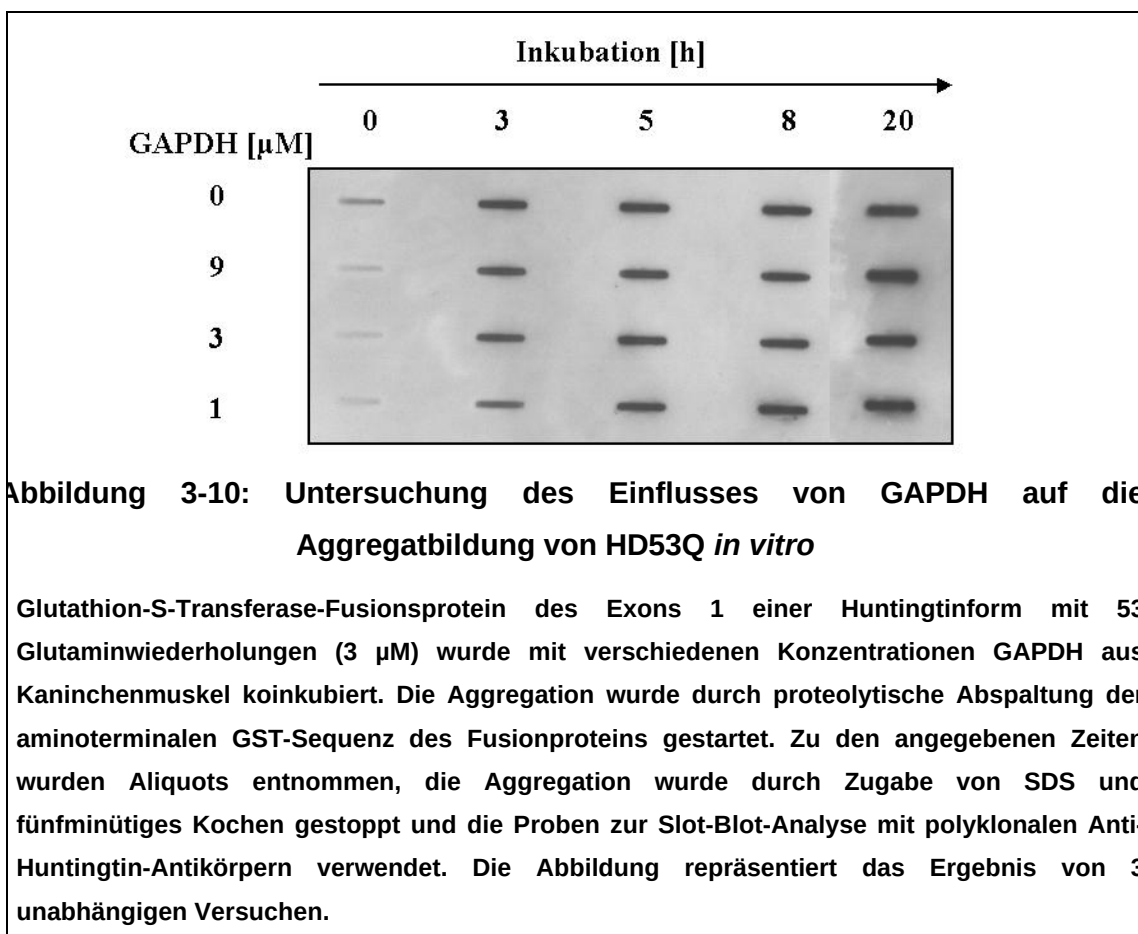
3.1.4 Einfluss von GAPDH auf die Aggregation von Huntingtin

Aggregatbildung als pathogener Faktor wird bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, bei denen auch ONOO^- eine Rolle spielt, diskutiert. Peroxynitrit-geschädigte GAPDH könnte dabei nicht nur als struktureller Bestandteil der Aggregate von Bedeutung sein, sondern auch Einfluss auf die Bildung von Aggregaten nehmen. Als Modell für ein Protein, das in der Pathogenese einer neurodegenerativen Erkrankung beteiligt ist und das GAPDH stärker als andere Proteine bindet (Burke *et al.*, 1996), wurde Huntingtin gewählt. Im Folgenden wurde das Aggregationsverhalten von Huntingtin in Abhängigkeit von GAPDH untersucht.

Mit GST-HD53Q, einem Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein des Exons 1 einer pathogenen Form des Huntingtins mit 53 Glutaminwiederholungen (HD53Q), wurde untersucht, ob GAPDH an Huntingtin bindet und welchen Einfluss GAPDH auf die Aggregation von Huntingtin hat.



Eine erhöhte Affinität zwischen beiden Proteinen sollte über eine Kopräzipitation nachgewiesen werden. Die Fällung sollte dabei spezifisch für jeweils eines der Proteine sein, während die Detektion das entsprechend andere nachweist. Zum einen wurde eine Fällung mit Glutathion-Sepharose (2.5.5), zum anderen wurde eine Koimmunopräzipitation mit Anti-GAPDH-Antikörpern durchgeführt. Die Koimmunopräzipitation wurde mit folgenden Modifikationen wie unter 2.6.7 beschrieben durchgeführt:



Aliquots dieser Proben wurden für Aggregations-Assays benutzt, die zeigen sollten, ob GAPDH einen Einfluss auf das Aggregationsverhalten von Huntingtin hat. Bei Fällung des GST-HD-Fusionsproteins mit Glutathion aus einem Gemisch von GAPDH und GST-HD53Q konnte im Western Blot keine vermehrte Kofällung von GAPDH beobachtet werden. Ebenso wenig wurde aus äquivalenten Ansätzen bei Immunopräzipitation von GAPDH vermehrt Huntingtin kopräzipitiert (Abbildung 3-9). Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase hatte darüber hinaus sowohl in

niedriger Konzentration (molares Verhältnis GAPDH/HD53Q = 1:3) als auch in höheren Konzentrationen (GAPDH/HD53Q = 1:1 und 3:1) in Gemischen von GAPDH und Huntingtin keinen Einfluss auf die Aggregationsgeschwindigkeit von GST-HD53Q (Abbildung 3-10).

Die Aggregation von Huntingtin erwies sich ebenfalls als unabhängig von der Behandlung isolierten Huntingtins mit Peroxynitrit und Wasserstoffperoxid. Nach Behandlung des Proteins mit bis zu 1000fachem molaren Überschuß von Peroxynitrit oder Wasserstoffperoxid zeigte sich keine Änderung der Aggregationsgeschwindigkeit des Huntingtins im Vergleich zur Pufferkontrolle oder Kontrolle mit zerfallenem Peroxynitrit.

In exponentiell wachsenden Hefezellen (JN54), die mit YEp105-HD53Q transfiziert waren, wurde untersucht, wie sich die Wirkung von Peroxynitrit auf die Aggregation des Huntingtins auswirkt.

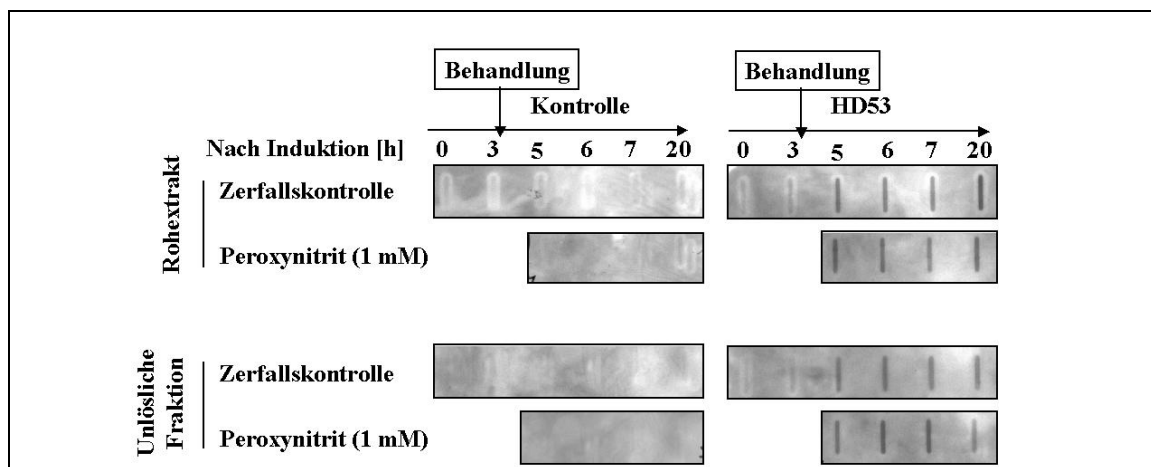
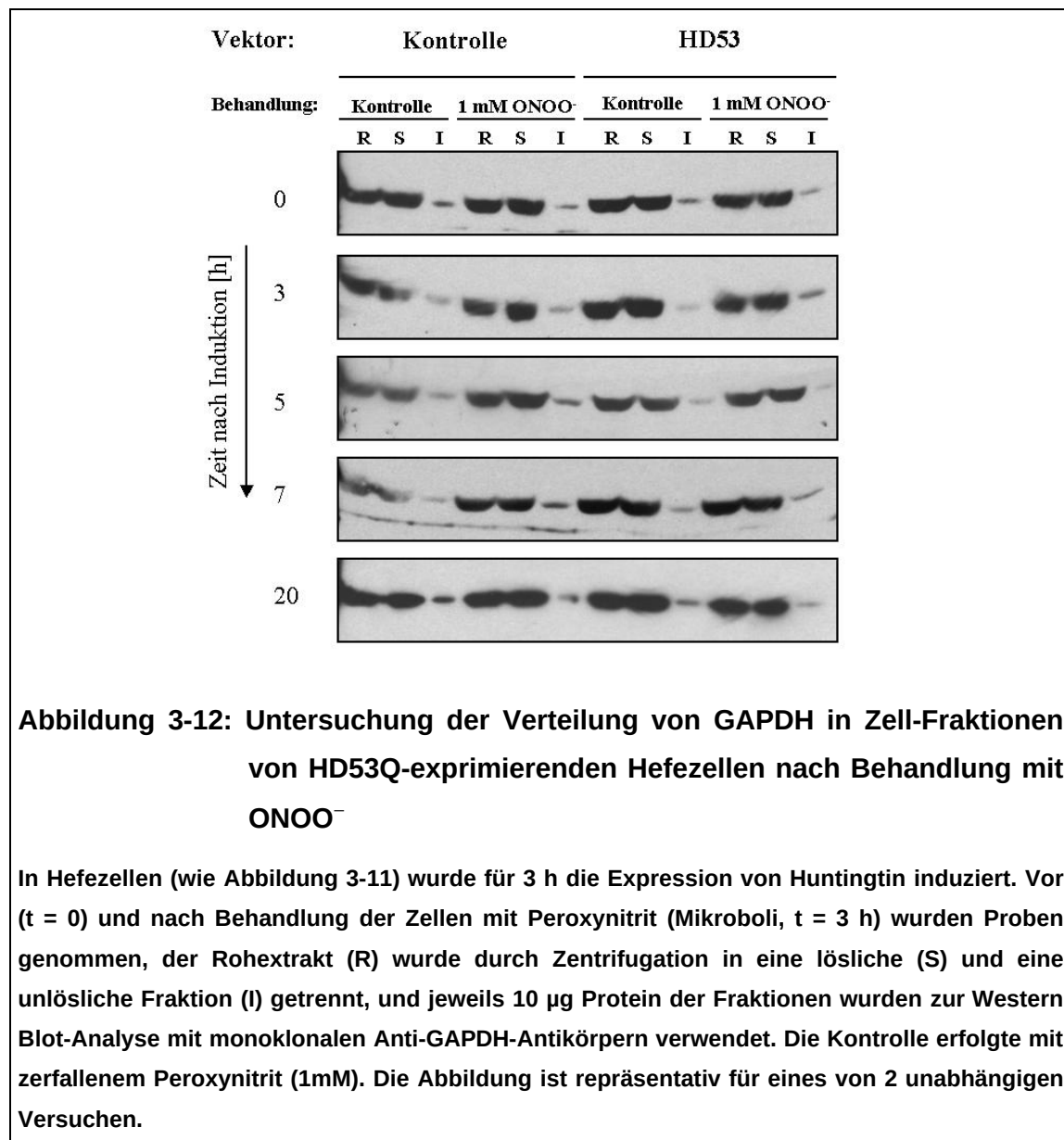


Abbildung 3-11: Untersuchung des Einflusses von Peroxynitrit auf die Aggregation von HD53Q in Hefezellen

In Hefezellen (mit dem Kontrollplasmid YEp96 oder dem HD53Q kodierenden Plasmid YEp105-HD53Q transfiziert) wurde für 3 h die Expression von Huntingtin induziert. Vor und nach Behandlung der Zellen mit Peroxynitrit (Mikrobioli) wurden Proben genommen, vom Rohextrakt wurde durch Zentrifugation eine unlösliche Fraktion abgetrennt und jeweils 10 µg Protein zur Slot-Blot-Analyse mit polyklonalen Anti-Huntingtin-Antikörpern verwendet. Die Zerfallskontrolle (1mM) wurde mit 1 mM ONOO⁻ durchgeführt.

3 h Wachstum nach Induktion der Expression von HD53Q (2.5.6), wurden die Zellen mit 1 mM Peroxynitrit oder zerfallenem Peroxynitrit behandelt und unterschiedlich

lange postinkubiert. Die Zelle wurden aufgeschlossen, die Extrakte in eine lösliche und eine unlösliche Fraktion getrennt und für Aggregations-Assays und zur Western Blot-Analyse verwendet. Das Ergebnis der Aggregationsstudien ist in Abbildung 3-11 dargestellt. Die Behandlung mit Peroxynitrit zeigte keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit, mit der HD53Q aggregiert. Lösliche und Unlösliche Fraktion hatten einen ähnlichen Gehalt an Huntingtin, das vergleichbar schnell Aggregate bildete.



Wenn GAPDH mit Huntingtin assoziiert, sollte es vermehrt zusammen mit Huntingtin in der H₂O-unlöslichen Fraktion der Zellysate zu finden sein, da diese Aggregate

nicht H₂O-löslich sind. Nach Untersuchung der Verteilung von GAPDH in den beiden Fraktionen (Abbildung 3-12) konnten folgende Schlüsse gezogen werden: i) Erwartungsgemäß findet sich GAPDH als zytoplasmatisches Protein zumeist in der wasserlöslichen Fraktion. ii) Der Gehalt von GAPDH in der H₂O-unlöslichen Fraktion ist nicht abhängig davon, ob die Zellen HD53Q exprimieren. iii) Auch die Behandlung mit ONOO⁻ hat keinen Einfluss auf die Menge koaggregierter GAPDH.

3.2 Untersuchung der Wirkung von Peroxynitrit in Säugerzellen

Nachdem GAPDH als sensitives Zielmolekül für die Wirkung von ONOO⁻ in einem einfachen eukaryontischen Modell identifiziert worden war, stellte sich die Frage, inwiefern sich dieser Befund in komplexeren Modellen bestätigen läßt. Ein erheblicher Einfluss von ONOO⁻ wird unter anderem bei Gewebsschädigungen infolge von Ischämie und folgender Reperfusion diskutiert, einem Pathomechanismus, der im ZNS von Bedeutung ist. Peroxynitrit entsteht dabei *in vivo* vornehmlich in Blutgefäßen, denen im ZNS Astrozyten direkt benachbart sind.

Mit kultivierten Rattenastrozyten wurde der Einfluss einer Exposition, mit ONOO⁻ in mikromolaren Fließgleichgewichtskonzentrationen über 3 min, untersucht. Darüber hinaus wurde nach charakteristischen Schäden für ONOO⁻ unter Bedingungen gesucht, bei denen ONOO⁻ in niedrigen Konzentrationen direkt im Gewebeverband entsteht. Als Modell für *in vivo* von ONOO⁻ verursachte Schäden wurde ein Mausthrombosemodell gewählt, bei dem die Läsion durch einseitigen, thrombotischen Verschuß der Arteria cerebri media mit anschließender Thrombolyse und 1-stündiger Reperfusion induziert wurde.

3.2.1 Wirkung von Peroxynitrit auf Rattenastrozyten

Tabelle 3-3: Viabilität von kultivierten Rattenastrozyten nach Behandlung mit Peroxynitrit

ONOO ⁻ Fließgleichgewicht für 3 min [μM]	Viabilität [% Zerfallskontrolle]
0	100
0,8	96,7
1,6	93,5
3,3	86,2
6,5	94,8
7,9	79,3

Kultivierte Rattenastrozyten wurden 3 min mit verschiedenen Fließgleichgewichtskonzentrationen Peroxynitrits behandelt. Nach 24 h Postinkubation wurde mittels MTT-Assay die Viabilität gemessen. Die Zahlen repräsentieren Mittelwerte einer Duplikatbestimmung.

Im Anschluß an die Behandlung der konfluent gewachsenen Rattenastrozyten mit verschiedenen Fließgleichgewichtskonzentrationen von ONOO⁻ (2.4.3) wurde die Viabilität der Zellen mittels MTT-Assay (2.3.2.1) bestimmt. Bis zu Fließgleichgewichtskonzentrationen von 6,5 μM war keine Abnahme der Viabilität der behandelten Astrozyten zu erkennen (Tabelle 3-3). Auf die gleiche Weise behandelte Zellen wurden auch hinsichtlich einer Anhäufung von Nitrotyrosin untersucht. Es war nur eine sehr schwache Protein-Nitrierung nachweisbar (Abbildung 3-13). Bei einigen Experimenten konnte eine Nitrierung mit dem verwendeten Chemoluminiszenz-Detektionskit (vgl. 2.6.5) nicht detektiert werden. Die enzymatische Aktivität der GAPDH wurde allerdings effizient gehemmt (Abbildung 3-14). Die Aktivität betrug nach Behandlung mit ca. 0,5 μM ONOO⁻ noch 50 % der Aktivität der Zerfallskontrolle.

ONOO⁻ [μM] 0 0,8 1,6 3,3 6,5

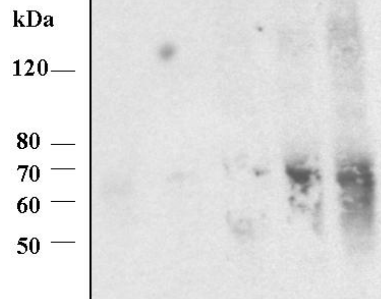
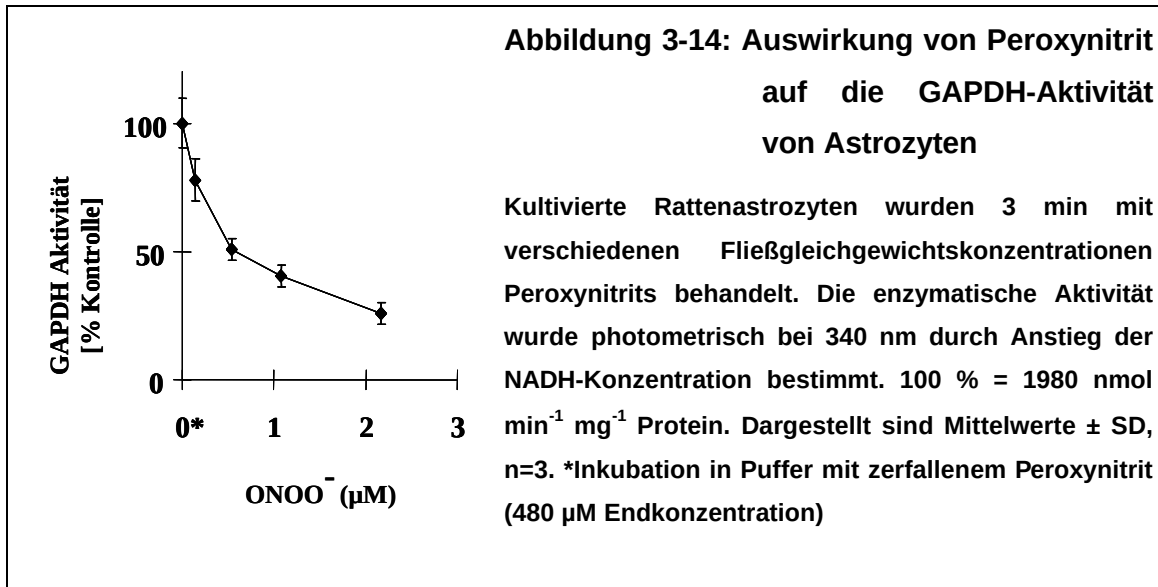


Abbildung 3-13: Nachweis von Protein-Nitrierung in kultivierten Rattenastrozyten nach Behandlung mit Peroxynitrit

Kultivierte Rattenastrozyten wurden 3 min mit verschiedenen Fließgleichgewichtskonzentrationen Peroxynitrits behandelt. Die Proben wurden zur Western Blot-Analyse eingesetzt. Detektion erfolgte mit monoklonalen Anti-3-Nitrotyrosin-Antikörpern.

Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase in kultivierten Rattenastrozyten erwies sich empfindlicher als die GAPDH in Hefezellen. Die Konzentration an ONOO⁻, die für eine halbmaximale Inaktivierung notwendig war, war bei der Astrozyten-GAPDH rund eine Größenordnung niedriger als bei der Hefe-GAPDH (vgl. Abbildung 3-8 und Abbildung 3-14). Neben allen Unterschieden in der Peroxynitrit-Behandlung von kultivierten Rattenastrozyten und Hefezellen, ist wahrscheinlich die dicke Zellwand der Hefezellen, über die Astrozyten nicht verfügen, dafür verantwortlich. Bevor Peroxynitrit bei Hefezellen die Zellmembran erreicht, wird ein großer Teil bereits mit der Zellwand reagiert haben, was intrazelluläre Moleküle vor Oxidationen und Nitrierungen schützt.



3.2.2 Untersuchung durch Peroxynitrit vermittelter Effekte nach Ischämie/Reperfusion im Maushirn durch transiente thromboembolische Okklusion der Arteria cerebri media

Die Gewebeproben wurden freundlicherweise von Prof. K-A. Hossmann vom Max-Planck-Institut für neurologische Forschung, Köln, bereitgestellt, wo auch die Behandlung der Versuchstiere von Mitgliedern der Arbeitsgruppe um Prof. Hossmann durchgeführt wurde. Die Versuchstiere (C57Black/6J) wurden in 3 Gruppen aufgeteilt. Tiere der Gruppe 1 wurden linksseitig operiert, ohne dass eine Thrombose induziert wurde (Sham-operiert). Bei Tieren der Gruppe 2 wurde linksseitig eine Läsion gesetzt, indem den Tieren zerkleinertes thrombotisches Material in die Arteria carotis media injiziert wurde. Die Tiere wurden nach 1 h Ischämie, bedingt durch embolischen Verschluss der Arteria cerebri media, getötet. Tiere der Gruppe 3 wurden wie Gruppe 2 behandelt. Nach 1 h wurde eine Thrombolyse mit rtPA durchgeführt. 1 h nach Beginn der Thrombolyse wurden die Tiere getötet. Die Gehirne wurden entnommen und beide Hemisphären getrennt. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

Die Homogenisierung der Proben erfolgte durch 10 maliges Pottern der Hemisphären in 1 mL PBS (mit 1 mM PMSF; je 1 μg/mL Aprotinin; Leupeptin) in einem 5 mL Pottergefäß bei 1200 rpm. 100 μL des Homogenats wurden mit 100 μL 4 x Probenpuffer (8 % (w/v) SDS; 40 % (v/v) Glycerin; 250 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,4 %

(w/v) Bromphenolblau; 40 mM DTT) versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert und der Überstand wurde zur Dot-Blot- und Western Blot-Analyse (2.6) verwendet. Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurde zu 495 µL der Proben 5 µL Triton X-100 gegeben. Die Proben wurden gevortext und 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 30 min bei 14 000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Triton-lösliche Überstand wurde abgenommen und sowohl zur Bestimmung der Proteinkonzentration (2.5.3) als auch zur Messung der GAPDH-Aktivität (2.5.1) und freier Thiole (2.5.2) verwendet.

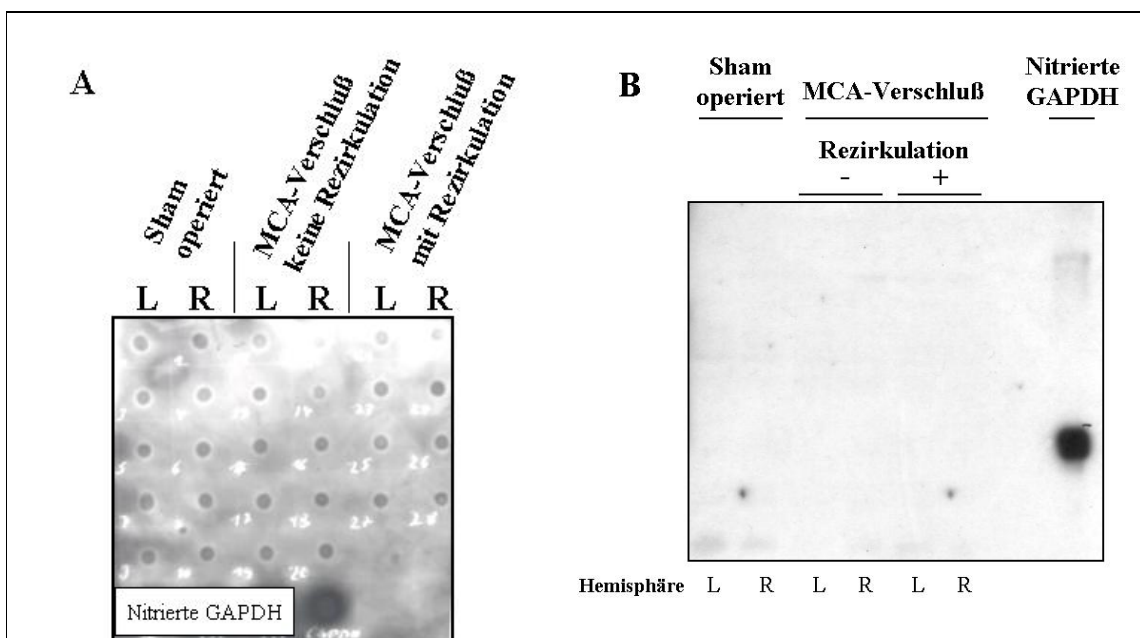


Abbildung 3-15: Untersuchung von Maushirnen auf Tyrosin-Nitrierung nach transientser Ischämie und Reperfusion

Bei Mäusen wurde für 1 h ein linksseitiger thromboembolischer Verschluß der Arteria cerebri media (MCA) induziert. Der Thrombus wurde entfernt, die Gehirne der Tiere wurden für 1 h reperfundiert, entnommen und die beiden Hemisphären getrennt. Von den homogenisierten Proben der linken (L) und rechten (R) Hemisphäre wurden Dot-Blot-(A) und Western Blot-Analysen (B) durchgeführt. Detektion erfolgte mit monoklonalen Anti-3-Nitrotyrosin-Antikörpern. Die Positivkontrolle entspricht 1 µg mit Peroxynitrit behandelter GAPDH.

Homogenisierte Gewebeproben von Maushirnhemisphären (3.2.2) wurden nach Ischämie/Reperfusion auf Protein-Nitrierung untersucht. In Abbildung 3-15 A ist ein Dot Blot gezeigt, bei dem von beiden Hemisphären verschiedener Vertreter aller Versuchsgruppen jeweils 10 µg Gesamtprotein aufgetragen wurden. In Abbildung

3-15 B ist ein Western Blot gezeigt, bei dem je 1 Tier aus jeder Versuchsgruppe untersucht wurde.

Im Vergleich zu den Kontrollen wurde weder eine Erhöhung des gesamten Gehaltes an nitrierten Proteinen im Dot Blot, noch eine Nitrierung der GAPDH im Western Blot gefunden. Diese Befunde wurden durch Immunfluoreszenzbefunde von Schnitten der Proben bestätigt, bei denen eine Färbung mit Anti-3-Nitrotyrosin-Antikörpern kein Unterschied zwischen behandelten Gehirnen und Kontrollen erkennen ließ (Dr. Heiko Possel, Düsseldorf, persönliche Mitteilung). Weiter wurde untersucht, inwiefern die Behandlung sich auf den Gehalt an freien Thiolen und die GAPDH-Aktivität der Proben auswirkt.

Tabelle 3-4: Quantifizierung freier Thiole und GAPDH-Aktivität in Maushirnen nach transientscher Ischämie und Reperfusion

Hemisphäre	Behandlung	DTNB-reaktive Verbindungen [nmol/mg Protein]	GAPDH-Aktivität [$\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ Protein]
	Sham- Operation	136,5 $\pm$ 7,1	2,6 $\pm$ 0,3
Kontrolle (rechts)	Ischämie ohne Reperfusion	131,9 $\pm$ 14,4	3,1 $\pm$ 0,5
	Ischämie mit Reperfusion	153,8 $\pm$ 4,2	2,2 $\pm$ 0,8
	Sham- Operation	151 $\pm$ 27,4	2,3 $\pm$ 0,3
Behandlung (links)	Ischämie ohne Reperfusion	135,6 $\pm$ 19,1	2,7 $\pm$ 0,6
	Ischämie mit Reperfusion	157,99 $\pm$ 6,8	3,6 $\pm$ 0,1

Gehirne von Mäusen, die wie in Abbildung 3-15 behandelt wurden, wurden auf den Gehalt an freien Thiolen (DTNB-Assay) und GAPDH-Aktivität untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM, n = 4

In Gewebeproben, die wie in 2.5.2 auf den Gehalt DTNB-reaktiver Verbindungen untersucht wurden, zeigten sich weder Unterschiede zwischen behandelter und unbehandelter Hemisphäre noch zwischen den einzelnen Gruppen (Tabelle 3-4). Interessanterweise war die GAPDH-Aktivität (2.5.1) durch Reperfusion

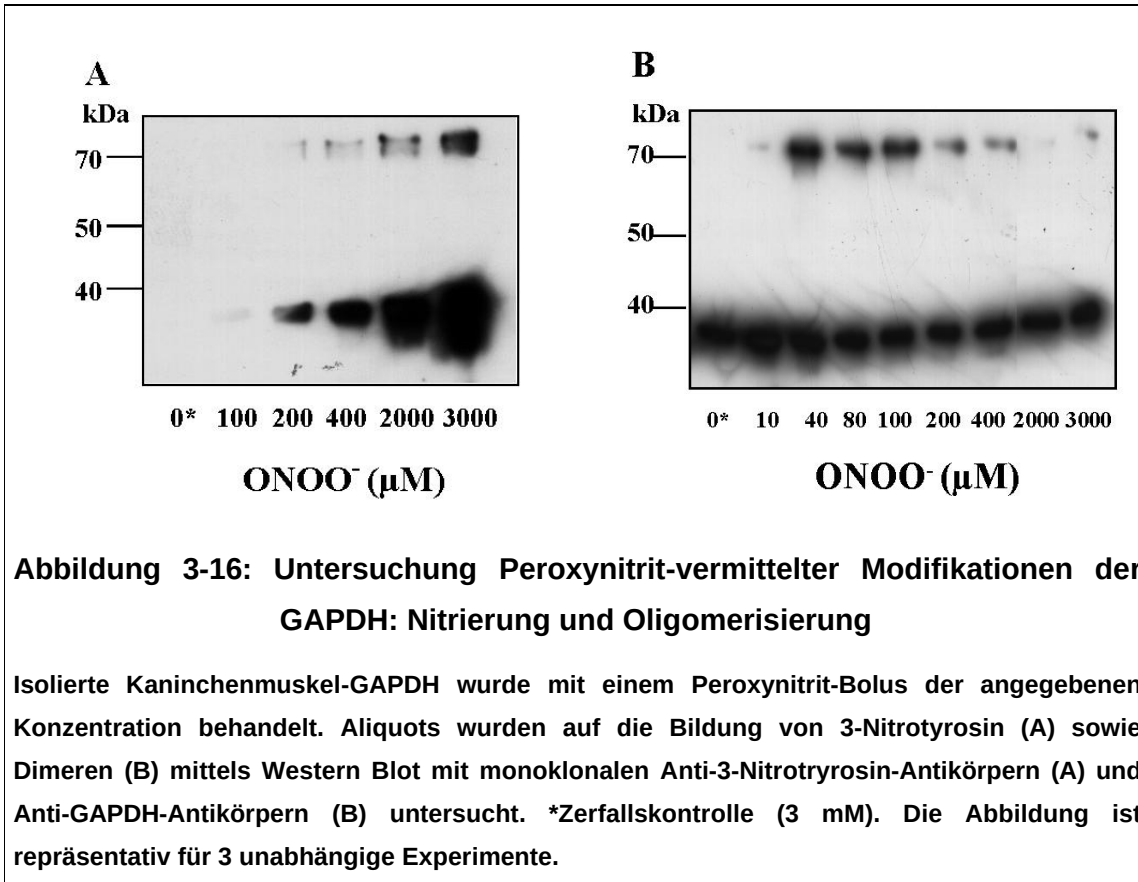
nach Ischämie nicht herabgesetzt. Vielmehr war die Aktivität in der behandelten Hemisphäre im Vergleich zu der kontralateralen Hemisphäre und den Kontrollen leicht erhöht (Tabelle 3-4).

Die Peroxynitritkonzentrationen, die bei der Exposition von Astrozyten mit einem Fließgleichgewicht von ONOO^- auf die Zellen wirken, reichten aus, um GAPDH zu inaktivieren, während das Enzym nicht nitriert wurde und auch die subzelluläre Lokalisation unverändert blieb. Bei Apoplex mit anschließender Reperfusion entsteht ONOO^- in Konzentrationen, die wahrscheinlich deutlich niedriger liegen als die, die in der Infusionsbehandlung verwendet wurden. Unter diesen Bedingungen wird GAPDH weder nitriert noch inaktiviert.

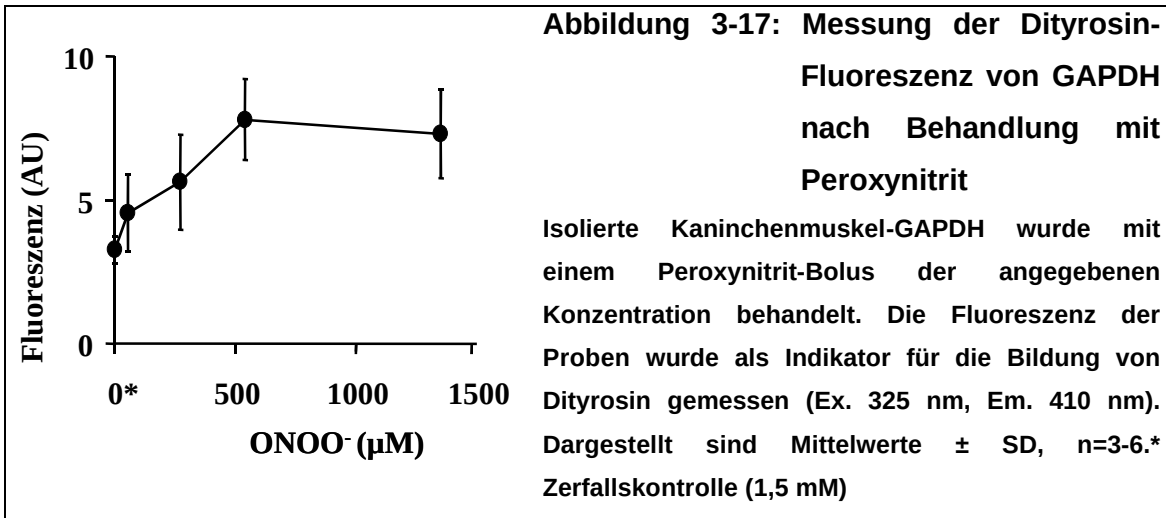
3.3 Analyse durch Peroxynitrit verursachter Schäden an GAPDH

Im obigen Teil der vorliegenden Arbeit erwies sich GAPDH als ein sensitives Zielmolekül für Peroxynitrit. Nitrierung der GAPDH zeigte sich allerdings nur im Hefemodell, wo kumulative Peroxynitrit-Konzentrationen bis 5 mM erreicht wurden. Die gleichfalls dort auftretende Inaktivierung konnte auch bei der Infusion von Peroxynitrit auf Astrozyten beobachtet werden, wobei aber keine Nitrierung mehr nachweisbar war. Im Ischämie/Reperfusions-Modell waren beide Effekte nicht mehr detektierbar. Dies legt den Schluss nahe, dass zum einen die Inaktivierung von GAPDH nicht Folge der Nitrierung war, da Nitrierung erst bei höheren Dosen als die Inaktivierung meßbar war, und zum anderen im Mausmodell sehr niedrige Peroxynitrit-Konzentrationen auftraten, die auch durch die Inaktivierung von GAPDH nicht mehr zu erfassen waren.

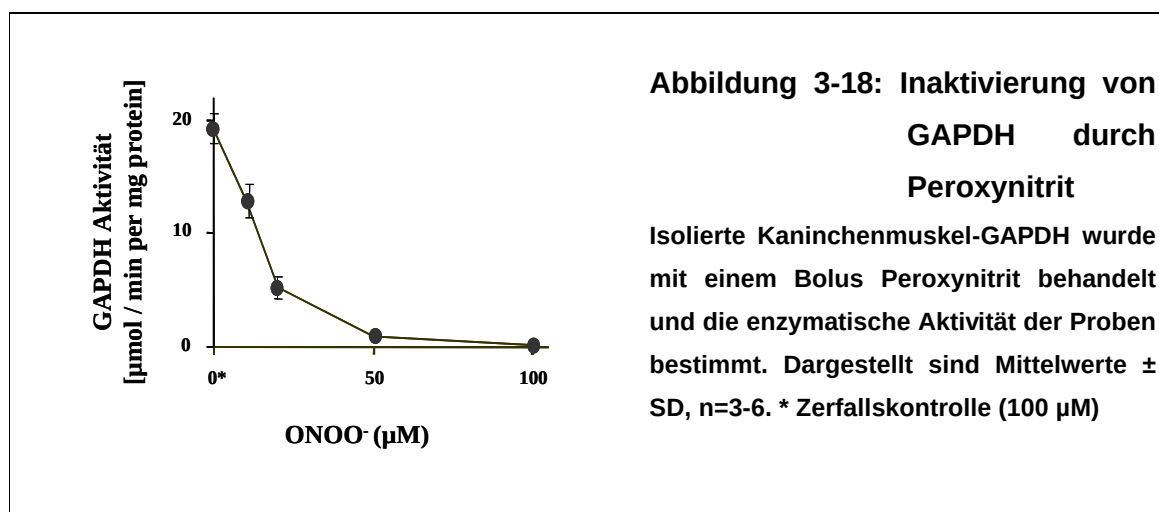
Da die Inaktivierung von GAPDH bei der Infusion durch geringere Konzentrationen ONOO^- verursacht wird als für die Nitrierung des Proteins notwendig, stellte sich die Frage, welche ONOO^- -verursachten Modifikationen am GAPDH-Molekül zu dessen Inaktivierung führen und welche Konzentrationen für die verschiedenen Modifikationen notwendig sind. Um das zu untersuchen, wurde mit dem isolierten Säugerprotein gearbeitet. Mit Kaninchenmuskel-GAPDH (11,6 μM Monomer) konnte eine Nitrierung des Enzyms nach Bolus-Behandlung mit Konzentrationen von Peroxynitrit um 200 μM detektiert werden (Abbildung 3-16 A).



Das Ausmaß der Nitrierung nahm mit steigender Peroxynitrit-Konzentration zu. Die Dimerisierung des Proteins konnte im Western Blot nach Behandlung mit etwa 40 μM Peroxynitrit beobachtet werden (Abbildung 3-16 B). Weil die Gelelektrophorese zur Analyse der Proben unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen durchgeführt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Bindung der GAPDH-Monomere kovalent aber nicht durch Disulfidbindung vermittelt wird. Eine andere Möglichkeit die Dimerisierung zu vermitteln ist die Ausbildung von Dityrosin. Die Bildung von Dityrosinen resultiert in einer nicht durch DTT reduzierbaren, kovalenten Bindung. Charakteristisch für Dityrosine ist ein Fluoreszenzmaximum unter alkalischen Bedingungen (Ex. 325 nm; Em. 410 nm bei pH 9) (Anderson, 1966). Tatsächlich kam es zu einem entsprechenden Fluoreszenzanstieg (Abbildung 3-17), was für die Entstehung von Dityrosin spricht (Lehrer und Fasman, 1967).

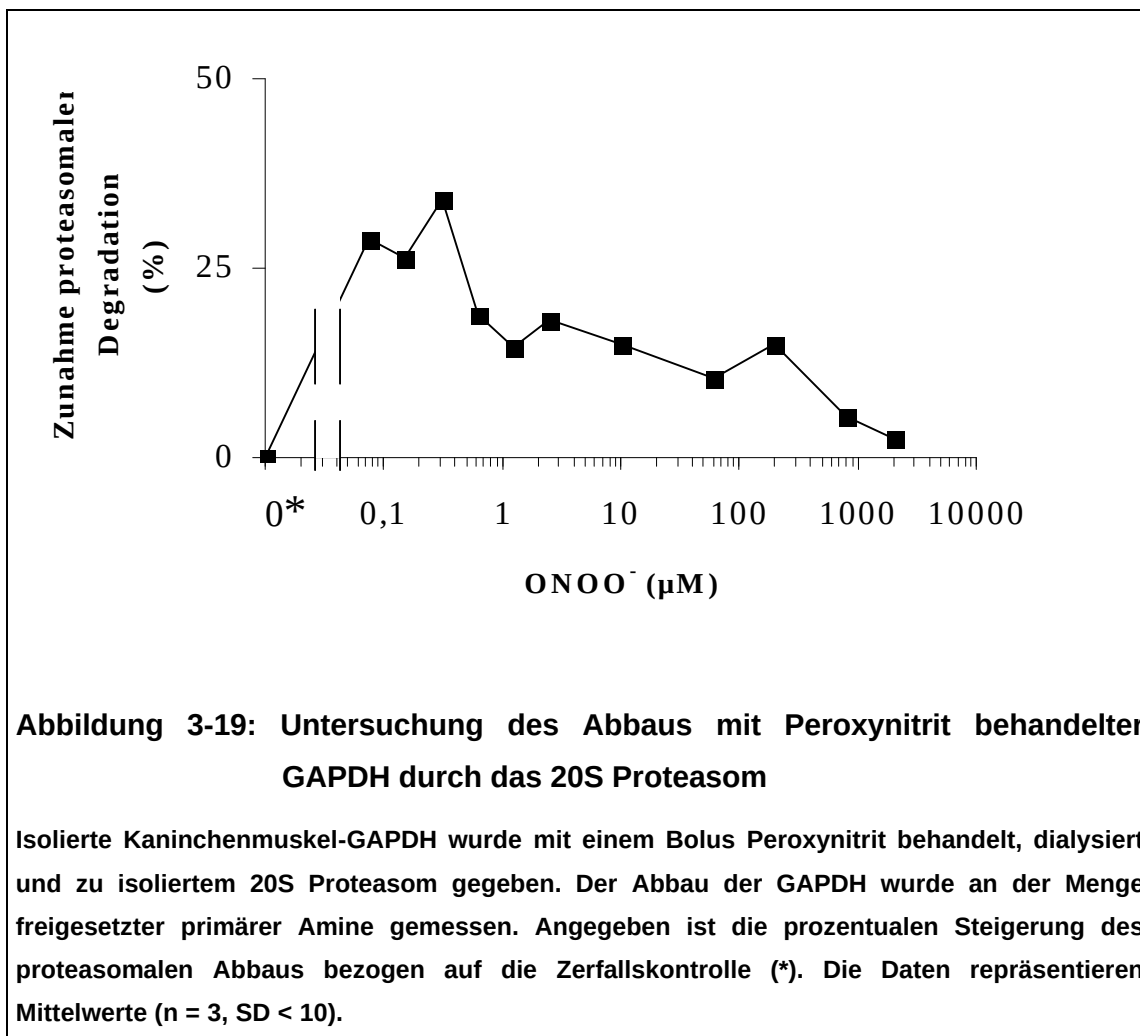


Ab 100 µM wurde das Ausmaß der Dimerbildung geringer, das der Nitrierung stärker (Abbildung 3-16), wobei die Bildung von Dityrosin weiter zunahm (Abbildung 3-17). Die GAPDH-Aktivität ging bei diesen Konzentrationen von Peroxynitrit in Übereinstimmung mit der Literatur (Souza und Radi, 1998) gegen Null (IC_{50} ca. 20 µM, Abbildung 3-18). Das Verschwinden des Dimers bei gleichzeitig steigender Nitrierung mit zunehmender Peroxynitrit-Konzentration kann darin begründet sein, dass zwar weniger Dimer gebildet wird, dieser aber stärker nitriert ist. Da das Ausmaß der Dityrosinbildung dabei nicht abfällt, werden diese wahrscheinlich vor allem intramolekular statt intermolekular ausgebildet.



Zusammen mit PD. Dr. T. Grune (Charité, Berlin) wurde die Suszeptibilität von durch

Peroxynitrit modifizierter GAPDH für das 20S-Proteasom untersucht (2.5.7; Abbildung 3-19).



Der Abbau durch das 20S-Proteasom wurde durch die Behandlung mit Peroxynitrit beschleunigt. Die Proteolyse war schon bei vergleichsweise niedrigen Peroxynitrit-Konzentrationen erhöht. Interessanterweise erreicht die Abbaurate ihr Maximum bei Peroxynitrit-Konzentrationen von ca. 0,3 µM, noch bevor die enzymatische Aktivität halbmaximal gehemmt wurde und fiel mit höheren Konzentrationen schnell wieder ab (Abbildung 3-19, vgl. mit Abbildung 3-18). Bei Behandlung mit ca. 2000 µM Peroxynitrit wurde wieder Kontrollniveau erreicht. Ob die Ursache für den beobachteten Verlust proteolytischer Aktivität in einer massiven Modifikation der GAPDH liegt, die den Umsatz des Protein für das Proteasom unmöglich macht, oder ob eine Schädigung des Proteasoms erfolgt, wurde nicht abschließend geklärt. Wie Experimente mit GAPDH, die mit 20 bzw. 200 µM Peroxynitrit behandelt wurde

zeigten, wurde die Chymotrypsin-Aktivität des 20S-Proteasoms, über den Abbau des fluorigenen Substrates suc-LLVY-MCA gemessen, auf 87 bzw. 70 % verringert. Dieser Faktor, möglicherweise direkt über die Oxidation des Proteasoms vermittelt, ist zumindest partiell an einer geringeren Proteolyserate von GAPDH durch das 20S-Proteasoms beteiligt.

Die Abfolge von Modifikationen durch steigende Konzentrationen Peroxynitrits an isolierter Säuger-GAPDH ist somit, mit steigenden Konzentrationen, erhöhter Abbau durch das 20S-Proteasom, Inhibition der enzymatischen Aktivität, Bildung von Oligomeren und schließlich Nitrierung von Tyrosinresten.

3.4 Schutz vor Peroxynitrit

In Abschnitt 3.3 ist gezeigt worden, dass verschiedene Konzentrationen ONOO^- unterschiedliche Modifikationen der GAPDH zur Folge haben. Dabei sind niedrige Konzentrationen ausreichend, die Suszeptibilität des Enzyms für das 20S-Proteasom zu erhöhen ($< 0,3 \mu\text{M}$, vgl. Abbildung 3-19). Selbst niedrige Peroxynitritkonzentrationen stellen somit eine potentielle Gefährdung zellulärer Funktionen dar. Da ONOO^- *in vivo* in Blutgefäßen entsteht, werden in erster Linie die Blutgefäße auskleidende endotheliale Zellen und angrenzendes Gewebe durch ONOO^- geschädigt. Schutzfaktoren gegen Peroxynitrit müssen gerade dort effizient wirken. Kultivierte Maus-Endothelzellen wurden daraufhin untersucht, inwieweit ONOO^- -induzierte Schäden durch protektive Faktoren unterbunden werden können. Epicatechin wurde als Modell für einen supplementierbaren exogenen Faktor untersucht.

GAPDH aus Kaninchenmuskel (Sigma, Deisenhofen) in Kaliumphosphatpuffer ($8,8 \mu\text{M}$ Monomer in 100 mM pH 7,4) wurde mit verschiedenen Konzentrationen Epicatechin (Sigma, Deisenhofen), das in Methanol zu verschiedenen Stammlösungen verdünnt worden war, versetzt und durch Bolus-Applikation mit verschiedenen Konzentrationen ONOO^- bei Raumtemperatur unter vortexen behandelt. Nach 5 min Postinkubation wurden Aliquots zur Dot-Blot-Analyse (2.6.4) mit 2 x Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert oder zur Messung der enzymatischen Aktivität verwendet (2.5.1). Dot Blot-Analysen ergaben, dass die Behandlung mit ONOO^- -Konzentration von $500 \mu\text{M}$ in Anwesenheit einer

Epicatechin-Konzentration von 50 μM zu keiner detektierbaren Tyrosin-Nitrierung führte. Auch bei höheren Peroxynitrit-Konzentrationen wurde die Nitrierung effizient durch Epicatechin gehemmt. Epicatechin blieb dabei bis zu einem 10fachen molaren Überschuß von ONOO^- wirksam (Abbildung 3-20).

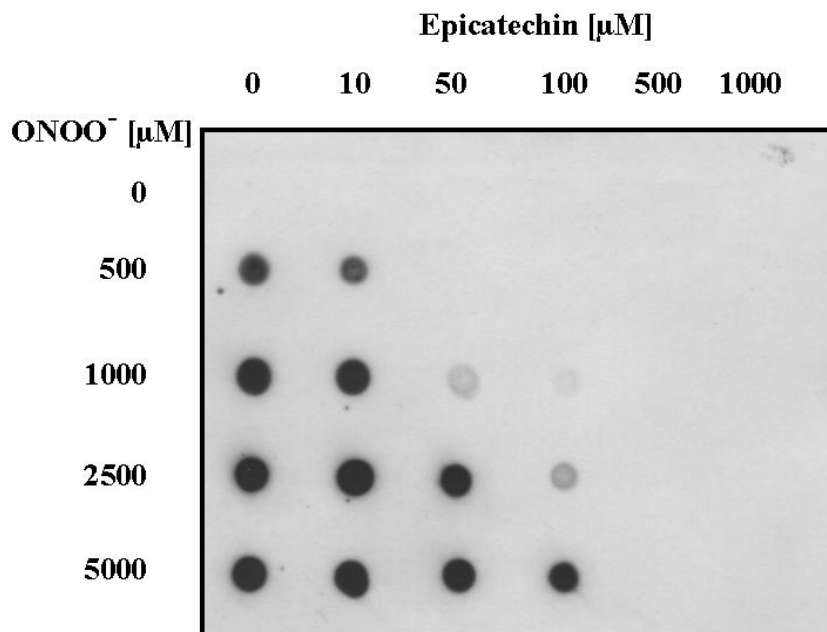


Abbildung 3-20: Untersuchung des Einflusses von Epicatechin auf die Nitrierung von GAPDH

GAPDH (8,8 μM Monomer) wurde mit verschiedenen Dosen Peroxynitrit (Bolus) in Anwesenheit von Epicatechin behandelt und im Dot-Blot analysiert. Detektion erfolgte mit Anti-3-Nitrotyrosin-Antikörpern. Die Abbildung repräsentiert das Ergebnis von 2 unabhängigen Experimenten.

Interessanterweise wurde die ONOO^- -vermittelte Inaktivierung der GAPDH durch Epicatechin, nicht im gleichen Maße gemindert (Tabelle 3-5). Nach Behandlung mit 50 μM Peroxynitrit lag die enzymatische Aktivität (2.5.1) bei rund 3 % (0,6 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ Protein) der Kontrollaktivität (Zerfallskontrolle). Selbst durch Konzentrationen von 1000 μM Epicatechin ließ sich die GAPDH-Aktivität nur bis 20 % der Kontrollaktivität erhalten, wobei alleine die Zugabe von Methanol bereits für Schwankungen von 10 % verantwortlich war (Tabelle 3-5). Die Wirkung des

Methanols als Lösungsmittel für Epicatechin kann deshalb gerade bei Einschätzung der Wirkung von niedrigen Konzentrationen Epicatechins nicht außer Acht gelassen werden. So betrug die GAPDH-Aktivität der Vehikelkontrolle $1,84 \pm 0,1 \mu\text{mol} / (\text{min} \times \text{mg})$ Protein (Tabelle 3-5), während die Aktivität der entsprechenden Kontrolle ohne Methanol nur $0,63 \mu\text{mol} / (\text{min} \times \text{mg})$ Protein betrug (Duplikatmessung, in Tabelle 3-5 nicht gezeigt).

Tabelle 3-5: Untersuchung des Einflusses von Epicatechin auf die Peroxynitrit-vermittelte Inaktivierung von GAPDH

Schutz vor ONOO^- durch Epicatechin [μM]	ONOO^- 50 μM Bolus	Spezifische Aktivität ^c [$\mu\text{mol} / (\text{min} \times \text{mg})$ Protein]	Relative Aktivität
0 ^a	+	$1,8 \pm 0,1$	$1 \pm 0,05$
0 ^b	-	$19,9 \pm 0,52$	$10,8 \pm 0,03$
0,1	+	$1,9 \pm 0,15$	$1 \pm 0,08$
1	+	$1,5 \pm 0,08$	$0,8 \pm 0,05$
10	+	$1,9 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,15$
100	+	$3,4 \pm 0,07$	$1,9 \pm 0,02$
1000	+	$4,0 \pm 0,23$	$2,2 \pm 0,06$

GAPDH (8,8 μM Monomer) wurde mit Peroxynitrit in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen Epicatechin behandelt. Die enzymatische Aktivität wurde photometrisch bei 340 nm durch Anstieg der NADH-Konzentration bestimmt.

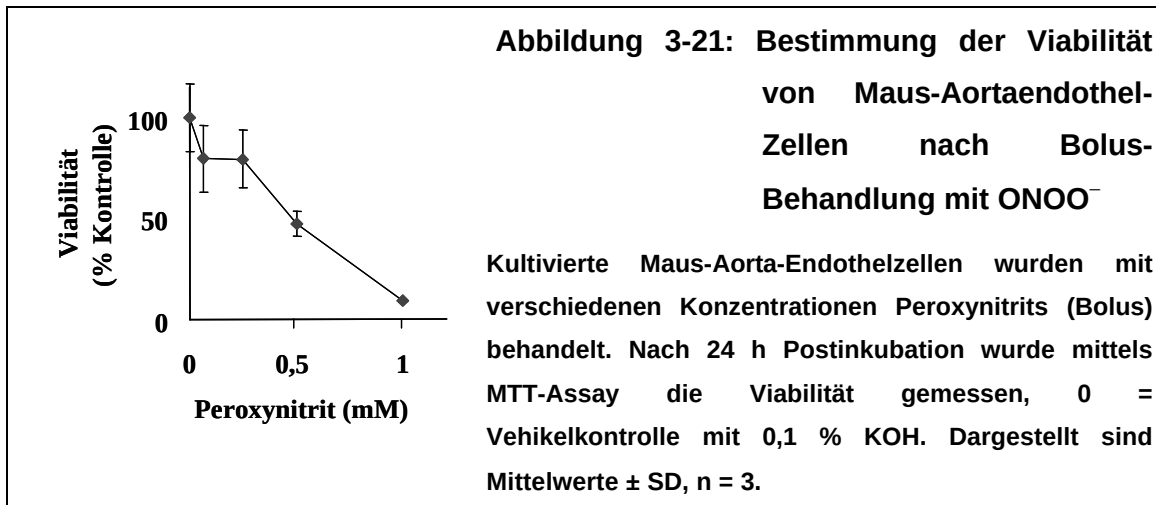
^a Vehikelkontrolle (Methanol)

^b Zerfalls-(50 μM Peroxynitrit) und Vehikelkontrolle (Methanol)

^c Triplikatmessungen, Mittelwerte $\pm$ SD

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob ein Epicatechin-Schutz vor Protein-Nitrierung durch ONOO^- auch in zellulären Systemen besteht. Konfluente Maus-Aorta-Endothelzellen wurden mit PBS gewaschen und dann in PSG-Puffer, dem verschiedene Konzentrationen Epicatechin (in Methanol) zugesetzt worden waren, mit einem Bolus ONOO^- (1 % des Endvolumens) behandelt. Nach 5 min Postinkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und untersucht. Die Wirksamkeit der Peroxynitrit-Behandlung wurde über die Bestimmung der Zell-Viabilität (MTT-Assay, 2.3.2.1) bestätigt (Abbildung 3-21). Bolus-Addition von 500 μM

fürte zu einer Verringerung der Viabilität um ca. 50 %. Bei der Zerfallskontrolle war eine Abnahme der Viabilität auf 83 ± 14 % zu beobachten.



Bei dieser Form der Behandlung war die Toxizität von Peroxynitrit bei einer Reihe von kultivierten Säugerzellen vergleichbar. Bei Maus-Aortaendothelzellen (Abbildung 3-20), Ratten-Aortaendothelzellen, Rattenastrozyten, WB-F344-Rattenleberepithelzellen und menschlichen Hautfibroblastenvon (nicht gezeigt) war die Peroxynitritkonzentration, die zur 50prozentigen Reduktion der Viabilität im MTT-Assay führte um 0,5 mM. Da diese Zellen unterschiedlich schnell wachsen und eine unterschiedliche Morphologie aufweisen, ist es wahrscheinlich, dass die Toxizität von Peroxynitrit über einen gemeinsamen Mechanismus, wie die Zerstörung der Zellmembran, vermittelt wird.

Um einen protektiven Effekt von Epicatechin hinsichtlich der Nitrierung nachzuweisen, wurden die Zellen in Gegenwart von verschiedenen Epicatechin-Konzentrationen mit unterschiedlichen Dosen Peroxynitrits (als Bolus) behandelt. Nach fünfminütiger Postinkubation wurden die Zellen geerntet und zur Western Blot-Analyse verwendet. Der Nachweis von Tyrosinnitrierung erfolgte mit monoklonalen Antikörpern. Die Gegenwart von Epicatechin (34 μM) verhinderte die Nitrierung von Proteinen endothelialer Zellen durch Zugabe von Peroxynitrit vollständig bis zu ONOO^- -Konzentrationen von 580 μM . Selbst eine Behandlung mit einer ONOO^- -Konzentration von 1160 μM führte in Anwesenheit von Epicatechin zu einer deutlich schwächeren Protein-Nitrierung (Abbildung 3-22). Epicatechin kann somit auch die Nitrierung von zellulären Proteinen verhindern. Diese Hemmung tritt auch auf, wenn

das molare Verhältnis von Epicatechin zu Peroxynitrit kleiner als 1 wird. Dieses Ergebnis bestätigt das in Abbildung 3-20 dokumentierte Ergebnis.

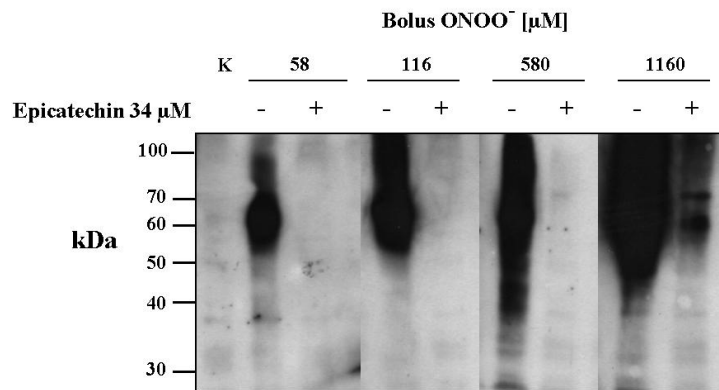


Abbildung 3-22: Untersuchung des Einflusses von Epicatechin auf die Nitrierung von Proteinen endothelialer Zellen durch Peroxynitrit

Kultivierte Maus-Aorta-Endothelzellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen Peroxynitrits (Bolus) in Anwesenheit von Epicatechin (34 μM; +) oder Methanol (-) behandelt, gefolgt von Western Blot-Analyse und Detektion mit monoklonalen Anti-3-Nitrotyrosin-Antikörpern. K: Zerfallskontrolle (1160 μM Peroxynitrit). Die Abbildung repräsentiert das Ergebnis zweier unabhängiger Experimente.

Epicatechin kann durch Peroxynitrit vermittelte Nitrierungsreaktionen auch bei der Behandlung von Endothelzellen effizient unterbinden. Interessanterweise besteht dieser Effekt auch noch, wenn Epicatechin in Konzentrationen vorliegt, die mehr als eine Größenordnung unter der des Peroxynitrits liegen. Das lässt vermuten, dass Epicatechin bei den geringen Konzentrationen, die im Serum gemessen werden, trotzdem einen wirksamen Schutz für Endothelzellen darstellt, die bei pathologischen Prozessen einer starken Belastung von oxidativen und nitrosativen Streß durch Peroxynitrit ausgesetzt sind.

4 Diskussion

4.1 Vergleich der Stressinduktion durch Peroxynitrit und Wasserstoffperoxid in Hefezellen

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden zelluläre Reaktionen auf Peroxynitrit und Wasserstoffperoxid verglichen. *Saccharomyces cerevisiae* wurde als Modell einer eukaryontischen Zelle verwendet. Trotz vieler Gemeinsamkeiten reagierten die Zellen in einigen Punkten unterschiedlich auf die beiden Stressoren. Beispielsweise war Peroxynitrit im Vergleich zu Wasserstoffperoxid toxischer (Tabelle 3-1). Der Grund dafür ist wahrscheinlich, dass Peroxynitrit in Anbetracht seiner Reaktivität relativ langlebig ist. Es kann in das Innere von Zellen diffundieren und diese dort zentral schädigen (Beckman *et al.*, 1990; Koppenol *et al.*, 1992). Selbst unter Bedingungen unter denen Peroxynitrit nur sehr kurz einwirken kann und zu einem großen Teil zerfällt ohne mit zellulären Bestandteilen reagiert zu haben, ist es im Vergleich zu Wasserstoffperoxid der potentere Stressor. Hefezellen sind durch eine hohe intrazelluläre Konzentration von freien Thiolen gegen oxidierende Einflüsse, wie auch Peroxynitrit, geschützt. Die Thiole werden bis zu einem gewissen Grad oxidiert, und damit verbraucht, bevor es zum Absterben der Zelle kommt. Dementsprechend ist die hier gemessene Depletion freier Thiole (Abbildung 3-1) ein sensitiverer Marker für oxidative Belastung als die Toxizität und tritt auch bei niedrigeren Konzentrationen Peroxynitrits auf.

Obwohl *Saccharomyces cerevisiae* unter gewöhnliche Umständen nicht mit Peroxynitrit konfrontiert wird, ist das bei *Candida albicans*, einem humanpathogenen Vertreter der Hefen, der viele Gemeinsamkeiten mit der Bäckerhefe aufweist, anders. Die Immunantwort gegen diesen Pilz wird zu einem erheblichen Teil durch Leukozyten vermittelt, die eine Reihe reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen freisetzen. Peroxynitrit wird dabei als eine zentrale Substanz bei der Abwehr von *Candida albicans* diskutiert (Vazquez-Torres *et al.*, 1995; Vazquez-Torres *et al.*, 1996). Eine erfolgreiche Besiedlung des Wirtes erfordert, dass die exponierten Zellen über Schutzmechanismen gegen Peroxynitrit verfügen. In Hefezellen finden sich eine Reihe protektiver Faktoren, die mit unterschiedlicher Spezifität vor dem Einfluß reaktiver Verbindungen schützen. Ein zellulärer Faktor, der

Hefezellen vor Peroxynitrit und anderen oxidatierenden Substanzen schützen kann ist die Superoxid-Dismutase (Jakubowski *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1996). In Hefezellen kommen allerdings auch Faktoren vor, die stärker vor nitrosativem Stress als vor oxidativen Belastungen schützen. Beispiele sind das Flavohämoglobin oder die S-Nitrosothiole abbauende Glutathion-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase (Liu *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001). Die Relevanz solcher Schutzfaktoren für nichtpathogene Hefen sowie deren Spezifität für die Entgiftung von Peroxynitrit ist in Anbetracht der niedrigen Konzentrationen von reaktiven Stickstoffverbindungen in ihrer Umgebung nicht geklärt, Schutz vor reaktiven Sauerstoffverbindungen ist aber unter aeroben Verhältnissen eine Notwendigkeit. Antioxidative Enzyme wie Catalase und reduktive Äquivalente wie NADPH sowie eine enzymatische Ausstattung, die diese bereit stellt, sind notwendig, um Wachstum in Gegenwart von Oxidantien wie Wasserstoffperoxid zu ermöglichen (Minard und McAlister-Henn, 2001). Einen großer Anteil dieses reduktiven Potentials liegt in Form von Thiolen vor und schirmt Zellen vor oxidativen Belastungen ab.

Die Zellen waren in der Lage die Belastung mit Peroxynitrit gut zu kompensieren, es kam allerdings zu einer vorübergehenden Abnahme der Thiolkonzentration. Dabei sank die Paarungsaktivität der behandelten Zellen (Tabelle 3-2). Zur Steuerung dieses komplexen Vorganges gehört unter anderem ein Zellzyklusarrest, partielle Auflösung der Zellwände sowie polarisiertes Wachstum der beteiligten Zellen (Kurjan, 1993; Sprague, Jr. *et al.*, 1983). Die Regulation des Zellzyklus wiederum wird erheblich vom zellulären Redox-Status beeinflusst. So kann die Behandlung von Hefezellen mit 4-Hydroxy-2-Nonenal wie bei Säugerzellen zu einem Zellzyklusarrest führen. Die Zellteilung wird erst bei Erreichen hoher Konzentrationen von Glutathion wieder aufgenommen (Wonisch *et al.*, 1998). Beteiligt daran ist unter anderem der Transkriptionsfaktor Yap-1, der die Transkription einer Reihe von beteiligten Zellzyklusregulatoren, nach und während der Exposition gegenüber oxidierenden Substanzen wie H_2O_2 , moduliert (Dumond *et al.*, 2000). Substanzen wie H_2O_2 oder die intrazelluläre Generierung von reaktiven Sauerstoffverbindungen durch Menadion können dabei in den exponierten Zellen unterschiedlich auf den Zellzyklus wirken (Flattery-O'Brien *et al.*, 1993; Flattery-O'Brien und Dawes, 1998). Es ist anzunehmen, dass derart komplex regulierte Vorgänge anfälliger für Störungen durch Oxidantien sind als der zelluläre Gehalt freier Thiole oder die Zellviabilität. Damit überein, konnten in dieser Arbeit Störungen

bei der Hefepaarung bei Peroxynitritkonzentrationen beobachtet werden, die die anderen Parameter noch nicht beeinflussen.

Neben der Schutzwirkung freier Thiole wird der angerichtete Schaden durch Hitzeschockproteine und ubiquitinabhängige Degradation von geschädigten Proteinen begrenzt. Die mit Peroxynitrit behandelten Hefezellen reagierten mit einer Aktivierung dieser Schutzmechanismen: Zum einen wurde die Expression von Hitzeschockproteinen der Klasse Hsp70 stimuliert (Abbildung 3-2), zum anderen kam es zu einer Anhäufung ubiquitinierten Proteine (Abbildung 3-3). Interessanterweise hatten Peroxynitrit und H_2O_2 dabei, obwohl beide die zelluläre Redox-Homöostase stören (Abbildung 3-1), unterschiedliche Wirkungen.

An der Regulation der Hsp70-Expression ist u. a. das redox-sensitive Yap1, ein Transkriptionsfaktor der c-jun-Familie, beteiligt (Stephen *et al.*, 1995), der in der Lage ist, Oxidantien wie Wasserstoffperoxid und Diamid zu differenzieren (Wemmie *et al.*, 1997). Von Menadion und H_2O_2 ist bekannt, dass durch sie in Hefezellen differentielle zelluläre Antworten induziert werden (Jamieson, 1992; Jamieson *et al.*, 1994) und dass sie auf unterschiedliche Weise die Regulation des Zellzyklus beeinflussen (Flattery-O'Brien und Dawes, 1998). Auch in komplexeren Systemen wird die Expression von Hsp70 durch Exposition mit radikalgenerierenden Substanzen wie Menadion oder Xanthin/Xanthinoxidase bzw. reaktiven Verbindungen wie Wasserstoffperoxid unterschiedlich stark induziert. Beispiele dafür sind kultivierte Nabelschnurendothelzellen (Jornot *et al.*, 1991) oder ganze perfundierte Rattenherzen (Kukreja *et al.*, 1994). Charakteristische Signaltransduktions-Aktivierungsmuster, die in unterschiedlicher Weise durch reaktive Substanzen induziert werden, sind wahrscheinlich an diesen Differenzierungsleistungen beteiligt. So reagieren HeLa-Zellen auf die Exposition mit Wasserstoffperoxid mit der Aktivierung verschiedener Stress-aktivierter Kinasen, die unterschiedlichen, zum Teil gegensätzlichen Einfluß auf die Zellviabilität haben (Wang *et al.*, 1998). Die Exposition von WB-F344 Rattenleberepithelzellen mit Peroxynitrit oder Wasserstoffperoxid resultiert in unterschiedlicher Aktivierung, von p38-MAPK, JNK und ERK (Schieke *et al.*, 1999). Die Zellantwort unterscheidet sich dabei sowohl durch die aktivierten Kinasen als auch durch das zeitliche Muster der Aktivierung. Charakteristische Aktivierungsmuster werden auch durch die Exposition von Hautfibroblasten mit Singulett-Sauerstoff oder ultravioletter Strahlung induziert (Klotz *et al.*, 1999; Klotz *et al.*, 2000). Die unterschiedliche Aktivierung von Kinasen

wiederum beeinflusst auf Transkriptions- oder Translationsebene das Expressionsprofil der Zellen.

Ähnlich verhält es sich mit der Ubiquitinierung von Proteinen. Kinasen können sowohl Substrate der Ubiquitinierung als auch die an der Ubiquitinierung beteiligten Enzyme phosphorylieren und damit die Ubiquitinierung von Proteinen beeinflussen (zur Übersicht siehe Fuchs *et al.*, 1998). Auch die Expression von Proteinen des Ubiquitinierungsapparates wird in Abhängigkeit von der oxidativen Belastung moduliert. Beispielsweise wird das Polyubiquitinen UBI4 der Bäckerhefe bei Wachstum unter aeroben Bedingungen induziert (Watt und Piper, 1997) und Ubiquitin aktivierende Enzyme werden verstärkt exprimiert (Shang *et al.*, 1997). Neben Änderungen im Expressionsmuster der Zelle kann der Einfluß von Oxidantien auch direkt erfolgen. Untersuchungen an Augenlinsenzellen von Rindern zeigten, dass Ubiquitinierungsreaktionen vom Redox-Status der Zelle abhängen. Die Regulation erfolgt dabei wahrscheinlich direkt über eine Oxidation von Thiolen der aktiven Zentren in Ubiquitin aktivierenden und konjugierenden Enzymen (Obin *et al.*, 1998).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen erhöhte die Behandlung mit Peroxynitrit, im Gegensatz zur Behandlung mit Wasserstoffperoxid, den zellulären Gehalt ubiquitinierten Proteine (Abbildung 3-3). Da beide, ONOO^- und H_2O_2 , Thiole effizient zu oxidieren vermögen, sind wahrscheinlich weitere Komponenten an der Regulation der Ubiquitinierung beteiligt sind. Ein Faktor kann die direkte Schädigung der betreffenden Proteine durch ONOO^- sein. So führt die Inhibition des Proteasoms mit Lactacystin in NT-2 und SK-N-MC Zelllinien zu einer Anhäufung von Proteincarbonylen, ubiquitinierten Proteinen und auch 3-Nitrotyrosin (Lee *et al.*, 2001). Die Anhäufung von 3-Nitrotyrosin ist dabei ein spezifischer Marker für die Wirkung von Peroxynitrit (Greenacre und Ischiropoulos, 2001; Ischiropoulos, 1998; Sampson *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse legen zwar nahe, dass der Abbau von durch Peroxynitrit geschädigten Proteinen proteasomal erfolgt, sprechen aber nicht notwendig dafür, dass nitrierte Proteine auch bevorzugt ubiquitiniert werden.

Damit einhergehende Ergebnisse wurden auch im Rahmen dieser Arbeit erzielt. Bei Immunopräzipitation von ubiquitinierten Proteinen aus Proteineextrakten von Zellen, die zuvor mit Peroxynitrit behandelt wurden, zeigte sich, dass diese nicht verstärkt nitriert waren (Abbildung 3-5). Wie weiter unten angeführt tritt eine

Tyrosinnitrierung erst bei massiven Schäden durch Peroxynitrit auf. Derart stark oxidierte/nitrierte Proteine sind möglicherweise ein schlechtes Substrat für zelluläre Ubiquitinierungssysteme. Die redoxsensitiven aktiven Zentren der beteiligten Enzyme könnten direkt durch hochgradig oxidierte Proteine inaktiviert werden. Ein anderer Grund könnte sein, dass oxidierte/nitrierte Proteine Aggregate bilden und deswegen generell schlechter zugänglich sind. Trotz schwerwiegender Modifikation der betreffenden Proteine könnten diese nicht mehr adäquat mit Ubiquitin markiert werden und wären damit dem ubiquitinvermittelten, proteasomalen Abbau nicht mehr zugänglich.

4.2 Identifikation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als susceptibles Zielprotein für die Wirkung von Peroxynitrit

Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde hier als ein Protein identifiziert, das durch Peroxynitrit in Hefezellen stärker als andere Proteine nitriert wird (Abbildung 3-6, Abbildung 3-7). Dieses Ergebnis entspricht der bekannten Sensitivität der GAPDH gegen Oxidationen. In kultivierten menschlichen Lungenkarzinomzellen führt eine Behandlung mit Wasserstoffperoxid zur raschen, reversiblen Inaktivierung des Enzyms (Brodie und Reed, 1987). Messungen an Kolonepithelzellen von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen zeigen, dass schon die Generierung reaktiver Sauerstoffverbindungen *in vivo* ausreicht, die GAPDH-Aktivität deutlich zu mindern (McKenzie *et al.*, 1996). Neben der pathogenen Bedeutung wird diese hohe Redox-Sensitivität unter anderem auch als regulatorische Komponente der Glykolyse diskutiert (Danshina *et al.*, 2001).

Reaktive Stickstoffverbindungen können gleichfalls die GAPDH-Aktivität beeinträchtigen. Das Enzym wird durch Behandlung mit Peroxynitrit inaktiviert (Souza und Radi, 1998) und am Cystein des aktiven Zentrums durch Peroxynitrit und Stickstoffmonoxid nitrosyliert (Mohr *et al.*, 1994; Mohr *et al.*, 1999). In der hier vorliegenden Arbeit konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die GAPDH von intakten Hefezellen durch Peroxynitritbehandlung stärker nitriert wird als andere zelluläre Proteine. Zur Durchführung der Experimente in dieser Arbeit wurde selbst hergestelltes Peroxynitrit in relativ hohen Konzentrationen verwendet. Die Nitrierung der GAPDH findet aber auch unter Bedingungen statt in denen Peroxynitrit in

niedrigen Konzentrationen im Organismus von körpereigenen Phagozyten und Endothelzellen gebildet wird. Bei der Untersuchung des Proteoms von Rattenzellen, die in Kultur und *in vivo* inflammatorischen Bedingungen ausgesetzt wurden, wurde neben anderen Proteinen auch eine Nitrierung der GAPDH gefunden (Aulak *et al.*, 2001). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die im Rahmen dieser Arbeit erstmalig gefundene GAPDH-Nitrierung (Buchczyk *et al.*, 2000) *in vivo* von Bedeutung ist. Unklar ist bislang, ob die Nitrierung des Enzyms eine Rolle bei pathologischen Prozessen spielt oder nur gehäuft unter diesen Bedingungen auftritt.

Die enzymatische Aktivität der GAPDH von Hefezellen (Abbildung 3-8) und kultivierten Rattenastrozyten (Abbildung 3-14) wurde durch Behandlung mit Peroxynitrit inhibiert. In kultivierten Astrozyten erwies sich das Enzym als sensibler als das Hefeenzym. Die Ursache liegt wahrscheinlich in der Zellwand der Hefezellen, die einen beträchtlichen Teil des Peroxynitrits vor Erreichen der Zellmembran abfängt. Die Inaktivierung bei niedrigen Konzentrationen Peroxynitrits deckt sich mit der hohen Redox-Sensitivität der GAPDH, wobei Peroxynitrit trotzdem als sehr potenter Inhibitor der GAPDH-Aktivität angesehen werden muß. Ein molares Verhältnis von rund 1:1 (Peroxynitrit : GAPDH) war hinreichend, um die enzymatische Aktivität zu halbieren (Abbildung 3-18). In früheren Studien (Souza und Radi, 1998) wurde eine 50%ige Inaktivierung des Enzyms (7 μM Tetramer) durch 17 μM Peroxynitrit erreicht. Dieses Verhältnis von GAPDH zu Peroxynitrit entspricht in etwa den hier gemachten Beobachtungen. In den Arbeiten von Souza und Mitarbeitern wurde für die Reaktion von GAPDH mit Peroxynitrit eine Reaktionskonstante zweiter Ordnung von $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ beschrieben. Zum Vergleich reagierte GAPDH und Stickstoffmonoxid unter anaeroben Bedingungen wesentlich langsamer ($11 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Die Identifikation der GAPDH als sensibles Zielprotein für Peroxynitrit steht damit in Einklang mit einer Reihe anderer Beobachtungen, die *in vitro* und *in vivo* gemacht wurden. Das legt nahe, dass die hohe Sensitivität von GAPDH gegenüber Peroxynitrit auch unter pathologischen Bedingungen, bei denen Peroxynitrit *in vivo* entsteht, eine Rolle spielen kann. Bei Untersuchungen von Hirngewebeproben mit Ischämie/Reperfusionsschaden konnte allerdings kein Anhaltspunkt für eine verstärkte Nitrierung oder Inaktivierung der GAPDH gefunden werden (Abbildung 3-15, Tabelle 3-4). Das gewählte Modell ist allerdings durch eine kurze Reperfusionszeit charakterisiert. Die induzierbare Form der NO-Synthase

(iNOS) wird wahrscheinlich erst nach längeren Reperfusionzeiten in dem Ausmaß induziert, dass genügend NO für eine signifikante Peroxynitritsynthese zur Verfügung steht. In der Zwischenzeit kann die konstitutive, neuronale bNOS nicht ausreichend NO liefern. Längere Reperfusionzeiten würden wahrscheinlich eine Induktion der iNOS und vermehrte Produktion von NO erlauben und damit erst die Entstehung von Peroxynitrit ermöglichen.

Die Annahme liegt nahe, dass die Sensitivität der GAPDH gegenüber Peroxynitrit vor allem einen Einfluß auf die Energieproduktion von Peroxynitrit-behandelten Zellen hat. Dabei ist nicht abschließend geklärt, ob bei der toxischen Wirkung von Peroxynitrit, die Inaktivierung der GAPDH im Vordergrund steht. Es wurden auch Anhaltspunkte dafür gefunden, dass bei niedrigen Peroxynitritkonzentrationen, die noch nicht zu einer Inaktivierung führen, bereits Störungen im proteasomalen Umsatz des Enzyms auftreten (vgl. 4.4). Untersuchungen unter Verwendung hoher Konzentrationen Peroxynitrits sprachen darüber hinaus gegen eine Beteiligung durch Peroxynitrit geschädigter GAPDH bei der Aggregation von Huntingtin.

4.3 Einfluß Peroxynitrit-modifizierter GAPDH auf die Aggregation von Huntingtin

Im Folgenden wurde untersucht ob die hohe Peroxynitrit-Suszeptibilität der GAPDH Einfluß auf die Proteinaggregation eines rekombinant exprimierten, verkürzten Huntingtinproteins (pathologische Formen des Exon 1 des Huntingtin-Gens) hat. Weder *in vitro* (Abbildung 3-10) noch für in Hefezellen exprimiertes Huntingtin (Abbildung 3-11) konnte ein Einfluß von GAPDH auf die Aggregation gezeigt werden. Darüber hinaus war die Aggregation von Huntingtin im Hefemodell unbeeinflusst von einer Behandlung mit Peroxynitrit und führte auch nicht zu einer Koaggregation mit GAPDH (Abbildung 3-12).

Eine Interaktion von GAPDH und Huntingtin (Burke *et al.*, 1996); Mazzola und Sirover, 2001) wird wie Peroxynitrit (Deckel *et al.*, 2001) als einflußnehmender Faktor bei der noch weitgehend unverstandenen Ätiologie der Chorea Huntington diskutiert. Angenommen wird, dass GAPDH bei der Pathogenese der Chorea Huntington, neben dem Verlust der enzymatischen Aktivität, über eine Interaktion mit Huntingtin, dessen Aggregation beeinflusst. So führt die Denaturierung von GAPDH

durch Guanidinhydrochlorid oder Erhitzen zu einer vermehrten Aggregationsneigung des Enzyms (Lin *et al.*, 1990). Dieser Prozeß wiederum kann durch die Anwesenheit von Proteindisulfidisomerase inhibiert werden (Cai *et al.*, 1994), was dafür spricht, dass Redox-Reaktionen, und damit auch ggf. Peroxynitrit, bei der Aggregation eine Rolle spielen können.

Es gibt andere Proteine, die einen erheblichen Einfluß auf den Aggregationsprozeß des Huntingtins haben. Beispielsweise können Hsp70 und Hsp40 diesen Vorgang erheblich verzögern (Muchowski *et al.*, 2000). Die Annahme, dass ein oxidativ/nitrosativ modifiziertes Protein wie GAPDH, mit Affinität zu Huntingtin, den Aggregationsprozeß auch beeinflussen kann, war nicht zutreffend. Im Sinne eines Modells, das die Pathogenität einer aberanten Form des Huntingtins im Vordergrund hat, ist eine mögliche Erklärung, dass die Polyglutaminbereiche des Huntingtins der maßgebliche Faktor für dessen Aggregation sind. Die Aggregation der hier untersuchten Form des Huntingtins liefere in diesem Fall bereits optimiert ab und die Präsenz anderer Faktoren wie GAPDH wären für diesen Prozeß von untergeordneter Bedeutung.

Die Behandlung des Huntingtins mit Peroxynitrit zeigte keine Wirkung (Abbildung 3-11). Dabei gibt es Beispiele für den Einfluß von oxidierenden Substanzen auf die Aggregation anderer Proteine wie die Wirkung von Hydroxylradikalen auf α -Synuclein (Kim *et al.*, 2002) oder von Peroxidradikalen auf Coeruloplasmin (Kang *et al.*, 2001). Es wird auch angenommen, dass oxidative Modifikationen die Aggregation von Huntingtin fördern (Browne *et al.*, 1999) und es gibt sogar Hinweise darauf, dass die Aggregation von Huntingtin durch Peroxynitrit verstärkt wird (Deckel *et al.*, 2001). Die Ergebnisse von Deckel und Mitarbeitern wurden bei Untersuchungen eines Chorea Huntington-Mausmodells durch NOS-Hemmung mit N-Nitro-L-Arginin-methylester (L-NAME) erzielt. In der vorliegenden Untersuchung eines rekombinant exprimierten Huntingtinproteins konnten selbst hohe Dosen Peroxynitrits die Aggregation nicht beschleunigen oder verlangsamen, obwohl zum Teil mit Konzentrationen gearbeitet wurde, die bei GAPDH bereits zu massiven Modifikationen wie Oxidation, Dimerisierung und Nitrierung führen.

Die Relevanz und Spezifität der Bindung von GAPDH an Huntingtin für die Aggregation von Huntingtin ist nicht geklärt. Das Huntingtinprotein in seiner gesamten Länge innerhalb von Nervenzellen wird sich im Hinblick auf die Sensitivität gegenüber Peroxynitrit und die Interaktion mit GAPDH wahrscheinlich anders

verhalten als die hier verwendete, auf das Exon 1 verkürzte und in Bäckerhefe exprimierte Form. Die Beobachtungen dieser Arbeit sprechen allerdings dafür, dass GAPDH und Peroxynitrit bei der Aggregation des Huntingtins eine eher untergeordnete Bedeutung zukommt. Ferner lassen sie vermuten, dass die Huntingtinaggregation bis zu einem gewissen Grad resistent gegenüber äußeren Einflüssen ist.

4.4 Sequenz Peroxynitrit-vermittelter Modifikationen an GAPDH

Nitrierung und Inaktivierung der GAPDH erfolgte im Hefemodell (Zugabe von Peroxynitrit zu einer Suspension von Hefezellen, vgl. 3.1) bei Behandlung mit vergleichsweise hohen Peroxynitrit-Konzentrationen. Mit sinkenden Konzentrationen Peroxynitrits wurde GAPDH zunächst nicht mehr nitriert (Infusion von Peroxynitrit auf kultivierte Rattenastrozyten zur Erreichung einer Fließgleichgewichtsexposition, vgl. 3.2.1), dann auch nicht mehr inaktiviert (Ischämie/Reperfusion im Maushirn, vgl. 3.2.2). Neben allen Unterschieden, die diese Ansätze aufweisen werden diese Ergebnisse wahrscheinlich zum großen Teil durch die unterschiedlichen Konzentrationen Peroxynitrits bedingt, wofür auch Experimente mit isolierter GAPDH sprechen.

Bei diesen Untersuchungen zeichnete sich Folgendes ab: Die Aktivität des Enzyms war nach Behandlung mit 10 μM Peroxynitrit schon deutlich vermindert (Abbildung 3-18). Höhere Konzentrationen (ca. 200 μM) führten zur Bildung von Nitrotyrosin (Abbildung 3-16). Konzentrationen dazwischen (ab. 40 μM) bewirkten die Bildung von kovalent verknüpften GAPDH-Oligomeren (Abbildung 3-16). Die Oligomerisierung erfolgte wahrscheinlich über die Bildung von Dityrosin. Für die Entstehung von Dityrosin spricht eine korrelierte Veränderung der Fluoreszenz von GAPDH (Abbildung 3-17) in einer für Dityrosin charakteristischen Art (van der Vliet *et al.*, 1994).

Die Sequenz der beobachteten Wirkungen des Peroxynitrits auf GAPDH impliziert, dass weder die Bildung von Dityrosin noch von Nitrotyrosin primär zur enzymatischen Inaktivierung der GAPDH beiträgt und dass die Inaktivierung der GAPDH, im Vergleich zur Nitrierung von Tyrosinresten, der sensitivere Marker für die Wirkung von Peroxynitrit ist. Obwohl die Inaktivierung der GAPDH, im Gegensatz zur

Nitrierung, nicht spezifisch für die Wirkung von Peroxynitrit ist, sprechen die niedrigen Konzentrationen Peroxynitrits, die notwendig sind, um die glykolytische Funktion der GAPDH zu stören, dafür, dass GAPDH auch *in vivo* ein sensibler Angriffspunkt für Peroxynitrit ist. Bei der Immunabwehr z. B. ist die GAPDH von sich rasch teilenden Mikroorganismen ein guter Angriffspunkt für das Immunsystem. Mit der Inaktivierung durch freigesetzte reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen wird die Energiegewinnung des Krankheitserregers effizient an einem zentralen Punkt gehemmt. Diese Eigenschaften können aber auch zu pathologischen Prozessen beitragen. So wird die oxidative, irreversible Inaktivierung der GAPDH beispielsweise als Ursache für die Neurotoxizität von 6-Hydroxy-Dopamin diskutiert (Hayes und Tipton, 2002). Bei Versuchen mit einem *in vitro*-Modell der Bluthirnschranke war deren Zusammenbruch vor allem auf eine Hemmung der GAPDH zurückzuführen. Stickstoffmonoxid erwies sich in diesen Versuchen sogar effizienter als der GAPDH-Inhibitor Iodoacetat (Hurst *et al.*, 2001).

Es traten in der vorliegenden Arbeit Peroxynitrit-verursachte Schäden bei weit niedrigeren Dosen Peroxynitrits auf. Peroxynitrit beschleunigte den proteolytischen Umsatz der GAPDH bei Konzentrationen, die rund zwei Größenordnungen niedriger als für eine Inaktivierung nötig waren. Die Suszeptibilität der GAPDH für den Abbau durch das 20S-Proteasom erreichte ein Maximum bei Peroxynitrit-Konzentrationen von ca. 0,3 μM (Abbildung 3-19). Es kommt dabei wahrscheinlich zu geringen oxidativen Veränderungen, die das 20S Proteasom erkennt und die den proteasomalen Abbau beschleunigen. Diese Veränderungen sind aber noch nicht gravierend genug, um GAPDH zu inaktivieren. Peroxynitrit-Behandlung kann allerdings auch einen gegenteiligen Effekt haben und den Umsatz von behandelten Proteinen, wie α -Synuclein in HEK 293 Zellen, verzögern und zur Anhäufung aggregierter, nicht mehr abbaubarer Proteine führen (Paxinou *et al.*, 2001). Für den proteolytischen Umsatz moderat oxidiert/nitrierter Proteine ist dabei das 20S-Proteasom wahrscheinlich bedeutender als das Ubiquitin- und ATP-abhängige 26S-Proteasom (Davies, 2001) wofür auch Untersuchungen von Hefemutanten sprechen, die kein funktionales 26S-Proteasom synthetisieren können und nur über das 20S-Proteasom verfügen (Inai und Nishikimi, 2002).

Interessanterweise verringerte sich die Abbaurate von GAPDH durch das Proteasom bei höheren Peroxynitrit-Konzentrationen wieder. Dieser biphasische Effekt von Peroxynitrit wurde auch in Studien an Aconitase und Ferritin beobachtet

und damit erklärt, dass stärkere Modifikationen das Proteins als Substrat des 20S Proteasoms unbrauchbar machen (Grune *et al.*, 1998). Auch andere Oxidantien vermittelten ähnliche Effekte, wobei das Maximum der proteolytischen Suszeptibilität schon bei niedriger Belastung erreicht sein kann. Durch Bestrahlung mit Co^{60} generierte Hydroxylradikale wurden zur Oxidation von α -Kristallin, einem Augenlinsenprotein, verwendet, wobei mit steigender Dosis der proteasomale Abbau des Proteins zunahm. Bei einer Bestrahlungsdosis, die zur Bildung von 2,3 mol Hydroxylradikale pro mol Protein führte, erreichte die Proteolyserate ein Maximum und fiel bei höheren Dosen wieder ab (Murakami *et al.*, 1990). Weitere Beispiele, für ähnliche biphasisch Einflüsse von Oxidantien auf den Umsatz von Proteinen sind die Wirkung von Wasserstoffperoxid auf Hämoglobin (Giulivi *et al.*, 1994), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase nach Behandlung mit Hypochloriger Säure (Ullrich *et al.*, 1999), oder Ferritin nach Oxidation mit Xanthin/Xanthinoxidase, Sin-1 oder Wasserstoffperoxid (Rudeck *et al.*, 2000). Das hier für Peroxynitrit-geschädigte GAPDH gefundene konzentrationsabhängige Proteolyseprofil findet sich damit bei einer Reihe anderer Proteine und Oxidantien wieder.

Unklar ist, welche Veränderungen an den betreffenden Proteinen letztlich zu dem gesteigerten Umsatz durch das 20S-Proteasom führen. Eine kovalente Modifikation, die mit der verstärkten, ubiquitinunabhängigen Proteolyse durch das Proteasoms einhergeht, ist die Bildung von Dityrosin (Giulivi und Davies, 1993). Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass die Bildung von Dityrosin, gemessen an Dimerisierung von GAPDH, mit einer gesteigerten Proteolyse korreliert, die beiden Effektmaxima aber nicht im gleichen Konzentrationsbereich liegen (Abbildung 4-1). Weil das Proteolyse-Maximum früher als das Maximum der Dityrosin- oder Nitrotyrosinbildung erreicht wird, ist es wahrscheinlich, dass diese Proteinmodifikationen nicht die gesteigerte proteolytische Suszeptibilität von peroxynitritbehandelter GAPDH bewirken, sondern dass dieser Effekt durch andere Einflüsse wie durch Oxidation des Proteins, verursacht wird.

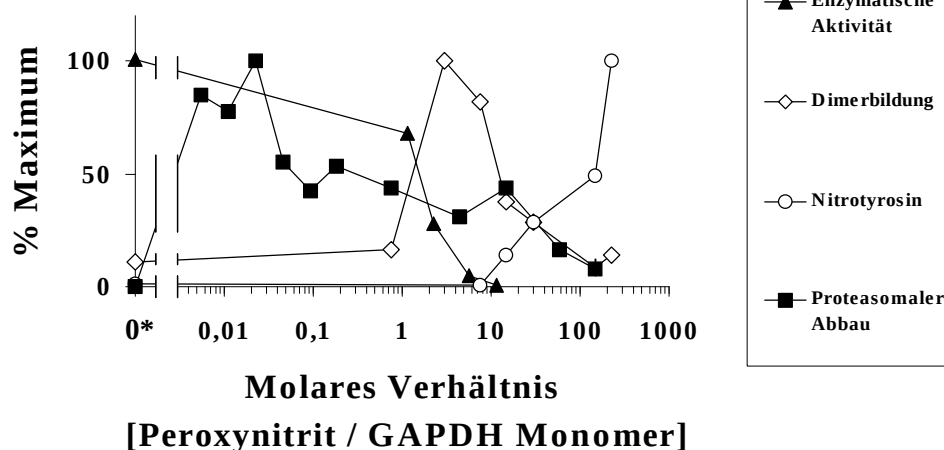


Abbildung 4-1: Abfolge Peroxynitrit-vermittelter Modifikationen an GAPDH

Zusammengefaßt sind Abbildung 3-16, Abbildung 3-18 und Abbildung 3-19. Die verwendeten Peroxynitrit-Konzentrationen wurden auf die verwendeten GAPDH-Konzentrationen normiert. Die Western Blots in Abbildung 3-16 wurden densitometrisch quantifiziert. Dargestellt sind % des jeweils beobachteten Maximalwertes der enzymatischen Aktivität (Dreieck), proteasomalen Abbaus (gemessen als Freisetzung primärer Amine; Quadrat), Dimerbildung (Bandenintensität im Western Blot; Raute) und Nitrotyrosin (Bandenintensität im Western Blot; Kreis) in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis eingesetzter Peroxynitritkonzentration zur eingesetzten Konzentration GAPDH (Monomer).

Neben der Inaktivierung der GAPDH können die betroffenen Zellen damit auch durch einen beschleunigten proteolytischen Umsatz des Enzyms beeinträchtigt werden. Dazu kommt, dass sowohl eine direkte Oxidation des Proteasoms durch Oxidantien wie z. B. Wasserstoffperoxid als auch die Präsenz von oxidierten Proteinen das Proteasom inaktivieren können (Reinheckel *et al.*, 1998). Diese Abnahme proteasomaler Aktivität aufgrund oxidativer Belastung ist nicht nur bei Untersuchungen des isolierten Proteasoms nachweisbar, sondern findet sich auch in komplexen Systemen wie den Herzen (Bulteau *et al.*, 2002) und ZNS (Keller *et al.*, 2000) alternder Ratten. Bei der Alterung von kultivierten Fibroblasten werden (Sitte *et al.*, 2000a) vergleichbare Ergebnisse dahingehend interpretiert, dass niedrige Mengen oxidierten Proteins die Funktionalität des Proteasoms beeinträchtigen, was zuletzt zu der massiven Anhäufung oxidierter Proteine, bekannt als Ceroid, Alterspigment, oder Lipofuscin führt (Sitte *et al.*, 2000b). Die Hemmung des 20S-Proteasom erfolgt auch durch die Präsenz durch Peroxynitrit oxidierten/nitrierten

Proteine (Grune *et al.*, 2001). Damit einher war auch GAPDH nach Behandlung mit niedrigen Konzentrationen Peroxynitrits in der Lage das 20S-Proteasom merklich zu hemmen.

Die hohe Suszeptibilität von GAPDH gegen Peroxynitrit kann damit auf verschiedene Weise zu einer Zellschädigung beizutragen. Niedrige Konzentrationen von Peroxynitrit können die glykolytische Funktion der GAPDH beeinträchtigen, indem das Enzym inaktiviert und darüber hinaus beschleunigt über das 20S Proteasom abgebaut wird. Höhere dagegen inhibieren den Abbau des Proteins und führen zu einer Anhäufung glykolytisch inaktiven Enzyms, das nicht mehr proteasomal abgebaut werden kann und auch den Abbau anderer Proteine hemmt. Es ist nicht geklärt, welche Wertigkeit die verschiedenen Schädigungsmechanismen *in vivo* haben. Unter der Annahme, dass im Organismus Peroxynitrit auch unter pathologischen Bedingungen nur in niedrigen Konzentrationen auftritt, erscheint auf den ersten Blick die Beeinträchtigung glykolytischer Prozesse wichtiger. Wahrscheinlich aber kann eine Belastung mit niedrigen Konzentrationen Peroxynitrits kurzzeitig gut vom Organismus kompensiert werden. Sie führt auf Dauer allerdings durch hohe kumulative Konzentrationen Peroxynitrits auch zu massiven Proteinmodifikationen wie der Tyrosinnitrierung wie die Ergebnisse von Aulak *et al.* (2001) zeigen. Gerade solche Schädigungen, denen der Organismus nichts mehr entgegen setzen kann, belasten zelluläre Funktionen erheblich und erfordern die Anwesenheit schützender Substanzen.

4.5 Schutz vor Peroxynitrit

Im Folgenden wurde GAPDH als sensibles Zielmolekül für Peroxynitrit dazu verwendet, den Schutzeffekt des Flavanols (-) Epicatechin gegen Peroxynitrit abzuschätzen. Interessanterweise war Epicatechin unterschiedlich gut in der Lage, Peroxynitrit-vermittelte Oxidationen und Nitrierungen zu verhindern. Die Nitrierung von GAPDH wurde durch Epicatechin effizient verhindert (Abbildung 3-20). Mit kultivierten endothelialen Zellen wurde ein ähnlicher Effekt beobachtet (Abbildung 3-22). Deutliche Wirkung war selbst noch bei einem 20-30fachen molaren Überschuß von Peroxynitrit gegenüber Epicatechin zu beobachten. Der Einfluss von Epicatechin auf die Inaktivierung des Enzyms durch ONOO^- war dagegen schwach (Tabelle 3-5).

Selbst hohe Konzentrationen an Epicatechin konnten die Inaktivierung des Enzyms nur zu einem geringen Anteil verhindern.

Polyphenole können Oxidations- (Haenen *et al.*, 1997) und Nitrierungsreaktionen (Pannala *et al.*, 1997) unterbinden. Dies gilt auch für Epicatechin und seine Oligomere (Arteel und Sies, 1999). Neben GAPDH konnte auch für die Lipoxxygenase 1, Zelllysate sowie kultivierte, endotheliale Zellen gezeigt werden, dass Oxidationsreaktionen im Vergleich zu Nitrierungsreaktionen bei höheren Epicatechinkonzentrationen unterbunden werden (Schroeder *et al.*, 2001). Die gegen Oxidation wirksame Konzentration lag dabei rund 2 Größenordnungen über der für die Nitrierung wirksamen.

Zunächst mag diese Selektivität des Epicatechin seinen Wert als Schutzsubstanz gegen den peroxynitritinduzierten Stress einschränken. Da aber Oxidation und Nitrierung in biologischen Systemen nicht immer eindeutig voneinander zu trennen sind, ist es schwierig vorauszusagen, welcher Effekt die größere Rolle spielt. In Hinblick auf die oben diskutierte konzentrationsabhängige Sequenz von Peroxynitrit-vermittelten Protein-Modifikationen ist zu vermuten, dass Epicatechin kaum vor einer Inaktivierung und wahrscheinlich auch nicht vor einem beschleunigten Abbau der GAPDH *in vivo* schützen kann. Allerdings könnte Epicatechin einer Anhäufung massiv oxidiert/nitrierter Proteine gegenwirken, die nicht nur keinem proteasomalen Abbau mehr zugänglich sind, sondern auch den normalen Proteinumsatz der Zelle durch das Proteasom stören. Epicatechin stellt damit einen potentiellen Schutzfaktor gegen Peroxynitrit, dar, der zudem auf eine attraktive Art über Genußmittel wie Tee, Rotwein oder Schokolade supplementierbar ist.

5 Zusammenfassung

Peroxynitrit ist das hochreaktive Produkt einer Reaktion des im Organismus gebildeten Stickstoffmonoxids und Superoxidradikalanions. Vornehmlich im Entzündungsgeschehen gebildet, vermag es unter anderem Proteine zu oxidieren und/oder zu nitrieren. In Bäckerhefe als Modell eukaryontischer Zellen erwies sich Peroxynitrit anhand des Gehaltes freier Thiole, der Viabilität und Paarungsaktivität sowie der Induktion von Hitzeschockproteinen (Hsp70) und der Anhäufung ubiquitinerter Proteine als potenter Stressor. Ein Protein, das in stärkerem Maße als andere durch Peroxynitrit an Tyrosinresten nitriert wurde, wurde als Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) identifiziert.

Im Folgenden wurde die pathologische Bedeutung der hohen Peroxynitrit-Sensitivität der GAPDH untersucht. Beide, Peroxynitrit und GAPDH, werden als einflussnehmende Faktoren bei der Pathogenese der Chorea Huntington diskutiert. Die Aggregation des Exon 1 von Huntingtin, das als ursächliches Ereignis für die Entstehung dieser Krankheit angenommen wird, erwies sich im Hefemodell als resistent gegenüber Peroxynitritbehandlung und der Präsenz Peroxynitrit-geschädigter GAPDH. Ferner stellte sich heraus, dass die enzymatische Aktivität der GAPDH, verglichen mit der Nitrierung im Hefemodell, der sensitivere Parameter für eine Schädigung durch Peroxynitrit ist. In zunehmend komplexeren Ansätzen, wurde GAPDH zunächst nicht mehr nitriert (Fließgleichgewichtsexposition von kultivierten Rattenastrozyten) und dann auch nicht mehr inaktiviert (Ischämie/Reperfusion im Mausapoplexmodell). Untersuchungen an isolierter Kaninchenmuskel-GAPDH zeigten, dass die Nitrierung erst durch vergleichsweise hohe Konzentrationen Peroxynitrits (ca. 200 μM) verursacht wurde. Deutlich niedrigere führten zu einer Oligomerisierung (ca. 40 μM) und zur Inaktivierung (ca. 10 μM) des Enzyms.

Die Suszeptibilität von Peroxynitrit-behandelter GAPDH für das 20S-Proteasom, das bevorzugt oxidativ modifizierte Proteine hydrolysiert, erreichte bei wiederum niedrigeren Peroxynitrit-Konzentrationen (0,3 μM) ein Maximum, um bei höheren Konzentrationen wieder abzunehmen. Eine präferentielle Schädigung der GAPDH durch Peroxynitrit kann somit zu einer Beeinträchtigung der enzymatischen Funktion führen, jedoch bei höheren Dosen eine Anhäufung des inaktiven Proteins nach sich ziehen. Neben einer potentiellen pathologischen Bedeutung wurde auf diese Weise gezeigt, dass das 20S-Proteasom äußerst empfindlich auf oxidative Schädigungen an Proteinen anspricht und in der Sensitivität gegenüber diesen Modifikationen üblichen Nachweismethoden überlegen ist.

Schließlich wurden Hinweise dafür gefunden, dass das Flavanol Epicatechin ein effektiver und selektiver Schutzfaktor gegen Peroxynitrit ist, der zwar effizient die Nitrierung, nicht aber die Inaktivierung der GAPDH verhindern kann, und zudem auf eine attraktive Art über Genußmittel wie Tee, Rotwein oder Schokolade supplementierbar ist.

6 Literatur

- Anderson, S. O. (1966). Covalent cross-links in a structural protein, resilin. *Acta Physiol Scand. Suppl* 263, 1-81.
- Arteel, G. E., Briviba, K., and Sies, H. (1999). Protection against peroxynitrite. *FEBS Lett.* 445, 226-230.
- Arteel, G. E., Schroeder, P., and Sies, H. (2000). Reactions of peroxynitrite with co-coa procyanidin oligomers. *J. Nutr.* 130, 2100S-2104S.
- Arteel, G. E., and Sies, H. (1999). Protection against peroxynitrite by cocoa polyphenol oligomers. *FEBS Lett.* 462, 167-170.
- Bartlett, D., Church, D. F., Bounds, P. L., and Koppenol, W. H. (1995). The kinetics of the oxidation of L-ascorbic acid by peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 85-92.
- Beckman, J. S. (1996). The physiological and pathophysiological chemistry of nitric oxide. In: *Nitric oxide: principles and actions*, J. Lancaster, ed. (San Diego, CA: Academic Press), pp. 1-82.
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 1620-1624.
- Beckman, J. S., Chen, J., Crow, J. P., and Ye, Y. Z. (1994a). Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration. *Prog. Brain Res.* 103, 371-380.
- Beckman, J. S., Chen, J., Ischiropoulos, H., and Crow, J. P. (1994b). Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol.* 233, 229-240.
- Boyne, A. F., and Ellman, G. L. (1972). A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Anal. Biochem.* 46, 639-653.
- Briviba, K., Kissner, R., Koppenol, W. H., and Sies, H. (1998). Kinetic study of the reaction of glutathione peroxidase with peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1398-1401.
- Brodie, A. E., and Reed, D. J. (1987). Reversible oxidation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase thiols in human lung carcinoma cells by hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148, 120-125.
- Browne, S. E., Ferrante, R. J., and Beal, M. F. (1999). Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain Pathol.* 9, 147-163.

- Buchczyk, D. P., Briviba, K., Hartl, F. U., and Sies, H. (2000). Responses to peroxynitrite in yeast: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a sensitive intracellular target for nitration and enhancement of chaperone expression and ubiquitination. *Biol. Chem.* 381, 121-126.
- Bulteau, A. L., Szweda, L. I., and Friguet, B. (2002). Age-dependent declines in proteasome activity in the heart. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 298-304.
- Burke, J. R., Enghild, J. J., Martin, M. E., Jou, Y. S., Myers, R. M., Roses, A. D., Vance, J. M., and Strittmatter, W. J. (1996). Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. *Nat. Med.* 2, 347-350.
- Cai, H., Wang, C. C., and Tsou, C. L. (1994). Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* 269, 24550-24552.
- Carbonaro, M., Grant, G., and Pusztai, A. (2001). Evaluation of polyphenol bioavailability in rat small intestine. *Eur. J. Nutr.* 40, 84-90.
- Crow, J. P., Ye, Y. Z., Strong, M., Kirk, M., Barnes, S., and Beckman, J. S. (1997). Superoxide dismutase catalyzes nitration of tyrosines by peroxynitrite in the rod and head domains of neurofilament-L. *J. Neurochem.* 69, 1945-1953.
- da Silva, E. L., and Abdalla, D. S. (1998). Increased metabolism of peroxynitrite-modified [125I] beta-VLDL by monocytes from hypercholesterolemic rabbits. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46, 343-353.
- Danshina, P. V., Schmalhausen, E. V., Avetisyan, A. V., and Muronetz, V. I. (2001). Mildly oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a possible regulator of glycolysis. *IUBMB. Life* 51, 309-314.
- Davies, K. J. (2001). Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie* 83, 301-310.
- Deckel, A. W., Gordinier, A., Nuttal, D., Tang, V., Kuwada, C., Freitas, R., and Gary, K. A. (2001). Reduced activity and protein expression of NOS in R6/2 HD transgenic mice: effects of L-NAME on symptom progression. *Brain Res.* 919, 70-81.
- Deckel, A. W., Volmer, P., Weiner, R., Gary, K. A., Covault, J., Sasso, D., Schmerler, N., Watts, D., Yan, Z., and Abeles, I. I. (2000). Dietary arginine alters time of symptom onset in Huntington's disease transgenic mice(1). *Brain Res.* 875, 187-195.
- Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M., and Radi, R. (1996). Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch. Biochem. Biophys.* 333, 49-58.
- Dumond, H., Danielou, N., Pinto, M., and Bolotin-Fukuhara, M. (2000). A large-scale study of Yap1p-dependent genes in normal aerobic and H₂O₂- stress conditions: the role of Yap1p in cell proliferation control in yeast. *Mol. Microbiol.* 36, 830-845.

- Ecker, D. J., Khan, M. I., Marsh, J., Butt, T. R., and Crooke, S. T. (1987). Chemical synthesis and expression of a cassette adapted ubiquitin gene. *J. Biol. Chem.* 262, 3524-3527.
- Epe, B., Ballmaier, D., Roussyn, I., Briviba, K., and Sies, H. (1996). DNA damage by peroxynitrite characterized with DNA repair enzymes. *Nucleic Acids Res.* 24, 4105-4110.
- Finley, D., and Chau, V. (1991). Ubiquitination. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 25-69.
- Flattery-O'Brien, J., Collinson, L. P., and Dawes, I. W. (1993). *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide. *J. Gen. Microbiol.* 139 (Pt 3), 501-507.
- Flattery-O'Brien, J. A., and Dawes, I. W. (1998). Hydrogen peroxide causes RAD9-dependent cell cycle arrest in G2 in *Saccharomyces cerevisiae* whereas menadione causes G1 arrest independent of RAD9 function. *J. Biol. Chem.* 273, 8564-8571.
- Floris, R., Piersma, S. R., Yang, G., Jones, P., and Wever, R. (1993). Interaction of myeloperoxidase with peroxynitrite. A comparison with lactoperoxidase, horseradish peroxidase and catalase. *Eur. J. Biochem.* 215, 767-775.
- Formica, J. V., and Regelson, W. (1995). Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* 33, 1061-1080.
- Fuchs, S. Y., Fried, V. A., and Ronai, Z. (1998). Stress-activated kinases regulate protein stability. *Oncogene* 17, 1483-1490.
- Gething, M. J., and Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45.
- Giasson, B. I., Duda, J. E., Murray, I. V., Chen, Q., Souza, J. M., Hurtig, H. I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2000). Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* 290, 985-989.
- Giulivi, C., and Davies, K. J. (1993). Dityrosine and tyrosine oxidation products are endogenous markers for the selective proteolysis of oxidatively modified red blood cell hemoglobin by (the 19 S) proteasome. *J. Biol. Chem.* 268, 8752-8759.
- Giulivi, C., Pacifici, R. E., and Davies, K. J. (1994). Exposure of hydrophobic moieties promotes the selective degradation of hydrogen peroxide-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.* 311, 329-341.
- Good, P. F., Hsu, A., Werner, P., Perl, D. P., and Olanow, C. W. (1998). Protein nitration in Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 338-342.
- Good, P. F., Werner, P., Hsu, A., Olanow, C. W., and Perl, D. P. (1996). Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 149, 21-28.

- Goss, S. P., Singh, R. J., Hogg, N., and Kalyanaraman, B. (1999). Reactions of *NO, *NO₂ and peroxynitrite in membranes: physiological implications. *Free Radic. Res.* 31, 597-606.
- Graham, A., Hogg, N., Kalyanaraman, B., O'Leary, V., Darley-Usmar, V., and Moncada, S. (1993). Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Lett.* 330, 181-185.
- Graumann, J., Lilie, H., Tang, X., Tucker, K. A., Hoffmann, J. H., Vijayalakshmi, J., Saper, M., Bardwell, J. C., and Jakob, U. (2001). Activation of the redox-regulated molecular chaperone Hsp33--a two-step mechanism. *Structure. (Camb.)* 9, 377-387.
- Greenacre, S. A. B., and Ischiropoulos, H. (2001). Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Rad. Res.* 34, 541-581.
- Grune, T., Blasig, I. E., Sitte, N., Roloff, B., Haseloff, R., and Davies, K. J. (1998). Peroxynitrite increases the degradation of aconitase and other cellular proteins by proteasome. *J. Biol. Chem.* 273, 10857-10862.
- Grune, T., Klotz, L.-O., Gieche, J., Rudeck, M., and Sies, H. (2001). Protein oxidation and proteolysis by the nonradical oxidants singlet oxygen or peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 1243-1253.
- Guentchev, M., Voigtlander, T., Haberler, C., Groschup, M. H., and Budka, H. (2000). Evidence for oxidative stress in experimental prion disease. *Neurobiol. Dis.* 7, 270-273.
- Haenen, G. R., Paquay, J. B., Korthouwer, R. E., and Bast, A. (1997). Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 591-593.
- Hayes, J. P., and Tipton, K. F. (2002). Interactions of the neurotoxin 6-hydroxydopamine with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Toxicol. Lett.* 128, 197-206.
- Hendrick, J. P., and Hartl, F. U. (1995). The role of molecular chaperones in protein folding. *FASEB J.* 9, 1559-1569.
- Herskowitz, I. (1995). MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* 80, 187-197.
- Hochstrasser, M., Ellison, M. J., Chau, V., and Varshavsky, A. (1991). The short-lived MAT alpha 2 transcriptional regulator is ubiquitinated in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 4606-4610.
- Hough, R., Pratt, G., and Rechsteiner, M. (1987). Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.* 262, 8303-8313.
- Huie, R. E., and Padmaja, S. (1993). The reaction of no with superoxide. *Free Radic. Res. Commun.* 18, 195-199.

- Hurst, R. D., Azam, S., Hurst, A., and Clark, J. B. (2001). Nitric-oxide-induced inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase may mediate reduced endothelial cell monolayer integrity in an in vitro model blood-brain barrier. *Brain Res.* 894, 181-188.
- Inai, Y., and Nishikimi, M. (2002). Increased degradation of oxidized proteins in yeast defective in 26 S proteasome assembly. *Arch. Biochem. Biophys.* 404, 279-284.
- Ischiropoulos, H. (1998). Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* 356, 1-11.
- Ischiropoulos, H., al Mehdi, A. B., and Fisher, A. B. (1995). Reactive species in ischemic rat lung injury: contribution of peroxynitrite. *Am. J. Physiol* 269, L158-L164.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163-168.
- Jahngen-Hodge, J., Obin, M. S., Gong, X., Shang, F., Nowell, T. R., Jr., Gong, J., Abasi, H., Blumberg, J., and Taylor, A. (1997). Regulation of ubiquitin-conjugating enzymes by glutathione following oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272, 28218-28226.
- Jakob, U., Muse, W., Eser, M., and Bardwell, J. C. (1999). Chaperone activity with a redox switch. *Cell* 96, 341-352.
- Jakubowski, W., Bilinski, T., and Bartosz, G. (1999). Sensitivity of antioxidant-deficient yeast *Saccharomyces cerevisiae* to peroxynitrite and nitric oxide. *Biochim. Biophys. Acta* 1472, 395-398.
- Jamieson, D. J. (1992). *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J. Bacteriol.* 174, 6678-6681.
- Jamieson, D. J., Rivers, S. L., and Stephen, D. W. (1994). Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiology* 140 (Pt 12), 3277-3283.
- Jornot, L., Mirault, M. E., and Junod, A. F. (1991). Differential expression of hsp70 stress proteins in human endothelial cells exposed to heat shock and hydrogen peroxide. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5, 265-275.
- Kalchman, M. A., Koide, H. B., McCutcheon, K., Graham, R. K., Nichol, K., Nishiyama, K., Kazemi-Esfarjani, P., Lynn, F. C., Wellington, C., Metzler, M., Goldberg, Y. P., Kanazawa, I., Gietz, R. D., and Hayden, M. R. (1997). HIP1, a human homologue of *S. cerevisiae* Sla2p, interacts with membrane-associated huntingtin in the brain. *Nat. Genet.* 16, 44-53.
- Kang, J. H., Kim, K. S., Choi, S. Y., Kwon, H. Y., and Won, M. H. (2001). Oxidative modification of human ceruloplasmin by peroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta* 1568, 30-36.

- Keller, J. N., Huang, F. F., and Markesbery, W. R. (2000). Decreased levels of proteasome activity and proteasome expression in aging spinal cord. *Neuroscience* 98, 149-156.
- Kim, K. S., Choi, S. Y., Kwon, H. Y., Won, M. H., Kang, T. C., and Kang, J. H. (2002). Aggregation of alpha-synuclein induced by the Cu,Zn-superoxide dismutase and hydrogen peroxide system. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 544-550.
- Klionsky, D. J., and Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290, 1717-1721.
- Klotz, L-O., Briviba, K., and Sies, H. (2000). Mitogen-activated protein kinase activation by singlet oxygen and ultraviolet A. *Methods Enzymol.* 319, 130-143.
- Klotz, L-O., Pellieux, C., Briviba, K., Pierlot, C., Aubry, J. M., and Sies, H. (1999). Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA. *Eur. J. Biochem.* 260, 917-922.
- Koppenol, W. H. (1998). The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* 25, 385-391.
- Koppenol, W. H., Kissner, R., and Beckman, J. S. (1996). Syntheses of peroxynitrite: to go with the flow or on solid grounds? *Methods Enzymol.* 269, 296-302.
- Koppenol, W. H., Moreno, J. J., Pryor, W. A., Ischiropoulos, H., and Beckman, J. S. (1992). Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 834-842.
- Kukreja, R. C., Kontos, M. C., Loesser, K. E., Batra, S. K., Qian, Y. Z., Gbur, C. J., Jr., Naseem, S. A., Jesse, R. L., and Hess, M. L. (1994). Oxidant stress increases heat shock protein 70 mRNA in isolated perfused rat heart. *Am. J. Physiol* 267, H2213-H2219.
- Kurjan, J. (1993). The pheromone response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 27, 147-179.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Layfield, R., Alban, A., Mayer, R. J., and Lowe, J. (2001). The ubiquitin protein catabolic disorders. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 27, 171-179.
- Lee, J., Romeo, A., and Kosman, D. J. (1996). Transcriptional remodeling and G1 arrest in dioxygen stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271, 24885-24893.
- Lee, M. H., Hyun, D. H., Jenner, P., and Halliwell, B. (2001). Effect of proteasome inhibition on cellular oxidative damage, antioxidant defences and nitric oxide production. *J. Neurochem.* 78, 32-41.

- Lehrer, S. S., and Fasman, G. D. (1967). Ultraviolet irradiation effects in poly-L-tyrosine and model compounds. Identification of bityrosine as a photoproduct. *Biochemistry* 6, 757-767.
- Levitz, S. M., and Diamond, R. D. (1985). A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. *J. Infect. Dis.* 152, 938-945.
- Li, X. J., Li, S. H., Sharp, A. H., Nucifora, F. C., Jr., Schilling, G., Lanahan, A., Worley, P., Snyder, S. H., and Ross, C. A. (1995). A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature* 378, 398-402.
- Lin, Y. Z., Liang, S. J., Zhou, J. M., Tsou, C. L., Wu, P. Q., and Zhou, Z. K. (1990). Comparison of inactivation and conformational changes of D- glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase during thermal denaturation. *Biochim. Biophys. Acta* 1038, 247-252.
- Liu, L., Hausladen, A., Zeng, M., Que, L., Heitman, J., Stamler, J. S., and Steverding, D. (2001). Nitrosative stress: protection by glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *Redox. Rep.* 6, 209-210.
- Liu, L., Zeng, M., Hausladen, A., Heitman, J., and Stamler, J. S. (2000). Protection from nitrosative stress by yeast flavohemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 4672-4676.
- Macmillan-Crow, L. A., and Thompson, J. A. (1999). Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 366, 82-88.
- Masumoto, H., Kissner, R., Koppenol, W. H., and Sies, H. (1996). Kinetic study of the reaction of ebselen with peroxynitrite. *FEBS Lett.* 398, 179-182.
- McCord, J. M., and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- McKenzie, S. J., Baker, M. S., Buffinton, G. D., and Doe, W. F. (1996). Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest* 98, 136-141.
- Minard, K. I., and McAlister-Henn, L. (2001). Antioxidant function of cytosolic sources of NADPH in yeast. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 832-843.
- Mohr, S., Hallak, H., de Boitte, A., Lapetina, E. G., and Brune, B. (1999). Nitric oxide-induced S-glutathionylation and inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 274, 9427-9430.
- Mohr, S., Stamler, J. S., and Brune, B. (1994). Mechanism of covalent modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at its active site thiol by nitric oxide, peroxynitrite and related nitrosating agents. *FEBS Lett.* 348, 223-227.
- Muchowski, P. J., Schaffar, G., Sittler, A., Wanker, E. E., Hayer-Hartl, M. K., and Hartl, F. U. (2000). Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 7841-7846.

- Murakami, K., Jahngen, J. H., Lin, S. W., Davies, K. J., and Taylor, A. (1990). Lens proteasome shows enhanced rates of degradation of hydroxyl radical modified alpha-crystallin. *Free Radic. Biol. Med.* 8, 217-222.
- Naylor, D. J., and Hartl, F. U. (2001). Contribution of molecular chaperones to protein folding in the cytoplasm of prokaryotic and eukaryotic cells. *Biochem. Soc. Symp.* 45-68.
- Obin, M., Shang, F., Gong, X., Handelman, G., Blumberg, J., and Taylor, A. (1998). Redox regulation of ubiquitin-conjugating enzymes: mechanistic insights using the thiol-specific oxidant diamide. *FASEB J.* 12, 561-569.
- Pannala, A. S., Rice-Evans, C. A., Halliwell, B., and Singh, S. (1997). Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232, 164-168.
- Paxinou, E., Chen, Q., Weisse, M., Giasson, B. I., Norris, E. H., Rueter, S. M., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., and Ischiropoulos, H. (2001). Induction of alpha-synuclein aggregation by intracellular nitrative insult. *J. Neurosci.* 21, 8053-8061.
- Quinn, N., and Schrag, A. (1998). Huntington's disease and other choreas. *J. Neurol.* 245, 709-716.
- Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Naviliat, M., and Cayota, A. (2001). Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 463-488.
- Reinheckel, T., Sitte, N., Ullrich, O., Kuckelkorn, U., Davies, K. J., and Grune, T. (1998). Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *Biochem. J.* 335 (Pt 3), 637-642.
- Robak, J., and Gryglewski, R. J. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* 37, 837-841.
- Rudeck, M., Volk, T., Sitte, N., and Grune, T. (2000). Ferritin oxidation in vitro: implication of iron release and degradation by the 20S proteasome. *IUBMB. Life* 49, 451-456.
- Samdani, A. F., Dawson, T. M., and Dawson, V. L. (1997). Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* 28, 1283-1288.
- Sampson, J. B., Ye, Y., Rosen, H., and Beckman, J. S. (1998). Myeloperoxidase and horseradish peroxidase catalyze tyrosine nitration in proteins from nitrite and hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 356, 207-213.
- Scalbert, A., and Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130, 2073S-2085S.
- Schieke, S. M., Briviba, K., Klotz, L-O., and Sies, H. (1999). Activation pattern of mitogen-activated protein kinases elicited by peroxynitrite: attenuation by selenite supplementation. *FEBS Lett.* 448, 301-303.

- Schroeder, P., Klotz, L-O., Buchczyk, D. P., Sadik, C. D., Schewe, T., and Sies, H. (2001). Epicatechin selectively prevents nitration but not oxidation reactions of peroxynitrite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 782-787.
- Shang, F., Gong, X., and Taylor, A. (1997). Activity of ubiquitin-dependent pathway in response to oxidative stress. Ubiquitin-activating enzyme is transiently up-regulated. *J. Biol. Chem.* 272, 23086-23093.
- Sitte, N., Merker, K., Von Zglinicki, T., Davies, K. J., and Grune, T. (2000a). Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part II--aging of nondividing cells. *FASEB J.* 14, 2503-2510.
- Sitte, N., Merker, K., Von Zglinicki, T., Grune, T., and Davies, K. J. (2000b). Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part I--effects of proliferative senescence. *FASEB J.* 14, 2495-2502.
- Souza, J. M., Daikhin, E., Yudkoff, M., Raman, C. S., and Ischiropoulos, H. (1999). Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration. *Arch. Biochem. Biophys.* 371, 169-178.
- Souza, J. M., and Radi, R. (1998). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 360, 187-194.
- Spencer, J. P., Chaudry, F., Pannala, A. S., Srai, S. K., Debnam, E., and Rice-Evans, C. (2000). Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 236-241.
- Spencer, J. P., Schroeter, H., Rechner, A. R., and Rice-Evans, C. (2001a). Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo. *Antioxid. Redox. Signal.* 3, 1023-1039.
- Spencer, J. P., Schroeter, H., Shenoy, B., Srai, S. K., Debnam, E. S., and Rice-Evans, C. (2001b). Epicatechin is the primary bioavailable form of the procyanidin dimers B2 and B5 after transfer across the small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 588-593.
- Sprague, G. F., Jr., Blair, L. C., and Thorner, J. (1983). Cell interactions and regulation of cell type in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Microbiol.* 37, 623-660.
- Stephen, D. W., Rivers, S. L., and Jamieson, D. J. (1995). The role of the YAP1 and YAP2 genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 16, 415-423.
- Tanaka, K., Shirai, T., Nagata, E., Dembo, T., and Fukuuchi, Y. (1997). Immunohistochemical detection of nitrotyrosine in postischemic cerebral cortex in gerbil. *Neurosci. Lett.* 235, 85-88.
- Tohgi, H., Abe, T., Yamazaki, K., Murata, T., Ishizaki, E., and Isobe, C. (1999a). Alterations of 3-nitrotyrosine concentration in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 269, 52-54.

- Tohgi, H., Abe, T., Yamazaki, K., Murata, T., Ishizaki, E., and Isobe, C. (1999b). Remarkable increase in cerebrospinal fluid 3-nitrotyrosine in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 46, 129-131.
- Torreilles, F., Salman-Tabcheh, S., Guerin, M., and Torreilles, J. (1999). Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 30, 153-163.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76, 4350-4354.
- Ullrich, O., Reinheckel, T., Sitte, N., and Grune, T. (1999). Degradation of hypochlorite-damaged glucose-6-phosphate dehydrogenase by the 20S proteasome. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 487-492.
- van Acker, S. A., Tromp, M. N., Haenen, G. R., van der Vijgh, W. J., and Bast, A. (1995). Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214, 755-759.
- van der Vliet, A., O'Neill, C. A., Halliwell, B., Cross, C. E., and Kaur, H. (1994). Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanine and tyrosine by peroxynitrite. Evidence for hydroxyl radical production from peroxynitrite. *FEBS Lett.* 339, 89-92.
- Varshavsky, A., Turner, G., Du, F., and Xie, Y. (2000). Felix Hoppe-Seyler Lecture 2000. The ubiquitin system and the N-end rule pathway. *Biol. Chem.* 381, 779-789.
- Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., and Balish, E. (1995). Nitric oxide production does not directly increase macrophage candidacidal activity. *Infect. Immun.* 63, 1142-1144.
- Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., and Balish, E. (1996). Peroxynitrite contributes to the candidacidal activity of nitric oxide-producing macrophages. *Infect. Immun.* 64, 3127-3133.
- Wang, X., Martindale, J. L., Liu, Y., and Holbrook, N. J. (1998). The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem. J.* 333 (Pt 2), 291-300.
- Wanker, E. E., Rovira, C., Scherzinger, E., Hasenbank, R., Walter, S., Tait, D., Colicelli, J., and Lehrach, H. (1997). HIP-I: a huntingtin interacting protein isolated by the yeast two-hybrid system. *Hum. Mol. Genet.* 6, 487-495.
- Wanker, E. E., Scherzinger, E., Heiser, V., Sittler, A., Eickhoff, H., and Lehrach, H. (1999). Membrane filter assay for detection of amyloid-like polyglutamine-containing protein aggregates. *Methods Enzymol.* 309, 375-386.
- Watt, R., and Piper, P. W. (1997). UBI4, the polyubiquitin gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is a heat shock gene that is also subject to catabolite derepression control. *Mol. Gen. Genet.* 253, 439-447.

- Wemmie, J. A., Steggerda, S. M., and Moye-Rowley, W. S. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* AP-1 protein discriminates between oxidative stress elicited by the oxidants H₂O₂ and diamide. *J. Biol. Chem.* 272, 7908-7914.
- White, C. R., Brock, T. A., Chang, L. Y., Crapo, J., Briscoe, P., Ku, D., Bradley, W. A., Gianturco, S. H., Gore, J., Freeman, B. A., and . (1994). Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 1044-1048.
- White, C. R., Darley-Usmar, V., Berrington, W. R., McAdams, M., Gore, J. Z., Thompson, J. A., Parks, D. A., Tarpey, M. M., and Freeman, B. A. (1996). Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 8745-8749.
- Wonisch, W., Kohlwein, S. D., Schaur, J., Tatzber, F., Guttenberger, H., Zarkovic, N., Winkler, R., and Esterbauer, H. (1998). Treatment of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* with the lipid peroxidation product 4-HNE provokes a temporary cell cycle arrest in G1 phase. *Free Radic. Biol. Med.* 25, 682-687.
- Zou, M., Martin, C., and Ullrich, V. (1997). Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. *Biol. Chem.* 378, 707-713.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

EDTA: Ethylendiamintetraacetat

ddH₂O: Reinstwasser

DMSO: Dimethylsulfoxid

DTPA: Diethylentriaminpentaacetat

DTT: Dithiothreitol

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

GSH: Glutathion

GSSG: Glutathiondisulfid

GST: Glutathion-S-Transferase

HD: Huntingtin "Huntington disease protein"

Hsp: Hitzeschockprotein

kDa: Kilodalton

NAD⁺: Nikotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form

NADH: Nikotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form

NADPH: Nikotinamidadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form

OD₆₀₀ : Optische Dichte bei 600 nm; Maß für die Zellkonzentration in einer Hefesuspension. 1 OD₆₀₀ entspricht rund 5×10^7 Zellen.

ONOO⁻: Peroxynitrit (Oxoperoxonitrat(1-))₂

PBS: phosphatgepufferte Kochsalzlösung

PMSF: Phenylmethylsulfonylfluorid

RT: Raumtemperatur (20-25°C)

SM: synthetisches Minimalmedium für Hefe

TPA: 12-Tetradecanoylphorbol-13-acetat

Upm: Umdrehungen pro Minute

YEPD: Komplexes Vollmedium für Hefe

ZNS: Zentralnervensystem

7.2 Danksagung

Mein besonderer und herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Helmut Sies für die Bereitstellung des Themas, die aufmerksame Betreuung dieser Arbeit, seinen Rat sowie seine Förderung.

Herrn Prof. Dr. Cornelis P. Hollenberg danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Priv.-Doz. Dr. Lars-Oliver Klotz danke ich herzlich für seine Betreuung und freundschaftliche Unterstützung in wissenschaftlichen und sonstigen Belangen.

Nilloofar Ale-Agha, Olivier Aust, Dr. Heiko Possel und Dr. Peet Schroeder danke ich für Hilfe, Freundschaft und eine Menge Spass.

Dr. Gavin Arteel, Priv.-Doz. Dr. Karlis Briviba, Prof. Dr. Willi Stahl, Prof. Dr. Tankred Schewe danke ich für Rat und Diskussionsbereitschaft. Priv.-Doz. Dr. Tilman Grune (Charité Berlin) danke ich für sehr gute wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Ferner möchte ich vom ganzem Herzen Kotb Aly, Dr. Annika Assmann, Juliane Beier, Alejandro Betancor, Andrea Borchardt, Brigitte Cremer, P. Arne Gerber, Peter Graf, Sonja Gründel, Dr. Claudio Jösch, Heide Krahel, Dr. Michael Lörper, André Mahns, Ira Melchheier, Claudia von Montfort, Dr. Elena Ostrakhovitch, Gisela Pansegrau, Christian Sadik, Elisabeth Sauerbier, Dr. Stefan Schieke, Marlies Scholtes, Henrik Traulsen und Heinz Venghaus dafür danken, dass sie das Institut zu einem Ort machten, an dem ich gerne war.

Ich danke darüber hinaus allen noch nicht erwähnten, derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern des Institutes für Physiologische Chemie I für kollegiale Hilfsbereitschaft sowie hervorragende Arbeitsatmosphäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt Barbara und Siegmund Buchczyk, Beate und Georg Kruszyna sowie Dr. Antje Flintrop für ihr unerschütterliches Vertrauen in mich und für noch sehr viel mehr.

7.3 Eidestattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Krefeld, den 17.10.02

7.4 Lebenslauf

Name: Darius Peter Buchczyk

Datum und Ort der Geburt: 23. Jan. 1970, Ruda, Polen

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: Ledig

Ausbildung:

- 1990 Abitur, Fichte-Gymnasium Krefeld
- 1994 Vordiplom Biologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- 1997 Diplomprüfung Biologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- 1998 Physikum Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- 1999 Erstes Staatsexamen Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- 2002 Zweites Staatsexamen Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Beschäftigungen:

- 1990-1991 Wehrdienst, Budel und Cochem
- 1997-1998 Diplomarbeit in Mikrobiologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- 1998-2000 Stipendium, Graduiertenkolleg „Pathologische Prozesse des Nervensystems“
- 1998-2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Physiologische Chemie I, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Assistent für Seminare und Praktika zur Einführung in die Biochemie für Medizinstudenten

2002-2003 Praktisches Jahr, Klinikum, Krefeld

7.5 Publikationen und Präsentationen

7.5.1 Artikel

1. Buchczyk, DP., Briviba, K., Hartl, FU. and Sies, H. (2000). Responses to peroxynitrite in yeast: Glyceraldehyde-3-phosphat dehydrogenase (GAPDH) as a sensitive intracellular target for nitration and enhancement of chaperone expression and ubiquitination. *Biol. Chem*, 381: 121-6
2. Buchczyk, DP., Klotz, L-O., Lang, K., Fritsch, C. and Sies, H. (2001). High Efficiency of 5-Aminolevulinate-Photodynamic Treatment Using UVA-Irradiation. *Carcinogenesis*, 22(6):879-83.
3. Schroeder, P., Klotz, L-O., Buchczyk, DP., Sadik, CD., Schewe, T. and Sies, H. (2001). Epicatechin selectively prevents nitration but not oxidation reactions of peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 285(3):782-7
4. Klotz, L-O., Buchczyk, DP. and Sies, H. (2001). MAP Kinase Activation and Environmental Stress. in: *Micronutrients and Health: Molecular Mechanisms* 184-193. Naresetnam, K. and Packer, L. (eds.)
5. Arteel, GE., Klotz, L-O., Buchczyk, DP. and Sies, H. (2002). Selenoprotein P. *Methods in Enzymology* 347: 121-125
6. Klotz, L-O., Patak, P., Ale-Agha, N., Buchczyk, DP., Abdelmohsen, K., Gerber, PA., von Montfort, C. and Sies, H. (2002). 2-Methyl-1,4-naphthoquinone, vitamin K (3), decreases gap-junctional intercellular communication via activation of the epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinase cascade. *Cancer Res*. 62(17): 4922-8

7.5.2 Poster-Präsentationen

1. "Peroxynitrite-mediated nitration of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, enhanced ubiquitination and chaperone (Hsp70) expression"; Fall Meeting of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology (GBM); Hamburg, Germany, September, 5-8, 1999.
2. "Increased efficiency of 5-aminolevulinate-photodynamic therapy with irradiation in the UVA region"; Fall Meeting of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology (GBM); München, Germany, October, 10-13, 2000.
3. "Loss of gap junctional communication by peroxynitrite in liver epithelial cells is not mediated by phosphorylation of connexins"; Fall Meeting of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology (GBM); München, Germany, October, 10-13, 2000.
4. "Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase is a Sensitive Target for Peroxynitrite". 3rd International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species in Biology and Medicine, Asilomar Conference Grounds, Pacific Grove, California, May 27-31, 2001

7.5.3 Vorträge (Konferenzen/Symposia)

1. „Rolle von Chaperonen für den Turnover von peroxynitrit-modifizierten Proteinen“ Jahresarbeitstreffen des Graduiertenkollegs „Pathologische Prozesse des Nervensystems“, Strassbourg, France, August 1998
2. „Protein-Nitrierung durch Peroxynitrit in *Saccharomyces cerevisiae*“. NO-Forum, Erlangen, Germany, April 24, 1999.
3. "Responses to peroxynitrite in yeast and mammalian cells". Mini-Symposium on Micronutrient Function in Anti-Oxidant Systems (The Rank Prize Funds), Grasmere, UK, November 07, 2000.

4. "Binding of selenoprotein P to endothelial cells". 1 Kolloquium DFG-Schwerpunktprogramm 1087 Selenoproteine, Würzburg, Germany, February 17, 2001.

5. "Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase is a Sensitive Target for Peroxynitrite". 3rd International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species in Biology and Medicine, Asilomar Conference Grounds, Pacific Grove, California, May 27-31, 2001