

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I

an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Geschäftsführender Leiter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm Stahl

**ZELLULÄRER STRESS UND  
SEINE AUSWIRKUNGEN AUF DIE ZELLULÄRE  
ZINKHOMÖOSTASE**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Elvis Pirev**

2012

Als Inauguraldissertation gedruckt  
mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Klaus-Dietrich Kröncke  
Korreferent: Prof. Dr. med. Thomas Hohlfeld

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

- 1.) E. Pirev, C. Calles, P. Schroeder, H. Sies, K.-D. Kröncke (2008). Ultraviolet-A irradiation but not ultraviolet-B or infrared-A irradiation leads to a disturbed zinc homeostasis in cells; **Free Radic. Biol. Med.** 45, 86-91 (Impact-Factor 5,399);
- 2.) E. Pirev, Y. Ince, H. Sies, K.-D. Kröncke (2010). Heat shock but not cold shock leads to disturbed intracellular zinc homeostasis.; **Journal of Cellular Physiology** 223, 103-109 (Impact-Factor 3,986);
- 3.) C. Kruczek, B. Görg, V. Keitel, E. Pirev, K.-D. Kröncke, F. Schliess, D. Häussinger (2009). Hypoosmotic swelling affects zinc homeostasis in cultured rat astrocytes; **GLIA** 57, 79-92 (Impact-Factor: 4,932);
- 4.) M. M. Cortese-Krott, M. Münchow, E. Pirev, F. Heßner, A. Bozkurt, P. Uciechowski, N. Pallua, K.-D. Kröncke, C. V. Suschek (2009). Silver ions induce oxidative stress and intracellular zinc release in human skin fibroblasts; **Free Radic. Biol. Med.** 47, 1570-1577 (Impact-Factor 6,081);

# INHALTSVERZEICHNIS

## 1. Einleitung

1.1. Zink und seine Bedeutung für den menschlichen Körper	5
1.2. Zink im Kontext von verschiedenen Krankheitsbildern	6
1.3. $Zn^{2+}$ und seine intrazelluläre Bedeutung	7
1.4. Störung der intrazellulären Zinkhomöostase	9
1.5. Ziele der Arbeit	12

## 2. Material und Methoden

12

## 3. Ergebnisse

3.1 Nachweis von intrazellulären Zinkionen durch Fluoreszenzfarbstoffe	13
3.2 Oxidativer Stress und die zelluläre Zinkhomöostase	14
3.3 Hitze-Schock und die zelluläre Zinkhomöostase	20
3.4 Kälte-Schock und die zelluläre Zinkhomöostase	24
3.5 Hypoosmolarität und die zelluläre Zinkhomöostase	24
3.6 $Ag^+$ und die zelluläre Zinkhomöostase	27
3.7 Weitere Stressarten und die zelluläre Zinkhomöostase	29

## 4. Diskussion

4.1. Intrazelluläre Zinkhomöostase und die spezifische Darstellung von intrazellulären freien Zinkionen	32
4.2. Oxidativer Stress und dessen Einfluss auf die zelluläre Zinkhomöostase	33
4.3. Hitze-Schock und dessen Einfluss auf die zelluläre Zinkhomöostase	36

4.4. Kälte-Schock und dessen Einfluss auf die zelluläre Zinkhomöostase	39
4.5. Hypoosmolarität und dessen Einfluss auf die zelluläre Zinkhomöostase	39
4.6. Silberionen und deren Einfluss auf die zelluläre Zinkhomöostase	40
4.7. Scherstress bzw. DMSO und ihr Einfluss auf die zelluläre Zinkhomöostase	41
4.8. Überblick über verschiedene Stressarten und ihre Auswirkungen auf die zelluläre Zinkhomöostase	42
4.9. Zusammenfassung und Ausblick	43
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>44</b>
<b>6. Danksagung</b>	<b>51</b>
<b>7. Lebenslauf</b>	<b>53</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Zink und seine Bedeutung für den menschlichen Körper

Der Gesamtzinkgehalt des Körpers beträgt 2-4 g (Rink und Gabriel, 2000) und ist damit vergleichbar mit dem Gehalt an Eisen, welcher 3-4 g beträgt. 85% des Gesamtzinkgehaltes befinden sich im Knochen und in der Muskulatur, 11% in der Haut und der Leber, während sich die übrigen 2-3% auf andere Gewebe verteilen (Jackson, 1989). Hauptnahrungsquellen für Zink sind Fleisch (insbesondere Rind), Fisch, Milchprodukte (insbesondere Käse) und Eier. Zink spielt in allen relevanten Systemen des menschlichen Körpers eine wichtige Rolle, beispielsweise ist es im Hormonstoffwechsel unter anderem an der Speicherung des Insulins in den Langerhansschen Zellen beteiligt und nimmt somit eine zentrale Bedeutung für die Aufrechterhaltung unseres Blutzuckerhaushaltes ein (Chimienti et al., 2005). Als Bestandteil von Zinkfingern in Transkriptionsfaktoren ist es an der Genexpression beteiligt. Von besonderer Wichtigkeit ist das Zinkspeicherprotein Metallothionein, welches zu der Gruppe der Metall-bindenden Proteine gehört und aufgrund seines hohen Cysteingehaltes (23-33%) eine hohe Bindungskapazität für Metalle besitzt (Rimbach et al., 1996). Seine Hauptfunktion liegt unter anderem in der Regulation der zellulären Zinkhomöostase, seine de novo Synthese korreliert mit der Zinkanreicherung im Gewebe (Krezel et al., 2007). Richards und Cousins zeigten erstmals die Schlüsselfunktion von Metallothionein bei der intestinalen  $Zn^{2+}$ -Absorption (Richards und Cousins, 1975). Als therapeutischer Ansatz wird dieser Mechanismus bei der Kupferspeicherkrankheit Morbus Wilson genutzt. Die orale Gabe von Zinksalzen induziert zum einen eine Metallothionein-Expression in der Darmmukosa, so dass die intestinale Resorption von Kupfer vermindert wird, zum anderen führt es in der Leber durch dort induziertes hepatisches Metallothionein zu einer Bindung von Kupferionen (Stremmel et al., 1991; Roberts und Cox, 1998). Zink spielt auch als Neuromodulator eine wichtige Rolle, z.B. bei der Beeinflussung glutamaterger Strukturen. Auch hat es eine hemmende Wirkung auf NMDA-Rezeptoren und die Freisetzung von  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) (Frederickson et al., 2005; Krezel et al., 2007). Auch ein Einfluss von Zink auf unser Immunsystem ist nachgewiesen worden, beispielsweise sein Einfluss auf die Regulation von  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen (Uciechowski et al., 2008; Kahmann et al., 2006) oder auf die Steigerung der antiviralen Wirkung von Interferon-alpha auf das zehnfache (Berg et al., 2001).

## 1.2. Zink im Kontext von verschiedenen Krankheitsbildern

Die Wirkungen von Zink sind nicht nur bei physiologischen Prozessen beschrieben worden, auch seine Bedeutung bei vielen Krankheitsprozessen wird immer klarer. Bei der Acrodermatitis enterohepatica handelt es sich um eine Erkrankung, die den Gendermatosen zugeordnet wird und die auf einem Gendefekt des humanen Zinkaufnahme-Transporters hZIP4 (das Gen SLC39A4 kodiert für hZIP4) beruht. ZIP4 ist ein gewebsspezifischer Transporter, welcher hauptsächlich in Enterozyten exprimiert wird und für die Absorption von exogen aufgenommenem Zink im Dünndarm verantwortlich ist. Die Erkrankung beruht auf einem autosomal rezessiven Erbgang mit einer Prävalenz von 1:500.000 und ist gekennzeichnet durch eine partielle Reduktion der Zink-Aufnahme. Das klinische Bild ist durch die Trias: totale Alopezie / Hautläsionen lokalisiert an den Extremitäten, perioral und anogenital / anhaltende Diarrhoe oder andere gastrointestinale Dysfunktionen gekennzeichnet. Durch vermehrte orale Zinkzufuhr kann eine Vollremission der Symptome erzielt werden (Neldner et al., 1978). Auch ist bekannt, dass Zinkmangelbedingungen die Zahl der neutrophilen Granulozyten verringern sowie ihre Fähigkeit zur Chemotaxis (Ho et al., 2004). Auch die Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut und die Fähigkeit zur Phagozytose stellen Prozesse dar, die gestört sind. So ist die Abtötung von Pathogenen bei einem Zinkmangel stark vermindert (Rink und Gabriel, 2001) und die natürlichen Killerzellen verlieren ihre Fähigkeit, Zielzellen zu töten (Ferencik und Ebringer, 2003). Mittlerweile ist auch bekannt, dass eine exzessive Zinkfreisetzung intrazellulär und transsynaptisch eine Rolle in der Pathophysiologie von Schlaganfällen, Epilepsie, Schädel-Hirn-Traumata und neurodegenerativen Erkrankungen spielt.

Die Alzheimer-Krankheit (Morbus Alzheimer) ist eine neurodegenerative Erkrankung, deren Häufigkeit jenseits des 60. Lebensjahres steil ansteigt und für ungefähr 60 Prozent der weltweit etwa 24 Millionen Demenzerkrankungen verantwortlich ist (Ferri et al., 2005). Pathophysiologisch ist durch das Zusammenwirken genetischer und metabolischer Faktoren das Gleichgewicht unterschiedlicher Abbauege des  $\beta$ -APP (Amyloid Precursor- Protein), einem ubiquitären Membranprotein, hin zur Bildung des  $\beta$ -Amyloid-Peptids A $\beta$ 1–40/1–42 verschoben, welches auf mehrfache Weise neurotoxisch wirken kann. Es kommt dadurch zur Ablagerung von aggregierten A $\beta$  in kortikalen Amyloid-Plaques sowie perivaskulär (Hufschmidt und Lücking, 2009). Es wurde gezeigt, dass extrazelluläres freies Zink die Ablagerung von Amyloidplaques induziert (Bush et al., 1994) und dass die Bindung von  $Zn^{2+}$  mittels Chelator die Amyloidablagerungen reduzieren kann (Regland et al., 2001; Ritchie et al., 2003). Weiterhin wurde gezeigt, dass es zu Anreicherungen von freien Zinkionen in

Neuronen des Hippokampus von Alzheimer Patienten kommt, die bei Gesunden nicht nachzuweisen waren (Suh et al., 2000). Auch spielen Kupfer und Eisen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der Alzheimer Erkrankung. Alle diese drei Kationen finden sich signifikant erhöht in den Amyloid-Plaques (Lovell et al., 1998; Lovell et al., 1998). Es wird vermutet, dass die Alzheimererkrankung eine durch oxidativen Stress bedingte Freisetzung von Zinkionen darstellt (Cuajungco und Faget, 2003; Capasso et al., 2005).

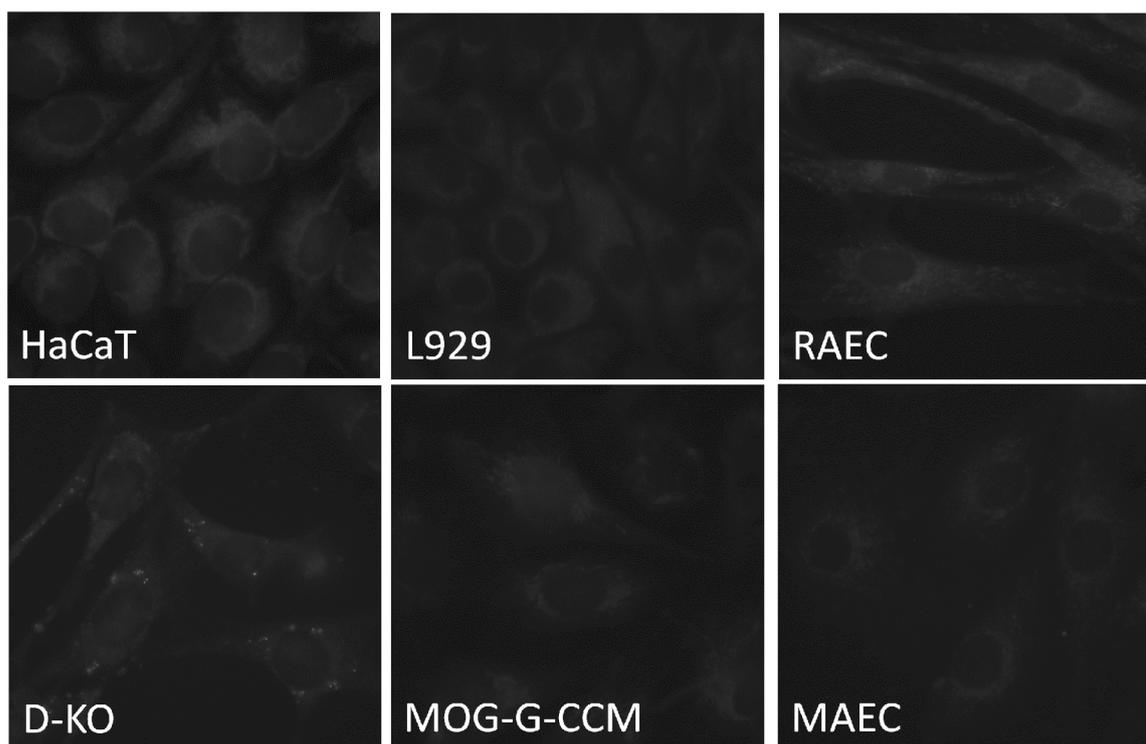
In Deutschland besteht eine alters-adjustierte jährliche Schlaganfallinzidenz von 182 pro 100.000 Einwohnern, damit steht der Schlaganfall an dritter Stelle der häufigsten Todesursachen (Kolominsky-Rabas und Heuschmann, 2002). Bei etwa 80% der Schlaganfälle ist die Ursache eine zerebrale Ischämie. Es wurde gezeigt, dass die synaptische Freisetzung von Zink von einer Untergruppe von glutaminergen neuronalen Enden nach einem ischämischen Infarkt die Akkumulation und Translokation von  $Zn^{2+}$  in benachbarte Neuronen fördert (Galasso und Dyck, 2007). Auch wurde gezeigt, dass ein neuronaler Untergang im Rahmen einer transienten zerebralen Ischämie mit einer  $Zn^{2+}$ -Akkumulation einhergeht und dass diese durch einen Zink spezifischen Chelator reduziert bzw. verhindert werden kann (Koh et al., 1996). Ähnliche Ergebnisse wurden auch beim Schädel-Hirn-Trauma gezeigt (Suh et al., 2000).

Die Hepatische Enzephalopathie ist das zerebrale klinische Erscheinungsbild bei einer unzureichenden Entgiftungsfunktion der Leber. Eine Schlüsselrolle in der Pathogenese ist hier die mangelnde Ammoniakentgiftung. Es kommt zur Akkumulation von Ammoniak in den Astrozyten, wodurch es zur Entwicklung eines Hirnödems mit entsprechender neurologischer Symptomatik kommt (Haussinger und Schliess, 2005; Kimelberg, 2005; Haussinger, 2006). Auch hier konnte eine Rolle von  $Zn^{2+}$  nachgewiesen werden.

### **1.3. $Zn^{2+}$ und seine intrazelluläre Bedeutung**

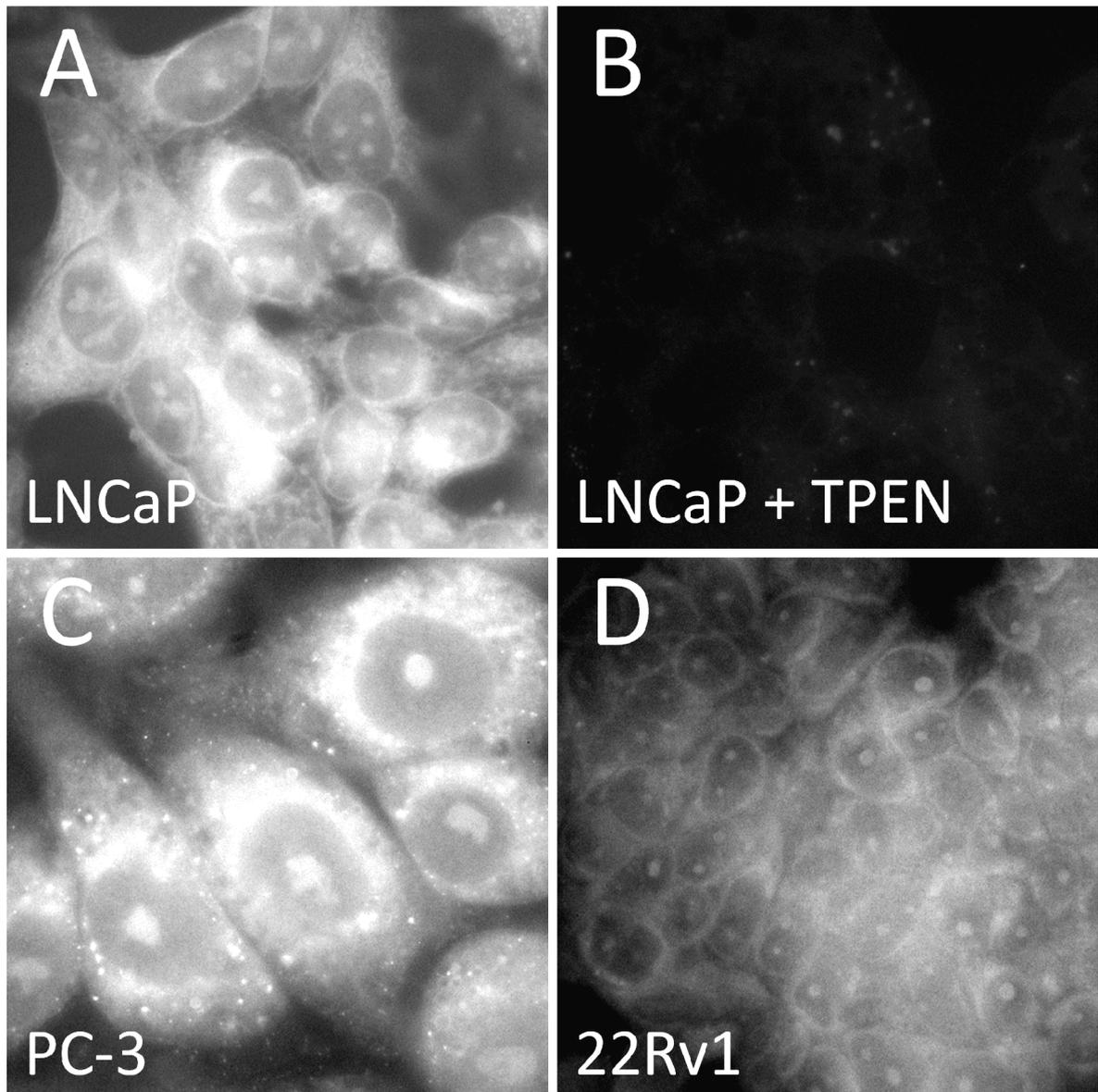
Zink ist nach Eisen das zweithäufigste Spurenelement im menschlichen Körper und stellt einen essentiellen Faktor für die Funktion und Struktur von mehr als 200 Enzymen dar. In biologischen Systemen kommt Zink immer als Zinkion ( $Zn^{2+}$ ) vor. Mehr als 97% des Zinks im Organismus ist an Proteine gebunden, 5-20% des zellulären Zinks an das Protein Methallothionein. Die intrazelluläre  $Zn^{2+}$ -Konzentration von eukaryotischen Zellen liegt bei etwa 200  $\mu M$ , aufgrund seiner Komplexbildung ist die Konzentration an freiem  $Zn^{2+}$  unter physiologischen Bedingungen jedoch im pico- und nanomolaren Bereich anzusiedeln (Palmiter und Findley, 1995; Krezel und Maret, 2007) (Abb. 1). Ausnahmen stellen Insel- und Prostatazellen dar, in denen es auch unter physiologischen Bedingungen einen erhöhten

Gehalt an freien intrazellulären Zinkionen gibt (Abb. 2). Gründe dafür sind bei den Prostatazellen der notwendige Bereitstellungsbedarf von Zink für die Samenflüssigkeit, während die Inselzellen Zink, wie schon oben erwähnt, zur Insulinspeicherung benötigen. Die intrazelluläre Bindung erfolgt durch die SH-Gruppen des Cysteins, die Stickstoffatome des Histidins sowie die Carboxylgruppen von Glutamat und Aspartat (Maret, 2006). SH-Gruppen sind unter anderem durch die Bildung von Fe-S- und Zn-S-Clustern essentiell für die Tertiärstruktur vieler Proteine. Zn-S-Cluster bilden relativ stabile „Loops“ in Aminosäurenketten, die unter anderem als sogenannte Zinkfinger in Transkriptionsfaktoren mit DNA, RNA oder Proteinen in Interaktion treten können (Klug und Schwabe, 1995). Etwa 3% der bisher indentifizierten Gene des menschlichen Genoms enthalten Zinkfingerproteine (Grüngreiff, 2006). Untersuchungen haben auch gezeigt, dass neben dem Zn-Cluster auch sogenannte Zn-Twist-Anordnungen existieren (Vallee und Falchuk, 1993). Ein Beispiel für den Zn-Twist ist der Glucocorticoid-Rezeptor (Schwabe et al., 1990), für den Zn-Cluster das Protein GAL4 in Hefen (Johnston, 1987).



**Abb. 1 Freie intrazelluläre  $Zn^{2+}$ -Ionen können bei verschiedenen Zellarten unter physiologischen Bedingungen mit dem Zink-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Zinquin nicht nachgewiesen werden**

HaCat, L929-Fibroblasten, RAEC, D-KO, MOG-G-CCM und MAEC wurden unter physiologischen Bedingungen jeweils für 30 Minuten mit 10  $\mu$ M Zinquin Ethyl Ester behandelt. Es zeigt sich keine Fluoreszenz-Aktivität aufgrund der überwiegenden Komplexierung der Zinkionen durch verschiedene zelluläre Proteine.



**Abb. 2 Nachweis von intrazellulären  $Zn^{2+}$ -Ionen in Prostatacarcinom-Zellen**

Verschiedene Arten von Prostatacarcinom-Zellen (A,B,C,D) wurden jeweils für 30 Minuten mit 10  $\mu$ M Zinquin Ethyl Ester (A,C,D) behandelt. Es zeigte sich schon unter physiologischen Bedingungen eine deutliche Fluoreszenzaktivität. Eine 40 minütige Behandlung mit 10  $\mu$ M des zink-spezifischen Chelators TPEN vor der Behandlung mit 10  $\mu$ M Zinquin Ethyl Ester zeigte dagegen keine signifikante Fluoreszenz-Aktivität (B).

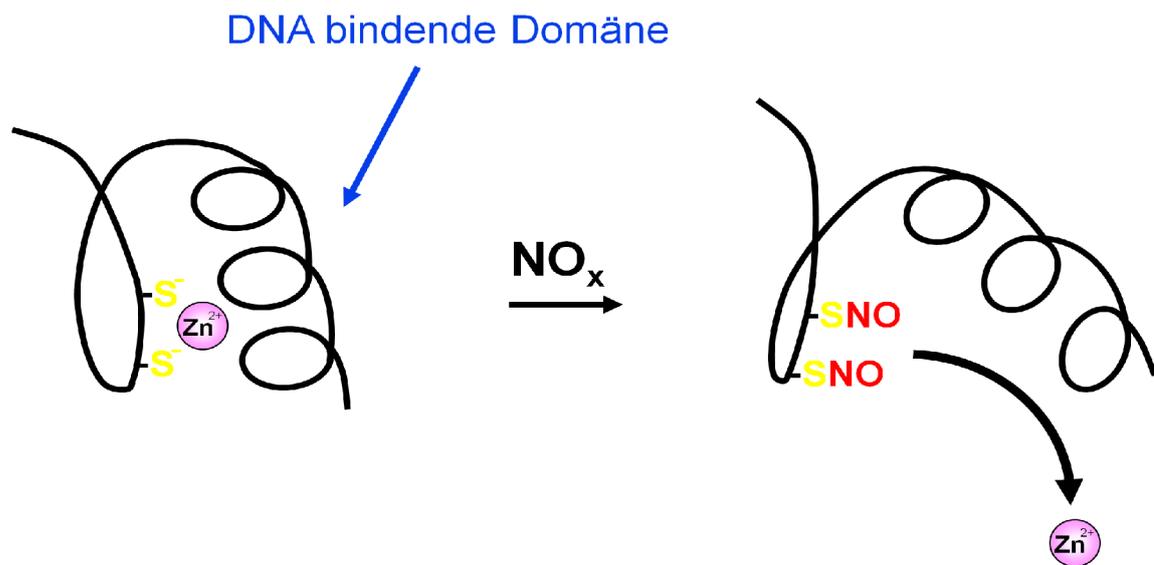
A + B + D in 63-facher Vergrößerung, C in 100-facher Vergrößerung.

**1.4. Störung der intrazellulären Zinkhomöostase**

Bisher sind wenige Stressarten identifiziert, die zu einer intrazellulären Freisetzung von Zinkionen aus Proteinen führen. Erstmals wurde dieser Einfluss auf die zelluläre Zinkhomöostase mit Hypochlorsäure (HOCl) gezeigt (Fliss et al., 1991). HOCl wird von aktivierten neutrophilen Granulozyten sezerniert und ist ein starkes Oxidationsmittel. Fliss et al. zeigten, dass die Behandlung von arteriellen Endothelzellen und von Herzgewebe mit

HOCl zu einer intrazellulären Zinkionenfreisetzung führt und zeigten somit erstmals, dass ein Oxidans dies bewirken kann. Jahre später gelang dies auch mittels reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Im Rahmen von oxidativem Stress kommt es zur Generierung verschiedener ROS. Zu den wichtigsten gehören das Hydroxylradikal, der Singulett-Sauerstoff, das Superoxid-Anion-Radikal und das Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), die bekanntermaßen zu den verschiedenartigsten Schädigungen auf zellulärer Ebene führen können (Sies, 1991; Sies und Groot, 1992). Ziel des gesunden Organismus ist es, ein Gleichgewicht zwischen reduktiven und oxidativen Prozessen herzustellen. Antioxidantien sind die Mittel des Organismus, einem oxidativen Stress entgegenzuwirken (Sies, 1987). Neuere Studien zeigen jedoch, dass ROS wie z.B. das Superoxid-Anion-Radikal und das Wasserstoffperoxid im Gehirn auch eine wichtige Signalfunktion bei der Signalübertragung, der synaptischen Plastizität sowie bei der Gedächtnisbildung haben (Kishida und Klann, 2007). Es wurde gezeigt, dass  $H_2O_2$  (Zalewski et al., 1994; Korichneva et al., 2002; Wiseman et al., 2007) in hohen Konzentrationen zu einer intrazellulären Zinkionenfreisetzung führt. Queseda et al. zeigten, dass  $H_2O_2$  in Zellen vor allem SH-Gruppen oxidiert und dass das freigesetzte  $Zn^{2+}$  überwiegend aus dem Metallothionein stammte (Queseda et al., 1996).

Ein weiterer Stressor, der einen Einfluss auf die zelluläre Zinkhomöostase hat, jedoch nicht der Gruppe der oxidativen Stressoren zugeordnet wird, ist das Stickstoffmonoxid (NO). NO spielt im Rahmen vieler Entzündungsprozesse eine wichtige Rolle und wird dabei durch die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) gebildet (Kroncke et al., 1995). Seine Auswirkungen werden als nitrosativer Stress bezeichnet. Es ist gezeigt worden, dass NO in vitro mittels S-Nitrosierung von Cysteinen eine Zinkionenfreisetzung aus dem Zinkspeicherprotein Metallothionein bewirkt (Kroncke et al., 1994) (Abb. 3). Kröncke et al. zeigten auch, dass nitrosativer Stress  $Zn^{2+}$  aus Zinkfinger-Strukturen freisetzt, was über eine Strukturänderung zur Hemmung der spezifischen Bindung von Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren an die DNA führt (Kroncke et al., 1994; Kroncke und Carlberg, 2000). NO zerstört Zinkfinger-Proteine nicht irreversibel, da die Zinkfinger über das zelluläre Redoxsystem wieder regeneriert werden können (Kroncke et al., 2002). Cortese-Krott et al. zeigten, dass die Inkubation von Endothelzellen mit NO diese vor den negativen Effekten einer  $H_2O_2$  Exposition schützt und dass dieser Schutz von der Freisetzung intrazellulärer Zinkionen abhängt (Cortese-Krott et al., 2009). Damit wurde nochmals die Bedeutung von Zinkionen als wichtigem Signalvermittler verdeutlicht.



**Abb. 3 Freisetzung von  $Zn^{2+}$  aus Zinkfingerstrukturen durch NO**

Nach S-Nitrosierung von Cysteinen der Zinkfingerstrukturen kommt es zur Freisetzung von Zinkionen. Die Änderung der Proteinkonformation bewirkt eine Hemmung der spezifischen Bindung von Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren an die DNA (Abb. aus Kroncke et al., 1995).

Phorbol 12-myristat 13-diacetat (PMA) ist ein irreversibler Aktivator der Proteinkinase C (PKC), welcher zu einer Aktivierung des Multienzymkomplexes NADPH-Oxidase führt und somit die Generierung von Sauerstoffradikalen induziert. Es wurde gezeigt, dass PMA zu einer intrazellulären Zinkionenfreisetzung bei einer Fibroblasten-Zell-Linie führt (Korichneva et al., 2002). Dies konnte auch bei Monozyten, nicht jedoch bei Lymphozyten nachgewiesen werden (Haase et al., 2006).

SH-Reagenzien sind Substanzen, die mit Sulfhydrylgruppen reagieren. *N*-Ethylmaleinimid (NEM) ist ein Imid, welches zur Blockierung von Sulfhydrylgruppen verwendet wird. Die Inkubation von Ratten-Glioblastomzellen mit subtoxischen NEM-Konzentrationen führte sowohl zu einer Zinkionenfreisetzung im Zytoplasma als auch in den Zellkernen (Haase und Beyersmann, 2002). Weiterhin wurde beobachtet, dass es nach einiger Zeit zu einer Verschiebung des intranukleären Zinkgehaltes zum Zytoplasma hin in sogenannte Zinkosomen kam. Auch 2,2-Dithiopyridin (DTDP), welches ebenfalls mit Sulfhydrylgruppen reagiert, bewirkt in Neuronen eine Zinkionenfreisetzung (Aizenman et al., 2000).

Schwermetalle gehören zu den Substanzen, deren Toxizität auf alle relevanten Systeme des menschlichen Organismus wie zum Beispiel auf das Nervensystem in verschiedenen Publikationen ausführlich beschrieben worden ist (Graeme und Pollack, 1998A; Graeme und Pollack, 1998B). Auch ist ihre Bedeutung im Rahmen der Karzinogenese mehrfach belegt worden, wobei der genaue molekulare Pathomechanismus jedoch weiterhin unklar ist. Es wurde gezeigt, dass die Generierung von oxidativem Stress hierbei eine entscheidende Rolle

spielt (Riger et al., 2011). Gezeigt wurde auch, dass die Behandlung von Zellen in vitro mit subtoxischen Konzentrationen von Schwer- bzw. Übergangsmetallen wie  $Pb^{2+}$  und auch  $Hg^{2+}$  zu einer intrazellulären Zinkionenfreisetzung führt. Bleichlorid ( $PbCl_2$ ) bewirkte dies bei Rattenhepatozyten (Brand und Kleineke, 1996) und Quecksilber ( $HgCl_2$ ) bei einer T- Zelllinie (Haase et al., 2006).

## 1.5. Ziele dieser Arbeit

Folgende Fragen sollten in dieser Arbeit beantwortet werden:

- Welche neben den bekannten Stressarten führen unter subtoxischen Bedingungen auch zu einer  $Zn^{2+}$ -Freisetzung?
- Handelt es sich um ein generelles Phänomen, welches bei allen Stressarten vorkommt?
- Welches sind die für die intrazelluläre  $Zn^{2+}$ -Freisetzung verantwortlichen Moleküle?
- Gibt es relevante Unterschiede im Muster einer intrazellulären  $Zn^{2+}$ -Freisetzung abhängig von der jeweiligen Stressart?
- Gibt es Stressarten, die isoliert zu einer nukleären oder zu einer zytoplasmatischen  $Zn^{2+}$ -Freisetzung führen?
- Handelt es sich bei der durch eine Stressart hervorgerufenen intrazellulären  $Zn^{2+}$ -Freisetzung um einen reversiblen Prozess oder adaptiert sich die Zelle an die jeweilige Stressart und ist so vor einer wiederholten  $Zn^{2+}$ -Freisetzung geschützt?
- Können Stressarten die Zinkhomöostase bestimmter Zellarten spezifisch beeinflussen oder handelt es sich um ein zelltypenspezifisches Phänomen?
- Ist die intrazelluläre  $Zn^{2+}$ -Freisetzung ein Prozess, der ausschließlich von Metallothionein abhängig ist?

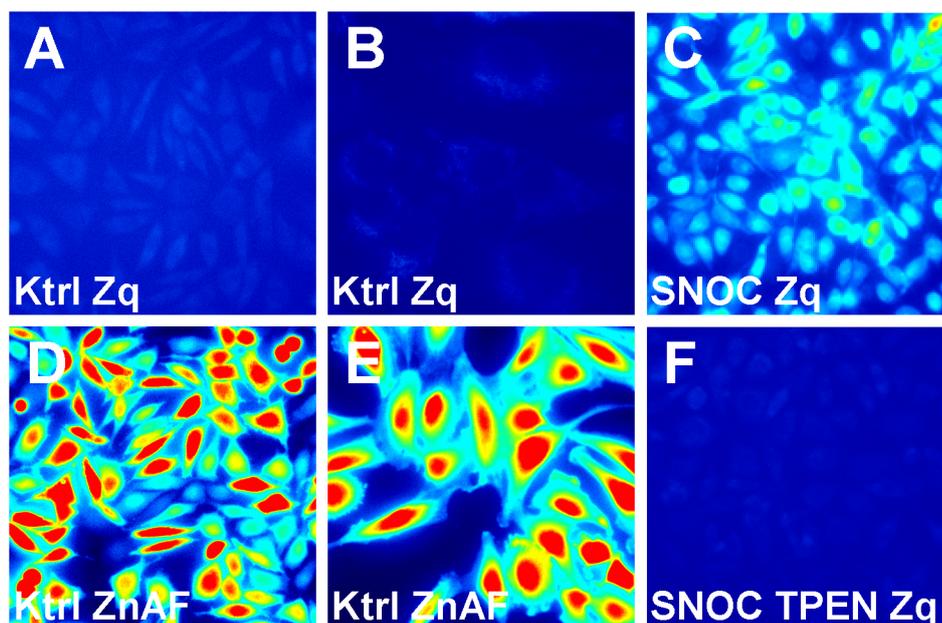
## 2. Material und Methoden

Die verwendeten Materialien und die angewandten Methoden sind in den beiden Publikationen Pirev et al. 2008 + 2010 beschrieben.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Nachweis von intrazellulären Zinkionen durch Fluoreszenzfarbstoffe

Als Fluoreszenzfarbstoff zum Nachweis der freien intrazellulären Zinkionen wurde Zinquin Ethyl Ester gewählt. Dieser zink-spezifische Fluoreszenzfarbstoff wird von Zellen aufgenommen, anschließend wird seine Ethylestergruppe durch intrazelluläre Esterasen abgespalten, so dass Zinquin als doppelt negativ geladenes Molekül nicht mehr aus der Zelle heraustransportiert wird. Die Bindung von Zinkionen bewirkt eine Fluoreszenzaktivität und kann daher zur quantitativen Bestimmung von freien intrazellulären Zinkionen-Konzentrationen benutzt werden. Alternativ wurde auch ZnAF-2-DA eingesetzt, ein weiterer zink-spezifischer Fluoreszenzfarbstoff. Unbehandelte Zellen (Abb. 4 A + D, L929-Fibroblasten, B + E, MOG-G-CCM Astrozyten), im weiteren Verlauf als Kontrollzellen bezeichnet, wurden jeweils mit 10  $\mu$ M Zinquin Ethyl Ester (Abb. 4 A + B) und 10  $\mu$ M ZnAF-2-DA (Abb. 4 D + E) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.



**Abb. 4 Nachweis von intrazellulären  $Zn^{2+}$ -Ionen durch Fluoreszenzfarbstoffe**

L929-Fibroblasten (A,C,D,F) und MOG-G-CCM-Zellen (B,E) wurden unter physiologischen Bedingungen jeweils für 30 Minuten mit 10  $\mu$ M Zinquin Ethyl Ester (A,B) bzw. 10  $\mu$ M ZnAF-2-DA behandelt (D,E). Mit ZnAF-2-DA zeigt sich eine ausgeprägte Fluoreszenz-Aktivität, während sich mit Zinquin Ethyl Ester keine signifikante Aktivität zeigt. Nach Inkubation der L929-Fibroblasten mit 2 mM S-Nitrosocystein für 40 Minuten und nachfolgender Zinquin Ethyl Ester Behandlung (C) zeigt sich im Vergleich zu den Kontrollzellen (A) eine signifikante Fluoreszenz-Aktivität. Eine 40 minütige Behandlung mit 10  $\mu$ M des zink-spezifischen Chelators TPEN vor der Behandlung mit S-Nitrosocystein und anschließende Inkubation mit 10  $\mu$ M Zinquin Ethyl Ester ergab keine signifikante Fluoreszenz-Aktivität (F) und zeigt die Zink-Spezifität von Zinquin Ethyl Ester.

In Abb. 4 D + E ist zu sehen, dass ZnAF-2-DA auch unter physiologischen Bedingungen eine ausgeprägte Fluoreszenz-Aktivität zeigt, während Zinquin Ethyl Ester unter physiologischen Bedingungen keine Fluoreszenz-Aktivität zeigt. Dies lässt darauf schließen, dass ZnAF-2-DA  $Zn^{2+}$  aus Zink-komplexierenden Proteinen herauslöst. Als Positivkontrolle wurden die L929-Fibroblasten für etwa 40 Minuten mit 2 mM des spontan NO freisetzenden NO-Donors S-Nitrosocystein (SNOC) behandelt und anschließend 30 Minuten lang mit 10  $\mu$ M Zinquin Ethyl Ester inkubiert (Abb. 4 C). Es zeigte sich im Vergleich zu den unbehandelten L929-Fibroblasten eine deutliche Fluoreszenz-Aktivität, also eine durch nitrosativen Stress hervorgerufene intrazelluläre Freisetzung von Zinkionen. Um zu zeigen, dass es sich bei Zinquin Ethyl Ester um einen zinkspezifischen Fluoreszenzfarbstoff handelt, wurden die L929-Fibroblasten vor der SNOC-Behandlung für etwa 40 Minuten mit 10  $\mu$ M des zink-spezifischen Chelators TPEN behandelt und anschließend mit 10  $\mu$ M Zinquin Ethyl Ester inkubiert (Abb. 4 F). Die Fluoreszenz-Aktivität war unter diesen Bedingungen vergleichbar mit der von unbehandelten Kontrollzellen. Insgesamt zeigt sich, dass Zinquin Ethyl Ester der geeignetere Fluoreszenzfarbstoff für die weiteren Versuche ist, da er im Gegensatz zu ZnAF-2-DA zu keiner relevanten Komplexierung von an intrazellulären Proteinen gebundenen Zinkionen führt.

### 3.2 Oxidativer Stress und die zelluläre Zinkhomöostase

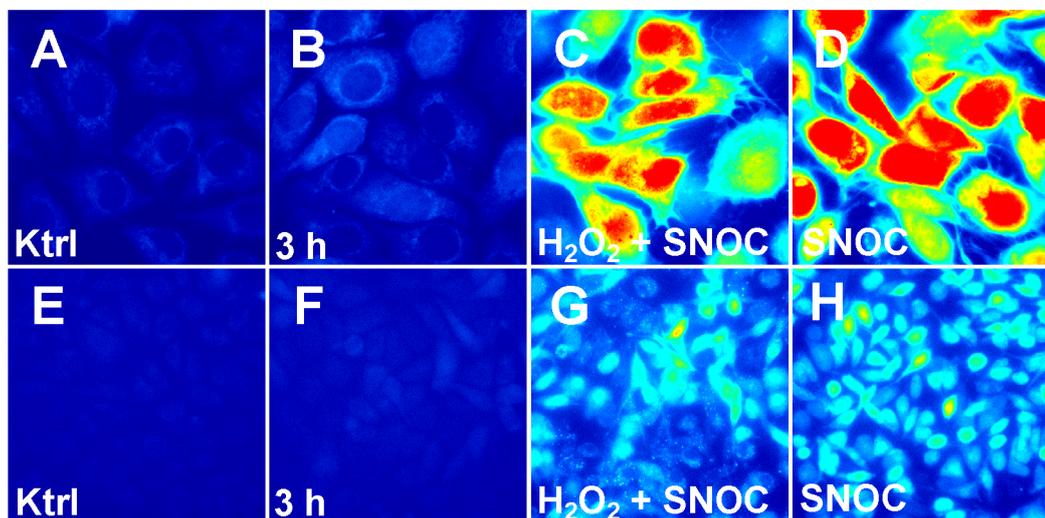
**Publikation A: E. Pirev, C. Calles, P. Schroeder, H. Sies, K.-D. Kröncke (2008). Ultraviolet-A irradiation but not ultraviolet-B or infrared-A irradiation leads to a disturbed zinc homeostasis in cells; Free Radic. Biol. Med. 45, 86-91**

Um zu untersuchen, ob ultraviolette oder infrarote Strahlen intrazellulär Zinkionen freisetzen, wurden Zellen so bestrahlt, dass nach 24 Stunden mehr als 80% der Zellen mit einer normalen Zellkernmorphologie überlebten.

L929-Fibroblasten wurden mit einer Dosis von 35  $J/cm^2$  UV-A bestrahlt, welche in Toxizitätsversuchen vorher als subtoxisch charakterisiert wurde. Es zeigte sich eine transiente intrazelluläre  $Zn^{2+}$ -Freisetzung mit einem Höhepunkt nach etwa 2 Stunden und einer vollständigen Reversibilität nach 24 Stunden (**Publikation A, Fig. 1**). Versuche mit einer Dosis von 10 und 20  $J/cm^2$  zeigten keine relevante Freisetzung. Vergleichend dazu wurden Bestrahlungsversuche mit subtoxischen Dosen von UV-B bzw. Infrarot-A durchgeführt, in denen es aber zu keiner mit Zinquin detektierbaren intrazellulären  $Zn^{2+}$ -Freisetzung kam (**Publikation A, Fig. 1**).

Schlussfolgernd aus der Tatsache, dass eine UV-A Bestrahlung, im Gegensatz zu einer UV-B- bzw. Infrarot-A Licht-Bestrahlung, zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt (Matsumura und Ananthaswamy, 2004), sollte die These überprüft werden, dass die Generierung von oxidativem Stress zu einer intrazellulären Zinkionenfreisetzung führt. Deshalb wurden nachfolgend die einzelnen reaktiven Sauerstoffspezies hinsichtlich ihres Einflusses auf die zelluläre Zinkhomöostase untersucht.

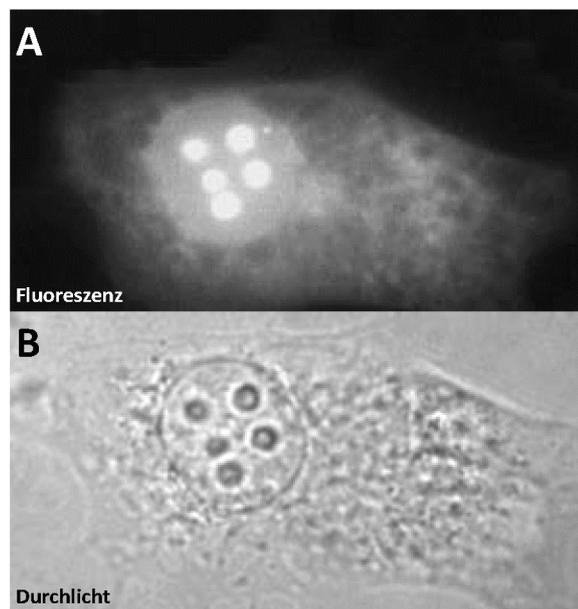
Als erstes erfolgte eine Exposition der L929-Fibroblasten mit  $H_2O_2$  als einem der Vertreter der Hydroperoxide. Wiseman et al. hatten mit isolierten pulmonalen arteriellen Endothelzellen gezeigt, dass ab einer Konzentration von 0,5-1 mM  $H_2O_2$  nach 4 Stunden eine intrazelluläre Zinkionenfreisetzung erfolgt (Wiseman et al., 2007). Bei den Fibroblasten dagegen zeigte sich, dass die subtoxische Dosis von 3 mM  $H_2O_2$  zu keinem getesteten Zeitpunkt eine relevante intrazelluläre  $Zn^{2+}$ -Freisetzung bewirkt (Abb. 5 und **Publikation A, Fig. 2**). Um zu zeigen, dass  $H_2O_2$  keinerlei hemmende Wirkung auf die Zinkionenbindungskapazität von Zinquin hat, wurden die L929-Fibroblasten nach der  $H_2O_2$ -Behandlung zusätzlich mit 2 mM SNOC für 40 Minuten inkubiert, bevor sie mit Zinquin inkubiert wurden. Es zeigte sich eine Fluoreszenz-Aktivität vergleichbar mit der einer alleinigen SNOC-Exposition. Dies zeigt, dass  $H_2O_2$  die Zinkionen-Bindungseigenschaften von Zinquin nicht hemmt.



**Abb. 5  $H_2O_2$  bewirkt in Fibroblasten keine signifikante intrazelluläre  $Zn^{2+}$ -Freisetzung**

L929-Fibroblasten wurden mit 3 mM  $H_2O_2$  inkubiert, nach den angegebenen Zeitpunkten mit 10  $\mu$ M Zinquin Ethyl Ester behandelt und die Fluoreszenz unter dem Mikroskop ausgewertet (obere Bilderreihe in 63-facher Vergrößerung, untere Bilderreihe in 25-facher Vergrößerung). Bilder A + E zeigen unbehandelte Zellen, Bilder B + F zeigen Zellen, die 3 Stunden lang mit 3 mM  $H_2O_2$  behandelt wurden. Es zeigt sich keine signifikante Zinkfreisetzung. Bilder C + G zeigen zusätzlich zur 3-stündigen  $H_2O_2$ -Exposition eine nachfolgende 40-minütige Exposition der Zellen mit 2 mM SNOC. Bilder D + H zeigen zum Vergleich eine alleinige SNOC-Exposition. In beiden Fällen zeigt sich eine vergleichbare intrazelluläre Zinkfreisetzung.

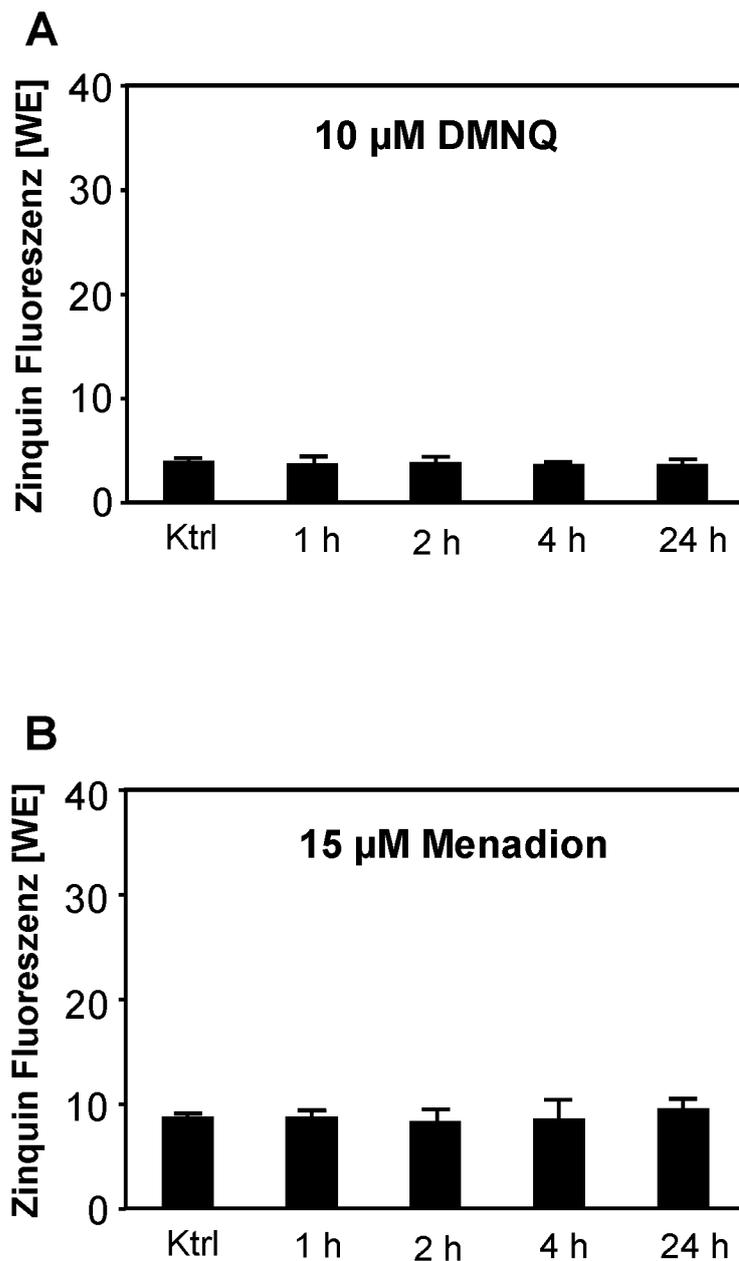
Als weiteres Hydroperoxid wurde tert-butyl-Hydroperoxid (t-BH) getestet. Die Inkubation von L929-Fibroblasten mit der subtoxischen Dosis von 200  $\mu\text{M}$  t-BH zeigte eine transiente intrazelluläre  $\text{Zn}^{2+}$ -Freisetzung mit einem Höhepunkt nach etwa 4 Stunden und einer vollständigen Reversibilität nach 24 Stunden (**Publikation A, Fig. 3**). Versuche mit der toxischen Dosis von 300  $\mu\text{M}$  t-BH zeigten im Unterschied dazu mit dem Auftreten von fluoreszierenden runden intranukleären Strukturen ein anderes Fluoreszenzmuster, welches auch noch nach 24 Stunden bei lebenden und toten Zellen sichtbar war (**Publikation A, Fig. 3**). Ein weitere reaktive Sauerstoffspezies ist Singulett-Sauerstoff. Rose Bengal ist ein lipophiler Farbstoff, der als Photosensitizer dient und nach Exposition mit weissem Licht unabhängig von UV-A intrazellulär Singulett-Sauerstoff generiert (Klotz et al., 1999). Eine Inkubation von L929-Fibroblasten mit dem Singulett-Sauerstoff-Donor Rose Bengal in der subtoxischen Konzentration von 4  $\mu\text{M}$  und anschließender 10 minütiger Lichtexposition zeigt ebenfalls eine transiente intrazelluläre  $\text{Zn}^{2+}$ -Freisetzung mit einem Höhepunkt nach etwa 1 Stunde und einer vollständigen Reversibilität nach 24 Stunden (**Publikation A, Fig. 4**). Auch hier zeigten Versuche mit der toxischen Dosis von 6  $\mu\text{M}$  Rose Bengal das Auftreten von fluoreszierenden runden intranukleären Strukturen, welche auch noch nach 24 Stunden bei lebenden und toten Zellen sichtbar waren (Abb. 6 und **Publikation A, Fig. 4**).



#### **Abb. 6 Fluoreszierende intranukleäre runde Strukturen**

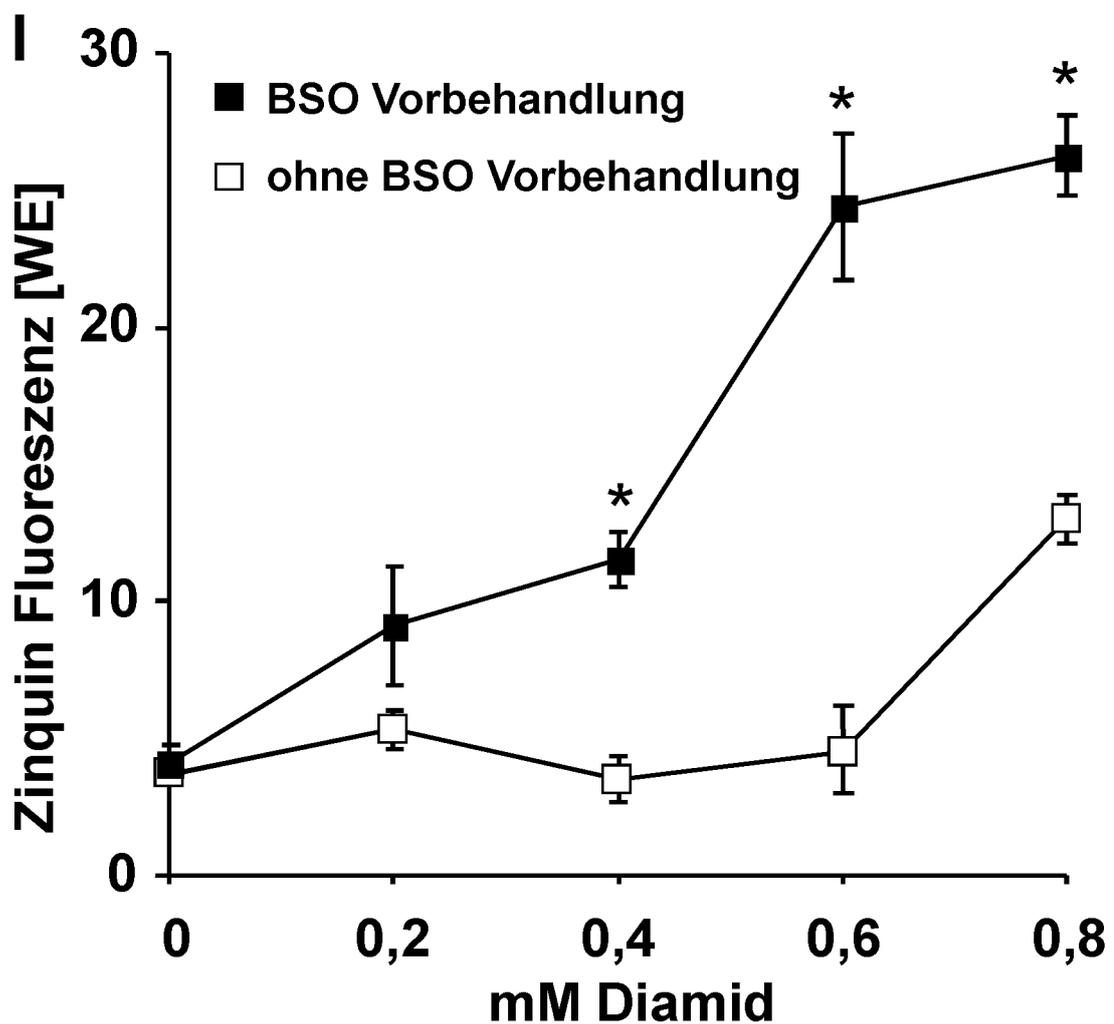
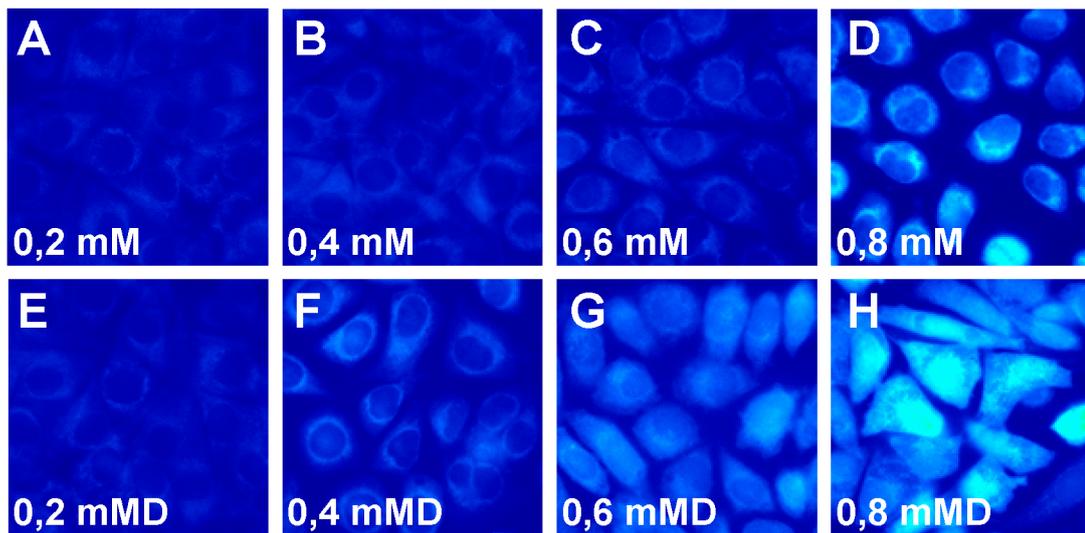
Bild A: L929-Fibroblast (100-fache Vergrößerung) nach 10 minütiger Inkubation mit 6  $\mu\text{M}$  Rose Bengal, anschließender 10 minütiger Bestrahlung mit Licht und Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Zinquin nach 2,5 Stunden für 30 Minuten. Es zeigt sich eine Fluoreszenz-Aktivität sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus. Besonders markant sind die im Zellkern lokalisierten runden fluoreszierenden Strukturen, die auch vereinzelt nach UV-A Bestrahlung und nach Exposition der Zellen mit toxischen t-BH-Konzentrationen auftraten. Bild B: Derselbe Bildausschnitt im Durchlicht. Fluoreszierende Strukturen sind ebenfalls sichtbar.

Eine weitere reaktive Sauerstoffspezies kann intrazellulär durch Chinone generiert werden. Diese als Redox-Cycler bekannten Chinone werden durch eine zelluläre Reduktase reduziert und bilden dabei Superoxid-Anion-Radikale (Kappus und Sies, 1981). L929-Fibroblasten wurden mit den Naphtochinon-Derivaten DMNQ bzw. Menadion inkubiert. Es zeigte sich, dass subtoxische Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  DMNQ und 15  $\mu\text{M}$  Menadion zu keinem getesteten Zeitpunkt eine intrazelluläre  $\text{Zn}^{2+}$ -Freisetzung bewirken (Abb. 7). Toxische Konzentrationen von 15  $\mu\text{M}$  DMNQ und 30  $\mu\text{M}$  Menadion dagegen führen nach etwa zwei Stunden zu einer zytoplasmatischen und intranukleären Zinkionenfreisetzung.



**Abb. 7 DMNQ und Menadion bewirken keine signifikante intrazelluläre  $\text{Zn}^{2+}$ -Freisetzung**  
 Die Zellen wurden ohne bzw. mit 10  $\mu\text{M}$  DMNQ (A) bzw. 15  $\mu\text{M}$  Menadion (B) inkubiert und nach 1-24 h mit 10  $\mu\text{M}$  Zinquin behandelt. Zu keinem Zeitpunkt war eine intrazelluläre Zinquin-Aktivität sichtbar. Es handelt sich dabei um subtoxische Konzentrationen von DMNQ bzw. Menadion.

Diamid ist ein Thiol-Oxidans, das insbesondere durch Oxidation von Glutathion (GSH), einem wichtigen zellulären Antioxidans, zur Steigerung des Glutathiondisulfid (GSSG)-Spiegels in der Zelle führt und somit das Redox-Gleichgewicht verschiebt (Kosower und Kosower, 1995). Toxizitätsversuche zeigten, dass 0,8 mM Diamid subtoxisch ist, während höhere Konzentrationen nach 24 Stunden eine signifikante Toxizität bewirkten. Die Inkubation von L929-Fibroblasten mit 0,8 mM Diamid zeigte eine transiente intrazelluläre  $Zn^{2+}$ -Freisetzung mit einem Höhepunkt nach etwa 1 Stunde und einer vollständigen Reversibilität nach 24 Stunden (**Publikation A, Fig. 5**). Versuche mit Konzentrationen von 0,2 - 0,6 mM Diamid zeigten dagegen keine signifikante  $Zn^{2+}$ -Freisetzung. Um zu überprüfen, ob die Diamid-induzierte Zinkionenfreisetzung von der intrazellulären GSH-Konzentration abhängt, wurde zusätzlich der GSH-Gehalt der Zelle verringert, um den Diamid-Effekt zu potenzieren. Der Gamma-Glutamylcystein-Synthase Inhibitor L-Buthionin-[S,R]-Sulfoximin (BSO) ist ein spezifischer irreversibler Biosynthese-Hemmer von GSH, der den intrazellulären GSH-Gehalt innerhalb von 24 Stunden auf unter 20% herunterreguliert (Berendji et al., 1999). Die Zellen wurden daher 24 Stunden lang mit 3 mM BSO vorinkubiert und anschließend 1 Stunde lang mit verschiedenen Diamid-Konzentrationen behandelt. Zum Vergleich erfolgte eine Diamid-Behandlung ohne BSO-Vorinkubation. In Abb. 8 ist zu sehen, dass eine Vorinkubation mit BSO zu einer signifikanten  $Zn^{2+}$ -Freisetzung schon ab 0,4 mM Diamid und damit zu einer Linksverschiebung der wirksamen Diamid-Konzentration führt. Dies zeigt, dass die intrazelluläre GSH-Konzentration und damit der Redox-Status einer Zelle die Zink-Homöostase beeinflusst. Eine alleinige 24-stündige Inkubation der L929-Fibroblasten mit BSO führte zu keinem Zeitpunkt zu einer intrazellulären Zinkionenfreisetzung.



**Abb. 8 Eine Hemmung der GSH-Biosynthese potenziert den Effekt von Diamid**

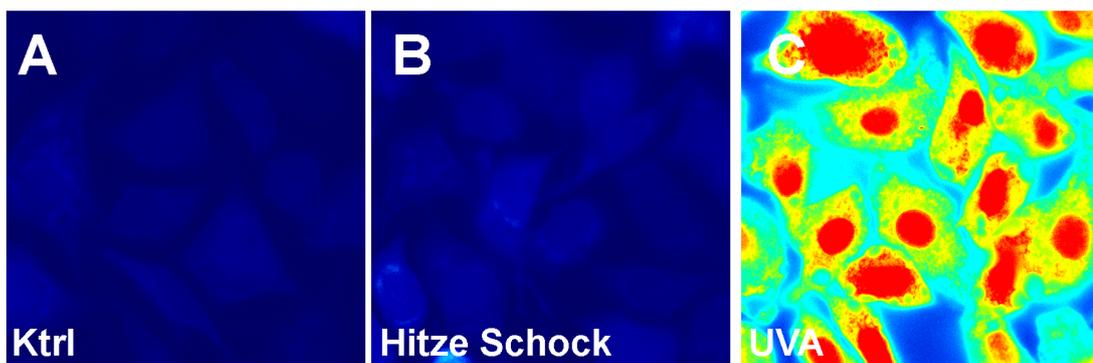
L929-Fibroblasten wurden für 24 Stunden mit 3 mM BSO vorinkubiert und danach für eine Stunde mit 0,2-0,8 mM Diamid behandelt (E,F,G,H). Parallel wurden L929-Fibroblasten ohne Vorinkubation mit Diamid behandelt (A,B,C,D). Nach einer Stunde erfolgte die Inkubation mit 10  $\mu$ M Zinquin Ethyl Ester und die Auswertung der Fluoreszenz unter dem Mikroskop. Die Quantifizierung der Fluoreszenz (I) zeigt, dass eine signifikante intrazelluläre  $Zn^{2+}$ -Freisetzung bei den vorinkubierten Zellen bereits ab 0,4 mM Diamid zu beobachten ist, ohne Vorinkubation mit BSO jedoch erst ab 0,8 mM Diamid. \* $p < 0,0004$

### 3.3 Hitze-Schock und die zelluläre Zinkhomöostase

**Publikation B:** E. Pirev, Y. Ince, H. Sies, K.-D. Kröncke (2009). Heat shock but not cold shock leads to disturbed intracellular zinc homeostasis; *J. Cell. Physiol.* **223**, 103-109

Nach Untersuchung des Einflusses von Bestrahlungen und oxidativem Stress auf die zelluläre Zinkhomöostase stellte sich die Frage, welche weiteren Stressfaktoren Einfluss darauf haben könnten. Die Auswirkungen eines Hitze-Schocks wurden bisher vor allem auf der Gen- und Proteinexpressionsebene untersucht (Kregel, 2002), während die Auswirkungen auf die Homöostase von zellulären Metallionen kaum untersucht wurden.

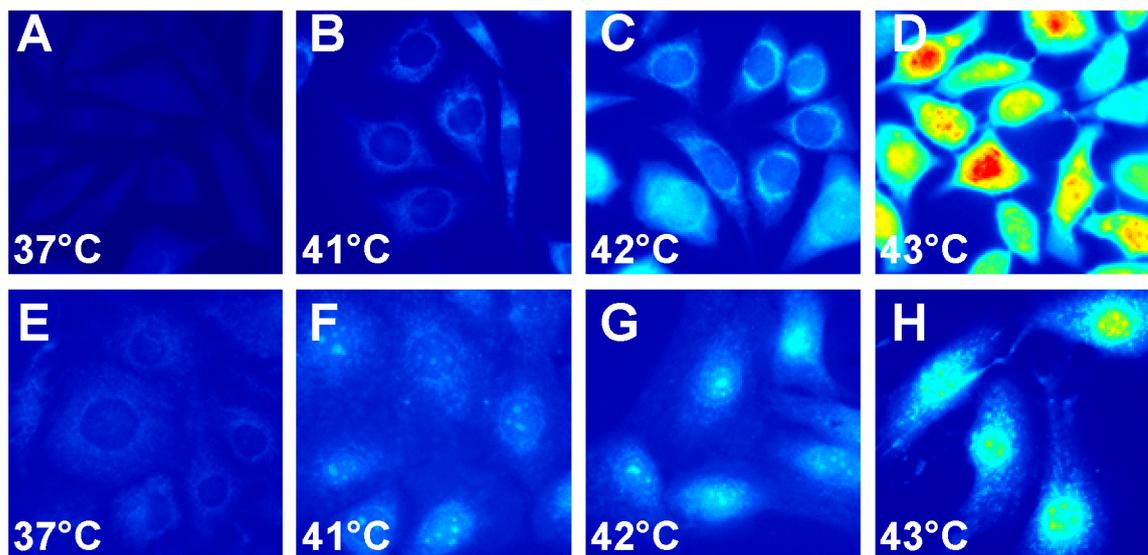
Um zu bestimmen, welche Temperatur für die Zellen (MAEC und L929) subtoxisch ist, wurden die Zellen bei verschiedenen Temperaturen 0,5 - 1 Stunde lang inkubiert und die Toxizität nach einer anschließenden 24-stündigen Kultur bei 37°C bestimmt. Es zeigte sich, dass für die L929-Fibroblasten eine Temperatur von 43°C mit einer Inkubationszeit von 30 Minuten und für die MAEC 43°C mit einer Inkubationszeit von 1 Stunde subtoxisch ist (**Publikation B**, **Fig. 1**). Anschließend sollte die Frage geklärt werden, ob ein Hitze-Schock einen signifikanten intrazellulären oxidativen Stress hervorruft. Dazu wurden Maus-Aorta-Endothelzellen (MAEC) 1 Stunde bei 43°C kultiviert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff H<sub>2</sub>DCF-DA inkubiert, einem Marker für oxidativen Stress. Als Positiv-Kontrolle wurden die Zellen mit UV-A bestrahlt (Abb. 9 und **Publikation B**, **Fig. 7**).



**Abb. 9 Ein Hitze-Schock erzeugt keinen signifikanten intrazellulären oxidativen Stress**

MAEC (Maus-Aorta-Endothelzellen) wurden 1 Stunde lang bei 43°C kultiviert und danach mit 1  $\mu$ M H<sub>2</sub>DCF-DA bei 37°C für 30 Minuten inkubiert (B). Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 20 J/cm<sup>2</sup> UV-A Licht bestrahlt (C), als Negativkontrolle wurden unbeladene Zellen verwendet (A). Es zeigt sich, dass ein Hitze-Schock keinen signifikanten intrazellulären oxidativen Stress erzeugt. Im Vergleich dazu zeigt die ausgeprägte Fluoreszenz bei den UV-A bestrahlten Zellen die Generierung von oxidativem Stress.

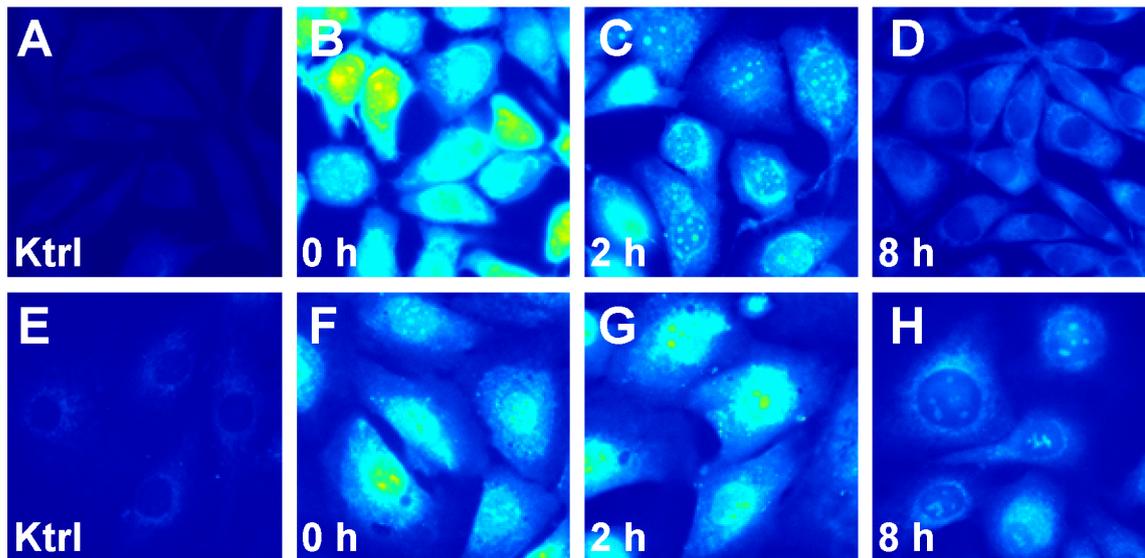
In den ersten Versuchsreihen sollte die Frage beantwortet werden, ob ein Hitze-Schock zu einer temperaturabhängigen intrazellulären  $Zn^{2+}$ -Freisetzung führt. Dazu wurden die Zellen bei Temperaturen von 37°C bis 43°C inkubiert, die L929-Fibroblasten für 30 Minuten, die MAEC für eine 1 Stunde. Es zeigte sich eine temperaturabhängige intrazelluläre  $Zn^{2+}$ -Freisetzung (Abb.10 und **Publikation B, Fig. 2**).



**Abb. 10 Temperatur-abhängige intrazelluläre Zinkionenfreisetzung**

L929 (A-D) und MAEC (E-H) wurden bei den oben angegebenen Temperaturen kultiviert und anschließend bei 37°C für 30 Minuten mit 10  $\mu$ M Zinquin Ethyl Ester inkubiert. Es zeigt sich eine mit der Temperatur zunehmende Fluoreszenz-Aktivität. Auffallend ist, dass die im Zellkern lokalisierten runden fluoreszierenden Strukturen, die auch vereinzelt bei UV-A Bestrahlung und bei Exposition der Zellen mit toxischen t-BH- und Rose Bengal-Konzentrationen aufgetreten waren, nach einem Hitze-Schock unter subtoxischen Bedingungen in beiden Zelltypen sichtbar waren.

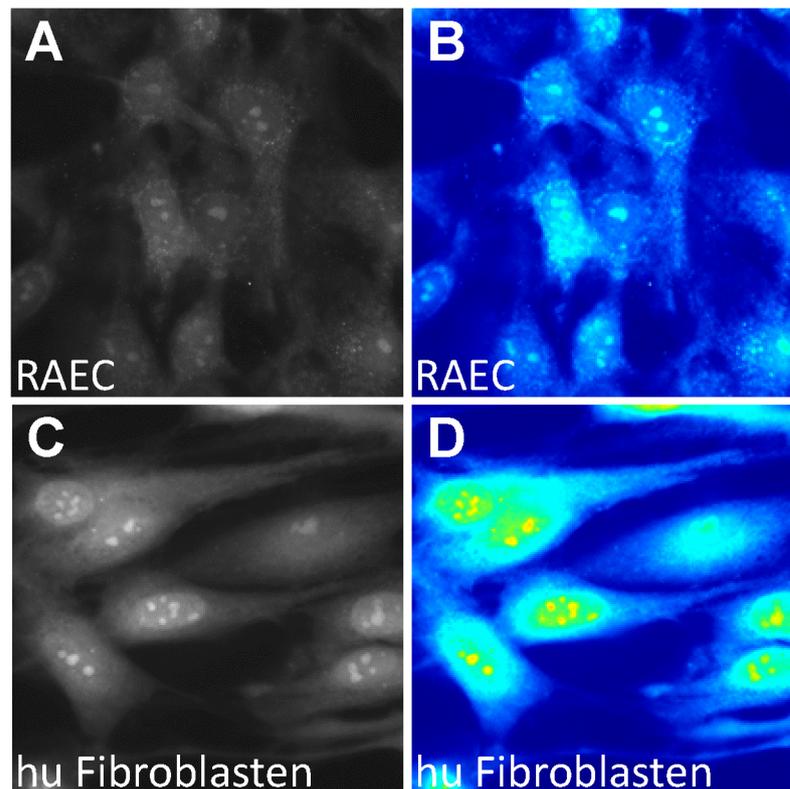
Um den zeitlichen Verlauf der intrazellulären Zinkionen-Freisetzung zu untersuchen, wurden die L929-Fibroblasten für 30 Minuten und die MAEC für 1 Stunde bei 43°C inkubiert, nach unterschiedlichen Zeiten bei 37°C mit Zinquin Ethyl Ester behandelt und die Fluoreszenz unter dem Mikroskop ausgewertet. Es zeigte sich eine transiente Zinkionen-Freisetzung (Abb. 11 und **Publikation B, Fig. 3**). Wurden die Zellen nach 24 Stunden erneut mit einem Hitze-Schock behandelt, zeigte sich dasselbe Phänomen.



**Abb. 11 Ein Hitze-Schock sorgt für eine transiente intrazelluläre  $Zn^{2+}$ -Freisetzung**

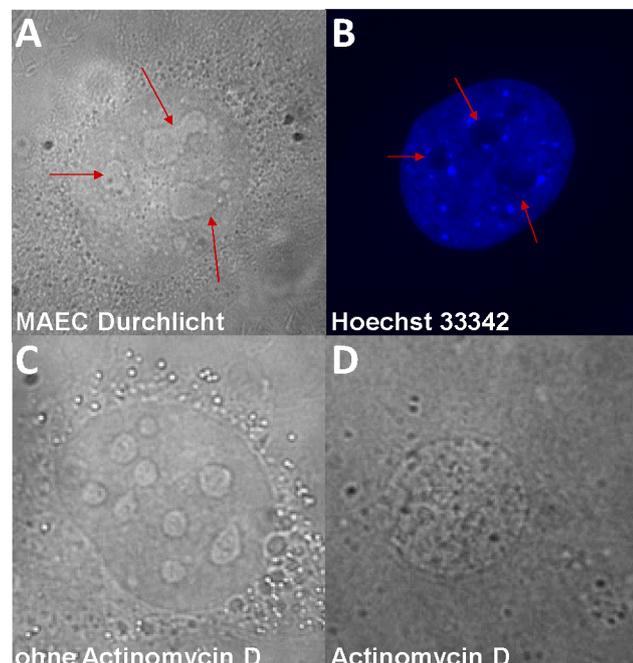
L929 (A-D) wurden für 30 Minuten und MAEC (E-H) für 1 Stunde bei 43°C kultiviert und anschließend zu den oben aufgeführten Zeitpunkten bei 37°C mit 10  $\mu$ M Zinquin Ethyl Ester inkubiert. Es zeigt sich eine transiente intrazelluläre  $Zn^{2+}$ -Freisetzung mit dem Höhepunkt sofort nach dem Hitze-Schock und vollständiger Reversibilität nach 8 Stunden bei den L929-Fibroblasten und bei den MAEC mit einem Höhepunkt nach 2 Stunden mit vollständiger Reversibilität nach 18 Stunden (hier nicht gezeigt). Deutlich zu erkennen (C,H) sind die im Zellkern lokalisierten runden fluoreszierenden Strukturen.

Auffallend sind die auftretenden intranukleären fluoreszierenden Strukturen, die auch nach Exposition mit subtoxischen Konzentrationen von oxidativen Stressoren vereinzelt sichtbar waren (Abb. 6). Diese auffälligen intranukleären Strukturen wurden auch bei Hitze Schock-Versuchen (30 Minuten/43°C) mit Ratten-Aorta-Endothelzellen (RAEC), humanen Hautfibroblasten und mit der humanen Astrozyten-Zelllinie MOG-G-CCM beobachtet (Abb. 12). Da die runden fluoreszierenden Strukturen auch im Durchlicht im Nukleus sichtbar waren, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei den intranukleären Strukturen, in denen es unter den beschriebenen Bedingungen zu einer Zinkansammlung kommt, um Nukleoli handelt. Um diese These zu bestätigen, wurden die MAEC mit Actinomycin D, welches zu einer Desorganisation der Nukleoli führt (Phillips und Phillips, 1971), vorinkubiert und danach mit einem Hitze-Schock behandelt. Es zeigten sich im Vergleich zu den nicht vorinkubierten Zellen keine runden fluoreszierenden Strukturen mehr. Auch im Durchlicht war eine Desorganisation der zuvor gesehenen Strukturen zu sehen (Abb. 13 und **Publikation B, Fig. 4**). Dies zeigt, dass es sich bei den fluoreszierenden intranukleären Strukturen um Nukleoli handelt.



**Abb. 12 Fluoreszierende intranukleäre runde Strukturen**

Eine Inkubation mit einem Hitze-Schock (30 Minuten/43°C) führt auch bei Ratten-Aorta-Endothelzellen (RAEC) und humanen Hautfibroblasten zu intranukleär auftretenden fluoreszierenden Strukturen (A,C: schwarz-Weiss-Darstellung, B,D: entsprechend farbige Darstellung).



**Abb. 13 Bei den fluoreszierenden intranukleären runden Strukturen handelt es sich um Nukleoli**  
 Abb. A zeigt die Nukleoli im Durchlicht (mit roten Pfeilen markiert). Abb. B zeigt dieselbe Abbildung nach Inkubation mit dem DNA spezifischen Fluorochrome Hoechst A 33342. Deutlich ist zu sehen, das Hoechst die Nukleoli nicht anfärbt. Nach einer 3-stündigen Inkubation mit 25 µM Actinomycin D (D) waren die Nukleoli desorganisiert. Abb. C: Kontrollzellen ohne Actinomycin D.

Mehrere Arbeitsgruppen haben gefunden, dass ein Hitze-Schock nicht zu einer vermehrten Expression des wichtigsten zellulären zinkspeichernden Proteins Metallothionein führt (Maytin und Young, 1983; Bauman et al., 1993; DeMoor et al., 2001). Unbekannt ist jedoch, ob ein Hitze-Schock zu einer Translokation von Metallothionein in den Zellkern führt, wie es z.B. nach nitrosativem Stress beschrieben worden ist (Spahl et al., 2003). Um dies zu untersuchen wurden RAEC mit einem Hitze-Schock behandelt und anschließend Metallothionein immunhistochemisch mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Als Positiv-Kontrolle wurden die Zellen mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  inkubiert. Es zeigte sich, dass zwar  $\text{ZnCl}_2$ , nicht jedoch ein Hitze-Schock eine nukleäre Translokation von Metallothionein induziert (**Publikation B, Fig. 5**). Um zu klären, ob Metallothionein überhaupt eine Rolle bei einer Hitze-Schock induzierten Zinkionenfreisetzung spielt, wurden MAEC und Metallothionein knock-out Zellen (MAEC  $\text{MT}^{-/-}$ ) nach entsprechender Inkubation miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die intrazelluläre Zinkionenfreisetzung unabhängig von Metallothionein ist (**Publikation B, Fig. 6**).

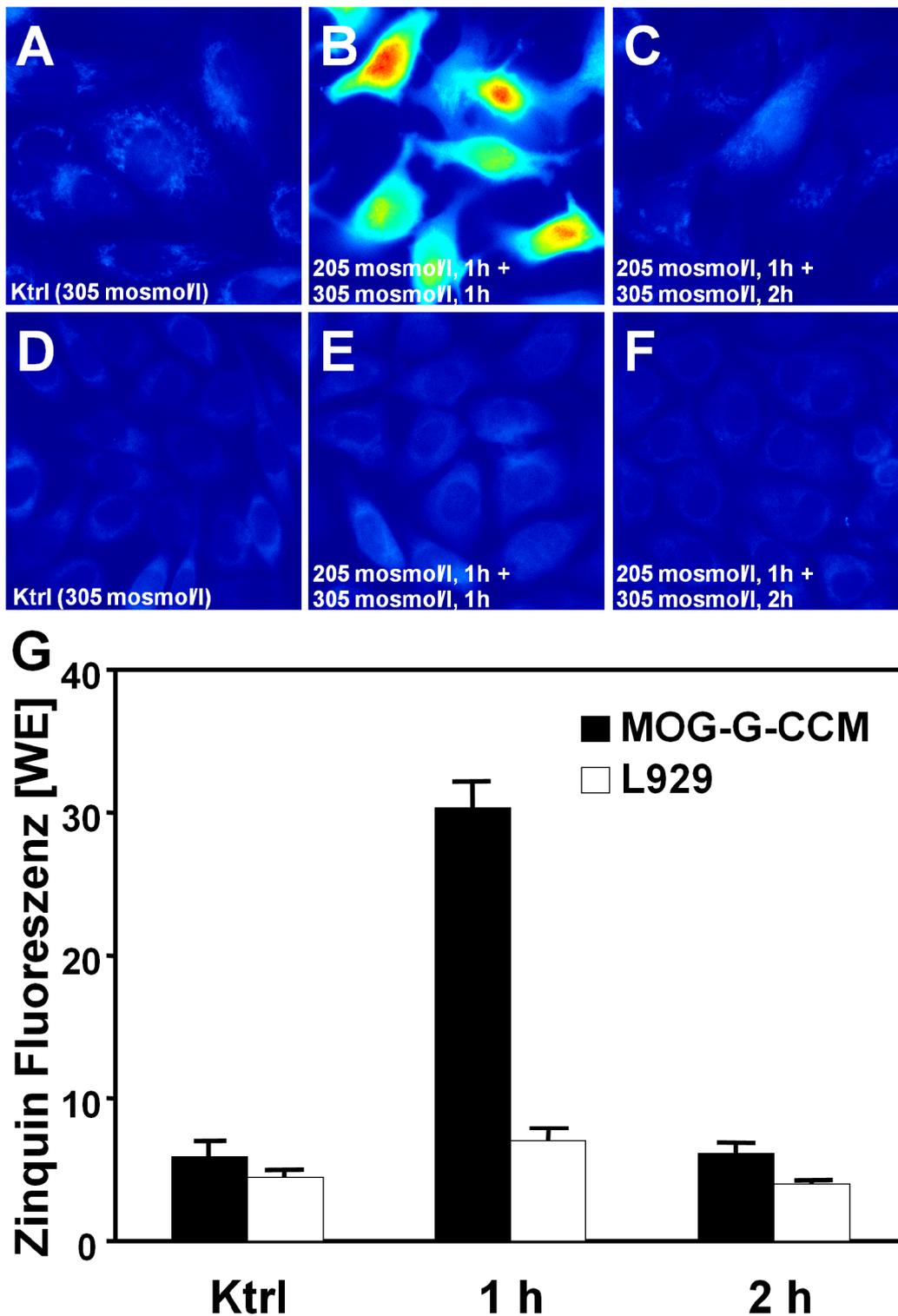
### 3.4 Kälte-Schock und die zelluläre Zinkhomöostase

Nachdem ich gefunden hatte, dass ein Hitze-Schock zu einer intrazellulären  $\text{Zn}^{2+}$ -Freisetzung führt, stellte sich die Frage, ob auch ein Kälte-Schock zu einer intrazellulären  $\text{Zn}^{2+}$ -Freisetzung führen kann. MAEC und L929-Fibroblasten wurden bis zu 5 Stunden bei 1°C und anschließend 5 Minuten bzw. 2 Stunden lang bei 37°C kultiviert und mit 10  $\mu\text{M}$  Zinquin Ethyl Ester inkubiert. Es zeigte sich keine signifikante intrazelluläre Zinkionenfreisetzung (**Publikation B, Fig. 8**). Tendenziell zeigte sich bei der Auswertung unter dem Mikroskop eine im Vergleich zu den Kontrollzellen geringere Basalfluoreszenz, die jedoch statistisch nicht signifikant war.

### 3.5 Hypoosmolarität und die zelluläre Zinkhomöostase

Es ist bekannt, dass eine exzessive Zinkionenfreisetzung intrazellulär und transsynaptisch eine Rolle in der Pathophysiologie von Schlaganfällen und Schädel-Hirn-Traumata spielt. Weiterhin ist bekannt, dass das Anschwellen der Astrozyten als frühes Ereignis dabei eine wichtige Rolle einnimmt (Kimmelberg, 2005; Haussinger, 2006). Bei der hepatischen Enzephalopathie, dem zerebralen klinischen Erscheinungsbild bei unzureichender Entgiftungsfunktion der Leber, ist die mangelnde Ammoniak-Entgiftung entscheidend für die Pathogenese. Es kommt zur Akkumulation von Ammoniak in den Astrozyten und zur Entwicklung eines Hirnödems mit entsprechender neurologischer Symptomatik. Es ergab sich

die Fragestellung, ob das Anschwellen von Zellen, insbesondere von Astrozyten, Auswirkungen auf die intrazelluläre Zinkionenhomöostase hat. Daher wurden Versuche mit der humanen Astrozyten-Zelllinie MOG-G-CCM und den L929-Fibroblasten durchgeführt. Eine Hypoosmolarität, einem gängigen Modell für das Anschwellen von Zellen, wurde durch eine einstündige Inkubation mit hypoosmolarem DMEM (205 mosmol/l) in vitro simuliert. Anschließend wurden die Zellen für 1 Stunde in normoosmolarem Medium kultiviert, mit 10  $\mu$ M Zinquin Ethyl Ester behandelt und die Fluoreszenz unter dem Mikroskop ausgewertet. Es zeigte sich eine transiente intrazelluläre Zinkfreisetzung bei den Astrozyten mit einem Höhepunkt nach 1 Stunde. Wurden die Astrozyten nach 1 Stunde Inkubation in hypoosmolarem Medium dagegen für 2 Stunden in normoosmolarem Medium kultiviert, dann war die Zinkfreisetzung vollständig reversibel. Bei den L929-Fibroblasten zeigte eine Hypoosmolarität keine sichtbaren Auswirkungen auf die zelluläre Zinkhomöostase (Abb. 14).

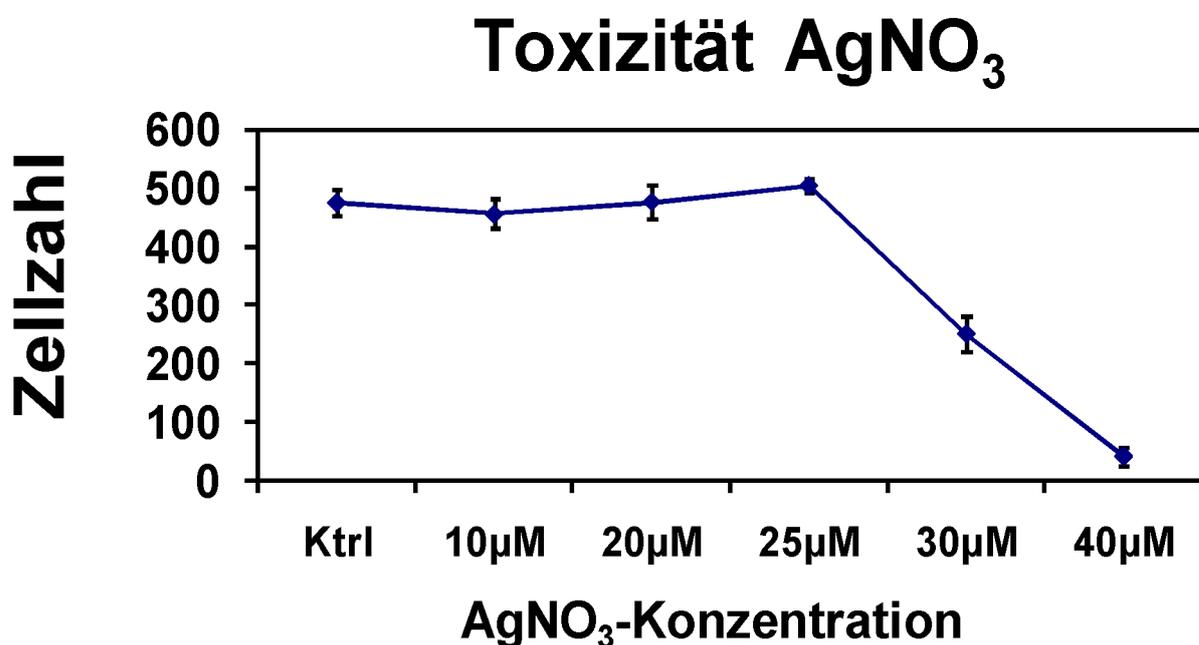


**Abb. 14** Effekte einer Hypoosmolarität auf die intrazelluläre Zinkhomöostase in Astrozyten (MOG-G-CCM) und Fibroblasten

MOG-G-CCM bzw. L929-Fibroblasten wurden in hypoosmolarem Medium (DMEM, 205 mosmol/l) für 1 Stunde (B,E) kultiviert. Als Kontrolle wurde normoosmolares Medium (DMEM, 305 mosmol/l) gewählt (A,D). Eine, nach 1 Stunde Kultivierung in normoosmolarem Medium, anschließende Behandlung der Zellen mit 10  $\mu$ M Zinquin Ethyl Ester zeigte, dass eine Hypoosmolarität bei den MOG-G-CCM-Zellen im Gegensatz zu den L929-Fibroblasten zu einer intrazellulären  $Zn^{2+}$ -Freisetzung führt. Wurden die MOG-G-CCM-Zellen nach 1 Stunde Kultur in hypoosmolarem Medium dagegen 2 Stunden lang in normoosmolarem Medium kultiviert, war die  $Zn^{2+}$ -Freisetzung vollständig reversibel (C,F).

### 3.6 Ag<sup>+</sup> und die zelluläre Zinkhomöostase

Bisher wurde gezeigt, dass Schwer- bzw. Übergangsmetalle wie Pb<sup>2+</sup> und auch Hg<sup>2+</sup> unter subtoxischen Bedingungen zu einer intrazellulären Zn<sup>2+</sup>-Freisetzung führen (Brand und Kleineke, 1996; Haase et al., 2006). Untersuchungen mit Silbernitrat (AgNO<sub>3</sub>), welches als Agens häufig in der Wundbehandlung eingesetzt wird, gibt es bisher nicht. Es stellte sich somit die Frage, ob Silbernitrat ähnliche Auswirkungen auf die zelluläre Zinkhomöostase haben könnte wie Pb<sup>2+</sup> oder Hg<sup>2+</sup>. In Toxizitätsversuchen mit L929-Fibroblasten zeigte sich, dass eine Konzentration von 25 µM AgNO<sub>3</sub> subtoxisch ist (Abb. 15).

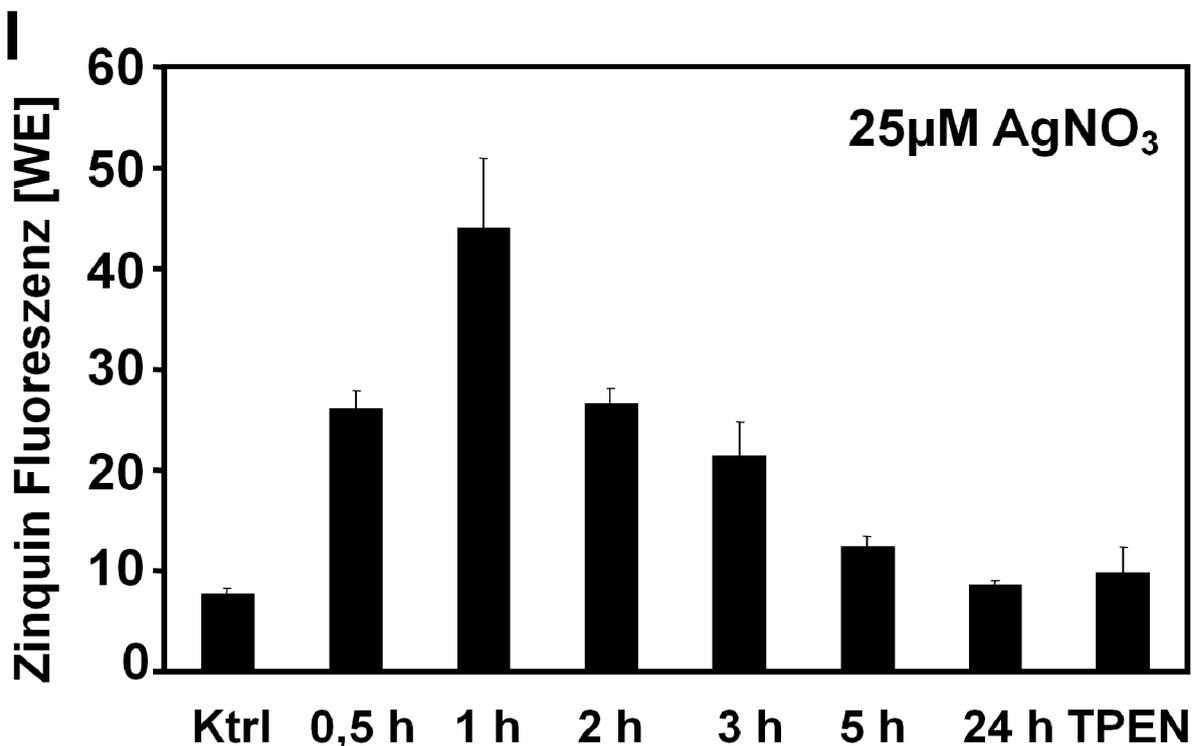
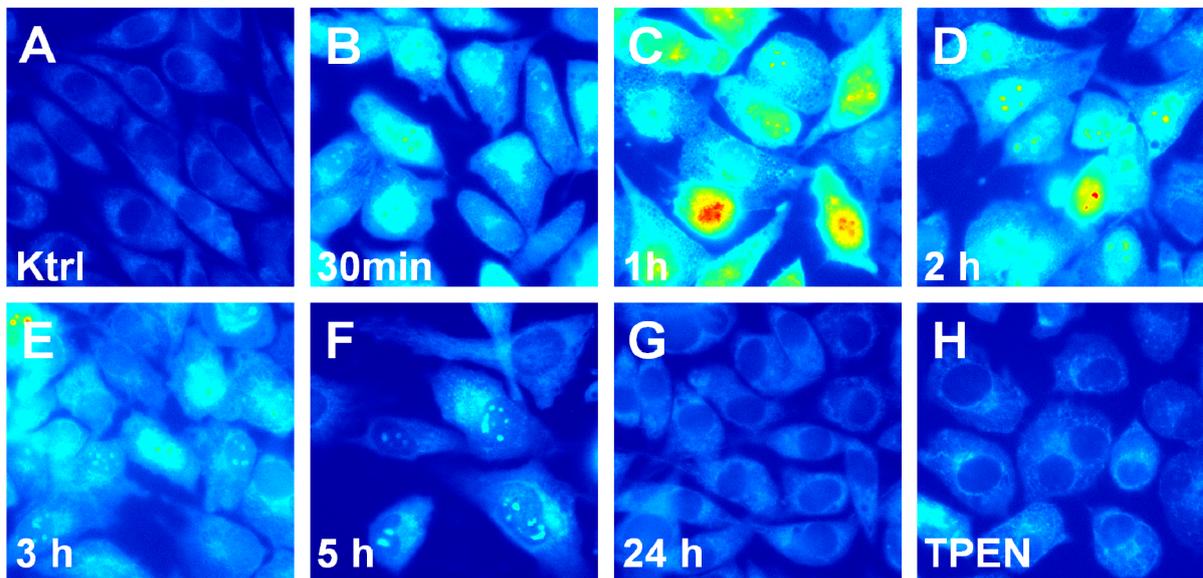


**Abb. 15 Toxizität von Silbernitrat (AgNO<sub>3</sub>) bei L929-Fibroblasten**

L929-Fibroblasten wurden 24 Stunden lang mit 0 - 40 µM Silbernitrat behandelt. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem DNA spezifischen Fluorochrome Hoechst A 33342 (1 µg/ml für 5 Minuten) und eine Quantifizierung der Zellen ohne apoptotische Kern-Morphologie. Es zeigt sich, dass eine Konzentration von 25 µM AgNO<sub>3</sub> subtoxisch ist.

Die Zellen wurden schließlich mit der subtoxischen Konzentration von 25 µM AgNO<sub>3</sub> inkubiert und nach definierten Zeitpunkten (0,5 - 24 h) mit Zinquin Ethyl Ester behandelt. Es zeigte sich eine transiente intrazelluläre Zn<sup>2+</sup>-Freisetzung mit einem Höhepunkt nach etwa 1 Stunde und einer vollständigen Reversibilität nach 24 Stunden (Abb. 16). Auch hier zeigen sich, vergleichbar mit der Hitze-Schock-Behandlung, intranukleäre fluoreszierende Strukturen, die vermutlich Nukleoli sind. Zum Ausschluss einer möglichen Reaktion von Zinquin Ethyl Ester mit Silberionen wurde die Zellen nach einstündiger AgNO<sub>3</sub>-Inkubation

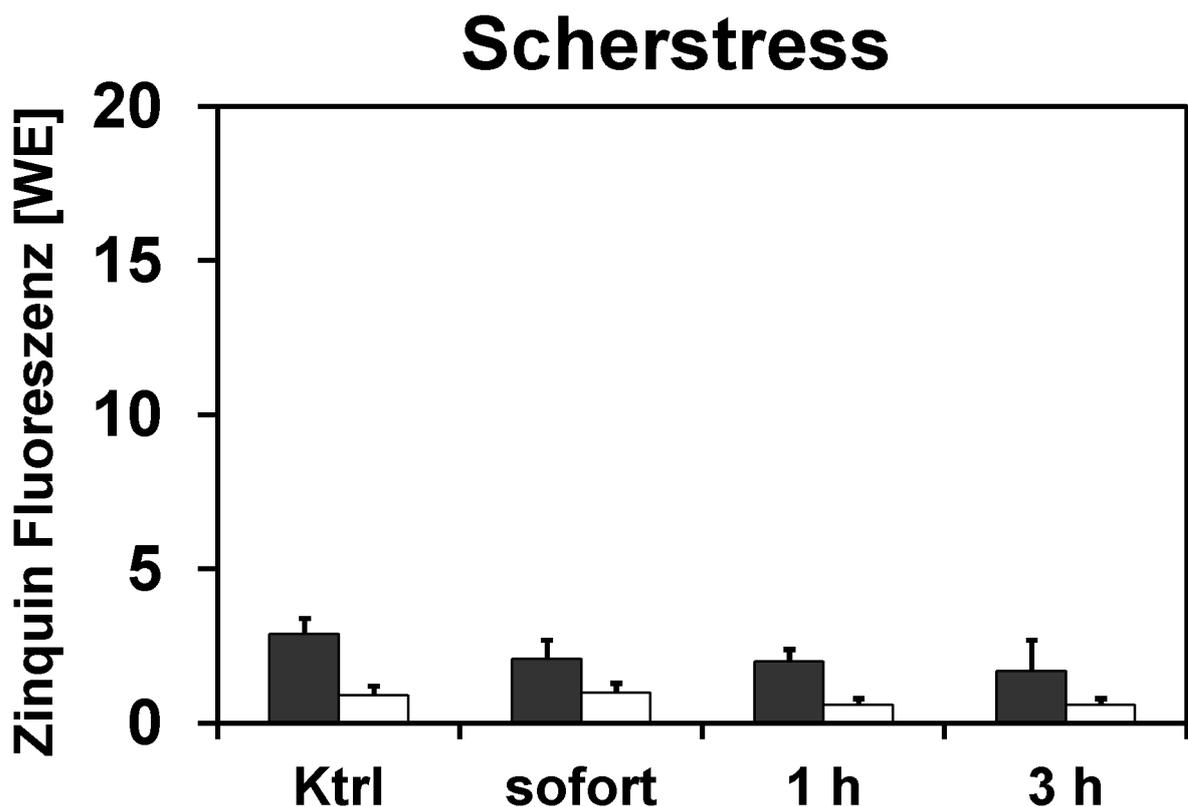
zusätzlich 40 Minuten lang mit 10  $\mu\text{M}$  des zink-spezifischen Chelators TPEN inkubiert. Hierbei zeigte sich die Zink-Spezifität von Zinquin Ethyl Ester (Abb. 16 H, I).



**Abb. 16 Silbernitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) bewirkt eine transiente intrazelluläre  $\text{Zn}^{2+}$ -Freisetzung**  
 L929-Fibroblasten wurden mit 25  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  behandelt und nach 0,5 - 24 h mit 10  $\mu\text{M}$  Zinquin Ethyl Ester inkubiert. Es zeigt sich eine transiente intrazelluläre  $\text{Zn}^{2+}$ -Freisetzung mit dem Höhepunkt nach 1 Stunde (C) und vollständiger Reversibilität nach 24 Stunden (G). Eine 40-minütige Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  des zink-spezifischen Chelators TPEN zeigt die Zink-Spezifität von Zinquin Ethyl Ester (H). Fluoreszierende Nukleoli zeigen sich über den Zeitraum 0,5 bis 5 Stunden (B-F).

### 3.7 Weitere Stressarten und die zelluläre Zinkhomöostase

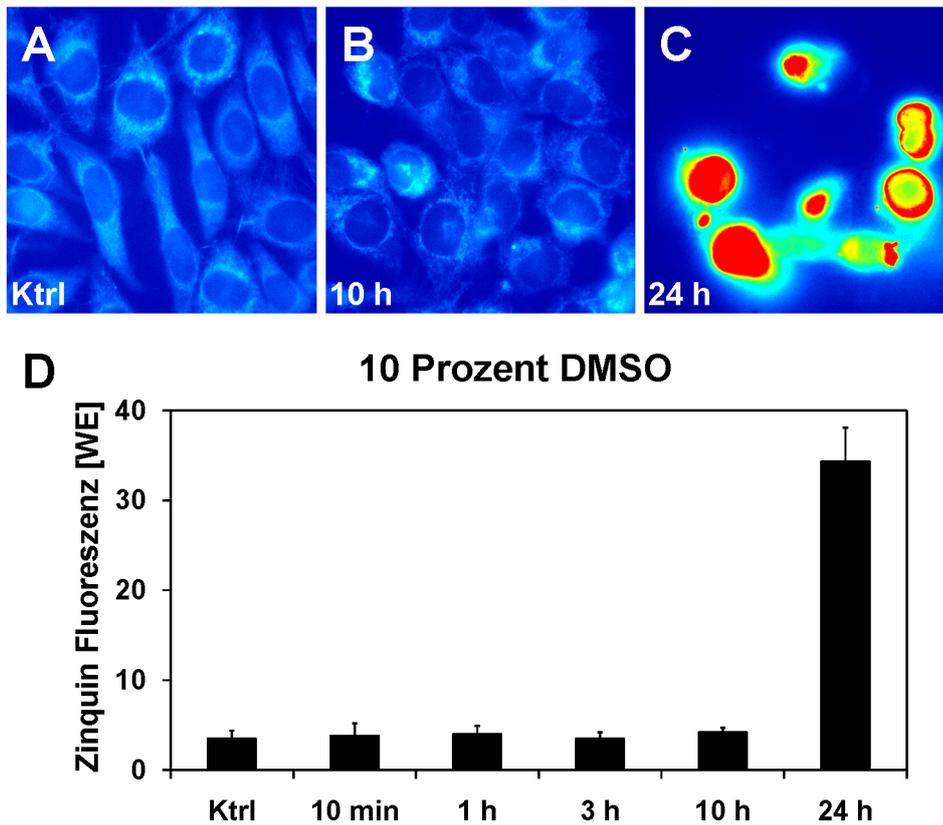
L929-Fibroblasten und MAEC wurden in einem Inkubator mit der Möglichkeit zur Einstellung von Umdrehungen pro Minute (75/100/125 U/Min.) bei 37°C in DPBS inkubiert. Durch die Umdrehungen der Zellkultur-Platten kommt es zu einer Rotationbewegung des Mediums und somit zur Generierung eines Scherstress. Bei bis zu 125 Umdrehungen pro Minute für eine Stunde wurde im Vergleich zu Zellen, die ohne Umdrehungen bei 37°C in 1 ml DPBS inkubiert wurden, keinerlei Toxizität gefunden. Für die weiteren Versuche wurde deshalb die Umdrehungsgeschwindigkeit von 125/Minute gewählt. Die Zellen wurden nach Behandlung mit 125 U/Minute entweder sofort oder nach 1 - 3 Stunden in RPMI für 30 Minuten mit 10 µM Zinquin Ethyl Ester behandelt. Anschließend erfolgte die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Es zeigte sich, weder bei den L929-Fibroblasten noch bei den MAEC, zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine signifikante intrazelluläre  $Zn^{2+}$ -Freisetzung (Abb. 17).



**Abb. 17 Scherstress bei L929 bzw. MAEC bewirkt keine intrazelluläre  $Zn^{2+}$ -Freisetzung**

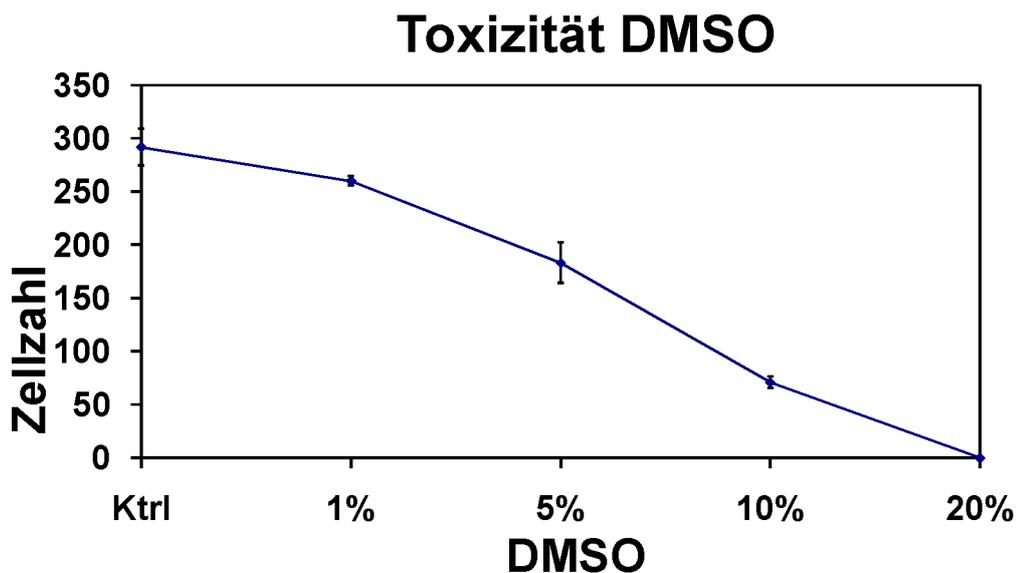
L929-Fibroblasten bzw. MAEC wurden 1 Stunde lang bei 125 Umdrehungen/Minute bei 37°C in DPBS kultiviert und nach 0 - 3 Stunden für 30 Minuten ohne Umdrehungen mit 10 µM Zinquin Ethyl Ester inkubiert. Es zeigt sich keine Fluoreszenz-Aktivität und somit keine signifikante intrazelluläre  $Zn^{2+}$ -Freisetzung.

Dimethylsulfoxid (DMSO) wird in der Zellkulturtechnik als Gefrierschutzmittel bei der Kryokonservierung eingesetzt, weiterhin wird es dermal appliziert bei versehentlicher subkutaner Applikation von Zytostatika, wo es unter anderem bei der Bindung von Radikalen eine Rolle spielt. Es stellte sich die Frage, ob DMSO die zelluläre Zinkhomöostase beeinflusst. Die Zellen wurden nach Inkubation mit einer Konzentration von 10% DMSO, welche auch bei der Kryokonservierung von Zellen verwendet wird, zu verschiedenen Zeitpunkten (10 Min. - 24 Std.) mit 10  $\mu$ M Zinquin Ethyl Ester behandelt und die Fluoreszenz unter dem Mikroskop ausgewertet. In den ersten 10 Stunden zeigte sich keine relevante intrazelluläre Zinkionenfreisetzung. Erst im Stadium des Zellunterganges kam es zu einer massiven  $Zn^{2+}$ -Freisetzung (Abb. 18). In Toxizitätsversuchen wurden die L929-Fibroblasten mit verschiedenen Konzentrationen von DMSO inkubiert (1 - 20 %) und nach 24 Stunden die Zahl der noch lebenden Zellen mit normaler Zellkernmorphologie bestimmt (Abb. 19). Eine Konzentration von 10% DMSO führte bei kurzen Inkubationszeiten (bis zu 10 Std.) zu keiner relevanten Zell-Toxizität, während bei einer 24 Stunden langen Inkubation mit DMSO 2/3 der Zellen tot waren. Dies zeigt, dass bei Inkubationszeiten mit 10% DMSO von bis zu 10 Stunden intrazellulär kein  $Zn^{2+}$  freigesetzt wird, während eine Inkubation von 24 Stunden zu massivem Zelluntergang und zu einer massiven  $Zn^{2+}$ -Freisetzung führt.



**Abb. 18 DMSO und die zelluläre Zinkhomöostase**

L929-Fibroblasten wurden mit 10% DMSO für 10 Min. - 24 Std. inkubiert und anschließend für 30 Minuten mit 10  $\mu$ M Zinquin Ethyl Ester behandelt. Die Fluoreszenz wurde unter dem Mikroskop ausgewertet. In den ersten 10 Stunden kam es zu keiner signifikanten intrazellulären  $Zn^{2+}$ -Freisetzung. Erst beim Zelluntergang (C) wird eine  $Zn^{2+}$ -Freisetzung sichtbar.



**Abb. 19 Toxizität von DMSO bei L929-Fibroblasten**

L929-Fibroblasten wurden mit 1 - 20 % DMSO inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Inkubation mit dem DNA spezifischen Fluorochrome Hoechst A 33342 (1  $\mu$ g/ml für 5 Minuten) und eine Auszählung der Zellen ohne apoptotische Kern-Morphologie.

## 4. Diskussion

### 4.1. Intrazelluläre Zinkhomöostase und die spezifische Darstellung von intrazellulären freien Zinkionen

Mehr als 97% des Zinks im Organismus ist an Proteine gebunden, 5-20% davon an Methallothionein. Im Nukleus sind 30-40% lokalisiert, während sich 50% auf Zytoplasma, Organellen und spezialisierte Vesikel verteilen und der verbleibende Anteil an die Zellmembran gebunden ist (Tapiero und Tew, 2003). Zink-Schwefel (Zn-S) -Cluster bilden relativ stabile „Loops“ in Aminosäuren-Ketten, die unter anderem als sogenannte Zinkfinger in Transkriptionsfaktoren (TF) mit DNA, RNA oder Proteinen in Interaktion treten können (Klug und Schwabe, 1995). Kröncke et al. zeigten, dass nitrosativer Stress  $Zn^{2+}$  aus Zinkfinger-Strukturen freisetzt, was über eine Strukturänderung zur Hemmung der spezifischen Bindung von Zinkfinger-TF an die DNA führt (Kroncke et al., 1994; Kroncke und Carlberg, 2000). NO zerstört Zinkfinger-Proteine nicht irreversibel, da die Zinkfinger über das zelluläre Redoxsystem wieder regeneriert werden können (Kroncke et al., 2002). Bereits früher wurde gezeigt, dass hypochlorige Säure (HOCl), welche von aktivierten neutrophilen Granulozyten sezerniert wird, in der Lage ist, eine intrazelluläre  $Zn^{2+}$ -Freisetzung zu bewirken (Fliss et al., 1991).

Ziel meiner Arbeit war es, den Einfluss weiterer Stressarten auf die zelluläre Zinkhomöostase zu untersuchen und somit erstmals einen umfangreichen systematischen Überblick darüber zu geben, welche Stressarten zu einer Freisetzung von intrazellulären Zinkionen führen können. Zur Darstellung von intrazellulären freien Zinkionen wurden die entsprechenden Zellen mit dem  $Zn^{2+}$ -spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Zinquin Ethyl Ester behandelt, welcher nach Aufnahme in die Zelle Zinquin-Zink-Komplexe in einem Verhältnis von 1:1 oder 2:1 bildet ( $K_d$  von  $370 \pm 60$  bzw.  $85 \pm 16$  nM) (Zalewski et al., 1994). Die Tatsache, dass die Bindungskonstante von  $Zn^{2+}$  an Methallothionein deutlich geringer ist als die von Zinquin, zeigt, dass eine Komplexierung von an Proteine gebundene Zinkionen durch Zinquin nicht möglich ist. Die Intensität der detektierbaren Zinquin-Fluoreszenz ist also ein Maß für den Gehalt an freien intrazellulären Zinkionen. Zu erwähnen ist noch die Eigenschaft der spezifischen Bindung von Cadmiumionen ( $Cd^{2+}$ ) durch Zinquin, die jedoch vernachlässigt werden kann, weil  $Cd^{2+}$  physiologischerweise in Zellen nicht vorkommt (Zalewski et al., 1994). Der als Alternative in den Versuchen anfangs verwendete  $Zn^{2+}$ -spezifische Fluoreszenzfarbstoff ZnAF-2-DA erwies sich als ungeeignet, da er im Gegensatz zu Zinquin auch zu einer Komplexierung von Zinkionen führt, die an intrazelluläre Proteine gebunden sind. Diese Eigenschaft von ZnAF-2-DA kann theoretisch dazu verwendet werden, den

gesamten intrazellulären Zinkionengehalt verschiedener Zellarten mittels photometrischer Auswertung der Fluoreszenzintensität miteinander zu vergleichen. Kontrollexperimente mit dem  $Zn^{2+}$ -spezifischen Chelator TPEN dienten dazu, die Spezifität der beiden  $Zn^{2+}$ -spezifischen Fluoreszenzfarbstoffe nachzuweisen.

#### **4.2. Oxidativer Stress und dessen Einfluss auf die zelluläre Zinkhomöostase**

Die Bestrahlung von Zellen mit Licht verschiedener Wellenlängen kann zur Generierung von intrazellulärem oxidativem Stress führen (Tyrrell und Keyse, 1990; Klotz et al., 2001; Brenneisen et al., 2002; Schroeder et al., 2007). Es zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen der Bestrahlung von Zellen mit UV-A bzw. mit UV-B oder mit Infrarot-A Licht (IRA) in Bezug auf die zelluläre Zinkhomöostase. UV-B Photonen sind wesentlich energiereicher als UV-A Photonen, daher rührt auch die direkte schädigende Wirkung von UV-B auf die DNA. Im Gegensatz dazu führt UV-A zur intrazellulären Generierung verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Matsumura und Ananthaswamy, 2004). Auch bei einer IRA-Bestrahlung kommt es zur Generierung von ROS, diese entstehen jedoch hauptsächlich in den Mitochondrien (Schroeder et al., 2007; Schroeder et al., 2008; Schroeder et al., 2009). Dies reicht jedoch nicht aus, um in der ganzen Zelle Zinkionen aus Proteinen freizusetzen. Bestrahlungsversuche mit UV-A zeigten, dass eine Dosis von  $25 \text{ J/cm}^2$  bei Fibroblasten eine relevante intrazelluläre Eisenionenfreisetzung bewirkt (Pourzand et al., 1999), so dass ähnliche Auswirkungen auch auf die intrazelluläre Zinkhomöostase zu vermuten waren. In meinen Versuchen zeigte die Bestrahlung mit subtoxischen Dosen an UV-A (320-400 nm) im Gegensatz zur Bestrahlung mit UV-B (280-320 nm) oder mit Infrarot-A Licht (760-1400 nm) eine signifikante und reversible intrazelluläre Zinkionenfreisetzung. Diese zeigte sich auch bei erneuter Bestrahlung nach 24 Stunden, so dass daraus geschlossen werden kann, dass die zwischenzeitlich freigesetzten Zinkionen erneut von Proteinen gebunden werden und dann für eine erneute Freisetzung wieder zur Verfügung stehen. Die Beobachtung einer speziell durch UV-A hervorgerufenen intrazellulären Zinkionenfreisetzung lässt vermuten, dass die Generierung von ROS, wie sie für UV-A typisch ist, einen entscheidenden Beitrag zur intrazellulären Freisetzung liefert. Um diese These zu überprüfen wurden die entsprechenden Zellen mit den ROS behandelt, die im Rahmen einer UV-A Bestrahlung überwiegend generiert werden, nämlich mit Hydroperoxiden und mit Singulett-Sauerstoff. Als Vertreter der Hydroperoxide wurde Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) gewählt, welches in geringen Konzentrationen ( $\leq 10 \mu\text{M}$ ) als Signalmolekül fungiert und in höheren Konzentrationen mittels Oxidationsreaktionen und Inaktivierung zellulärer

thiol-abhängiger Enzyme die Generierung von oxidativem Stress verursacht (Stone und Yang, 2006). Überraschenderweise zeigte die Exposition von L929-Fibroblasten, Ratten-Aorta-Endothelzellen (RAEC) und humanen Keratinozyten (HaCaT) bei Konzentrationen von bis zu 3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> keinerlei relevante intrazelluläre Zinkionenfreisetzung. Dies steht im Widerspruch zu einer früheren Publikation, in der 0,5 -1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine intrazelluläre Zinkionenfreisetzung in Pulmonalarterien-Endothelzellen bewirkten (Wiseman et al., 2007). Dagegen war eine deutliche Zinkionenfreisetzung in den L929-Zellen, den RAEC und in den HACAT zu sehen, wenn als Hydroperoxid das tert-butyl-Hydroperoxid (t-BH) in nicht-toxischen Konzentrationen verwendet wurde. Alia et al. zeigten, dass die zelluläre Antwort von humanen Leberkarzinomzellen nach Exposition mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und t-BH neben Gemeinsamkeiten auch deutliche Unterschiede aufwies (Alia et al., 2005). Vor allem zeigte sich, dass t-BH im Gegensatz zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> einen kontinuierlichen langandauernden zellulären Stress erzeugt. Eine weitere Publikation zeigte ebenfalls Unterschiede in den Wirkmechanismen beider Hydroperoxide (Jacob und Herschler, 1986; Jacob und de la Torre, 2009;) bei der Behandlung von murinen Linsenepithelzellen (Spector et al., 2002). Dort wurde gezeigt, dass die Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> überwiegend zu einer direkten DNA-Schädigung führt, während t-BH über die Beeinflussung des Redox-Status der Zelle wirkt. Vor allem der Unterschied bezüglich der Länge des oxidativen Stresses durch t-BH könnte als mögliche Erklärung dienen, weshalb t-BH im Gegensatz zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine Zinkionenfreisetzung bewirkt. Singulett-Sauerstoff, welches von Photosensitizern nach Exposition mit weissem Licht generiert wird und ebenfalls zu den wichtigsten ROS im Rahmen einer UV-A Bestrahlung gehört, zeigte dieselben Auswirkungen auf die zelluläre Zinkhomöostase, so dass die Versuche deutlich machen, dass die intrazelluläre Zinkionenfreisetzung durch UV-A Bestrahlung indirekt durch die Generierung von oxidativem Stress verursacht wird. Ergänzend stellte sich nun die Frage, ob auch andere ROS, die keine entscheidende Rolle bei der UV-A Bestrahlung spielen, ebenfalls zu einer intrazellulären reversiblen Zinkionenfreisetzung führen können. Superoxid-Anion-Radikale, welche in Zellen durch Reduktion von Chinolonen generiert werden können, zeigten unter subtoxischen Bedingungen keine sichtbaren Auswirkungen auf die zelluläre Zinkhomöostase, so dass man diesbezüglich von keinem generellen Phänomen im Rahmen eines oxidativen Stresses sprechen kann. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass Superoxid-Anion-Radikale intrazellulär im Rahmen von Disproportionierungsreaktionen zum Teil zu Wasserstoffperoxid reagieren. Diese Reaktionen werden durch die Superoxiddismutase (SOD) katalysiert, sind pH-abhängig und führen je nach Grad der Protonierung zu verschiedenen Geschwindigkeitskonstanten (Benon et al., 1985). Neben dieser Reaktion können Superoxid-Anion-Radikale auch mit Stickstoffmonoxid

zu Peroxynitrit reagieren (Gryglewski et al., 1986). Beide beschriebenen Reaktionsmöglichkeiten könnten eine Erklärung liefern, weshalb es zu keiner intrazellulären Zinkionenfreisetzung durch Superoxid-Anion-Radikale kommt, denn  $\text{H}_2\text{O}_2$  würde sehr schnell durch die Glutathionperoxidase abgebaut werden und Peroxynitrit wäre so kurzlebig, dass es sehr schnell mit allen möglichen molekularen Zielstrukturen in seiner unmittelbaren Nähe reagieren würde, aber nicht unbedingt mit SH-Gruppen, also insgesamt nicht spezifisch genug wäre, um nur SH-Gruppen zu oxidieren. Wenn man sich die verschiedenen Stressbedingungen, welche die zelluläre Zinkhomöostase beeinflussen, anschaut, wird deutlich, dass nitrosativer Stress im Vergleich zum oxidativen Stress eine deutlich höhere Zinkionenfreisetzung bewirkt. Dieser Umstand lässt sich dadurch erklären, dass Thiole von Zinkfinger-Strukturen für Stickstoffmonoxid (NO) eine selektivere Zielstruktur darstellen als für ROS, welche auch mit anderen Zielstrukturen in der Zelle reagieren können. Daher kommt es nach einem oxidativen Stress auch zu einer deutlich weniger effektiven und damit geringeren intrazellulären Zinkionenfreisetzung als nach nitrosativem Stress. Auch scheinen die reaktiven Sauerstoffspezies untereinander eine unterschiedliche Affinität zu den Thiolen der Zinkfinger aufzuweisen, da, wie oben gezeigt, nicht jede Art von oxidativem Stress denselben Effekt auf die Zinkhomöostase hat. Hervorzuheben ist auch, dass sich die intrazelluläre Zinkionenfreisetzung nicht nur auf das Zytoplasma beschränkt. Auch im Nukleus waren Ansammlungen von freien Zinkionen zu sehen. Besonders markant traten diese in den Nukleoli auf. Bei Behandlung mit UV-A oder Inkubation mit t-BH bzw. Singulett-Sauerstoff unter subtoxischen Bedingungen traten diese Zinkionenansammlungen in den Nukleoli sporadisch und vereinzelt auf, während sie unter toxischen Bedingungen, also bei t-BH- und Singulett-Sauerstoff-Konzentrationen, die nach 24 Stunden überwiegend zur Apoptose der entsprechenden Zellen führten, bei fast allen Zellen auftraten.

Es ist bekannt, dass die Herunterregulation von Thiolproteinen durch UV-A Bestrahlung in Hautfibroblasten durch Singulett-Sauerstoff und Hydroperoxide vermittelt wird (Vile und Tyrrell, 1995). Dies wirkt sich insbesondere auf die zelluläre Glutathion (GSH)-Konzentration aus (Lautier et al., 1992). GSH spielt eine wichtige Rolle als Antioxidans und hat somit eine essentielle Bedeutung für das zelluläre Redox-Gleichgewicht. Des Weiteren ist bekannt, dass es bei der intrazellulären Verteilung der Zinkionen eine Rolle spielt (Maret und Vallee, 1998; Maret, 2006). Die intrazelluläre GSH-Konzentration ist durch Diamid, einem Thiol-Oxidans, beeinflussbar. Diamid bewirkt eine Oxidation von GSH zu Glutathiondisulfid (GSSG), ohne die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zu generieren. Dies nennt man auch "Disulfid-Stress" (Åslund und Beckwith, 1999). In meinen Versuchen konnte ich zeigen, dass eine Inkubation von L929-Fibroblasten mit subtoxischen Diamid-Konzentrationen zu einer

reversiblen intrazellulären Zinkionenfreisetzung führt. In vitro wurde schon früher gezeigt, dass Diamid eine Zinkionenfreisetzung aus Zn-S-Clustern des bakteriellen Proteins RsrA bewirkt (Li et al., 2003). Um die bisher nicht geklärte Frage zu beantworten, ob die intrazelluläre Zinkionenfreisetzung durch die Senkung des Gehaltes an GSH verursacht wird oder durch eine direkte Reaktion von Diamid mit Thiolen von Zinkfingerstrukturen, wurden die entsprechenden Zellen mit einem spezifischen irreversiblen Biosynthese-Hemmer von GSH vorinkubiert. Der gamma-Glutamylcystein-Synthase Inhibitor L-Buthionin-S,R-Sulfoximin (BSO) reguliert den intrazellulären GSH-Gehalt innerhalb von 24 Stunden auf etwa 20% herunter (Berendji et al., 1999). Es zeigte sich, dass bei Vorinkubation mit BSO deutlich geringere Mengen an Diamid für eine intrazelluläre Zinkionenfreisetzung benötigt werden, so dass geschlussfolgert werden kann, dass die intrazelluläre GSH-Konzentration und damit der Redox-Status einer Zelle deren Zinkhomöostase beeinflusst und eine direkte Reaktion von Diamid mit den Thiolen von Zinkfingerstrukturen vermutlich nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Cortese-Krott et al. zeigten, dass die Inkubation von Endothelzellen mit NO diese vor den zytotoxischen Effekten einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Exposition schützt und dass dieser Schutz von der Freisetzung intrazellulärer Zinkionen abhängig ist (Cortese-Krott et al., 2009). Ob intrazellulär freigesetztes Zn<sup>2+</sup> auch eine protektive Rolle bei einer UV-A Exposition spielt muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

### **4.3. Hitze-Schock und dessen Einfluss auf die zelluläre Zinkhomöostase**

Die durch einen Hitze-Schock induzierte zelluläre Antwort ist ein hochwirksamer Schutzmechanismus, der dadurch gekennzeichnet ist, dass es zu einer Überexpression bestimmter Stress-Proteine kommt (Kregel, 2002). Bisher war wenig über den Einfluss eines Hitze-Schocks auf die zelluläre Metallionenhomöostase bekannt. In meinen Versuchen konnte ich zeigen, dass eine milde Hyperthermie unter nicht-toxischen Bedingungen zu einer temperaturabhängigen Freisetzung von intrazellulären Zinkionen in verschiedenen Zellarten führt. Diese war reversibel und konnte nach 24 Stunden durch einen erneuten Hitze-Schock wiederholt werden. Eine "Thermoadaption / Thermotoleranz" wurde diesbezüglich seitens der entsprechenden Zellen also nicht entwickelt.

In den mikroskopischen Analysen zeigte sich nach einem Hitze-Schock in allen Zellen das Auftreten von intranukleär fluoreszierenden Strukturen als Ausdruck einer darin lokalisierten Zinkionenansammlung, welche in den Versuchen mit oxidativem Stress in jeweils allen Zellen nur unter toxischen Bedingungen und unter subtoxischen Bedingungen nur sporadisch

und vereinzelt zu beobachten war. Dass es sich dabei um ein allgemeingültiges Phänomen handelt ließ sich nach Versuchen mit unterschiedlichen Zellarten zeigen, da dieses bei allen getesteten Zellen beobachtet wurde. Aufgrund der phänotypisch strukturellen Ähnlichkeit lag die Vermutung nahe, dass es sich bei den fluoreszierenden Strukturen im Kern um Nukleoli handelte. Nukleoli sind transient ausgebildete Kompartimente, die sich aus Proteinen und RNA zusammensetzen und nicht von einer Membran umgeben sind. Um diese These zu bestätigen, wurden die Zellen vor der Hitze-Schock Behandlung mit dem Antibiotikum Actinomycin D, welches zu einer Desorganisation von Nukleoli führt (Phillips und Phillips, 1971; Kregel, 2002), vorinkubiert. Es zeigte sich, dass unter diesen Bedingungen keine intranukleär fluoreszierende Strukturen mehr zu beobachten waren. Dies ist ein starkes Indiz, dass es sich bei den besagten Strukturen um Nukleoli handelt. In verschiedenen Zelltypen konnte nachgewiesen werden, dass sich der Zinkgehalt der Nukleoli in Relation zum Chromatin nicht wesentlich voneinander unterscheidet (Quintana et al., 1987). Dies deutet darauf hin, dass es bei oder nach einem Hitze-Schock zu einer Translokation von Zinkionen vom Nukleoplasma in die Nukleoli kommt. Versuche, in denen HaCat-Zellen nur mit Zinkionen behandelt wurden, haben gezeigt, dass es vermehrt zu einer Ansammlung von freiem Zink im Zellkern, insbesondere in den Nukleoli, kam. Bei HaCaT-Zellen mit einem mutierten EVER2 Gen war die intrazelluläre Zinkionen-Konzentration in den Nukleoli signifikant erhöht (Lazarczyk et al., 2008). Somit scheint EVER2, ein Protein mit bisher unbekannter Funktion, möglicherweise in Zellen die Verteilung von Zinkionen in oder zu den Nukleoli zu regulieren.

Die wesentliche Funktion der Nukleoli ist die Synthese von ribosomaler RNA und von Ribosomen. Es gibt auch Vermutungen, dass sie eine Funktion als zelluläre Stresssensoren haben (Rubbi und Milner, 2003), doch ist bisher nicht bekannt, auf welchem Wege die verschiedenen Stressarten in der Lage sind, dieses Stresssignal den Nukleoli zu vermitteln (Olson, 2004). Die Versuche mit Hitze-Schock legen die Vermutung nahe, dass Zinkionen intrazellulär eine entscheidende Rolle in diesem Signalweg spielen.

Nitrosativer Stress führt zu einer intranukleären Zinkionenfreisetzung, welche wiederum eine Translokation von Metallothionein in den Zellkern bewirkt (Spahl et al., 2003). Ein Hitze-Schock führt nicht zu einer vermehrten Expression des wichtigsten zellulären zinkspeichernden Proteins Metallothionein (Maytin und Young, 1983; Bauman et al., 1993; DeMoor et al., 2001). Ob ein Hitze-Schock eine entsprechende Translokation bewirkt wie nach nitrosativem Stress war bisher nicht bekannt. In meinen Versuchen konnte ich zeigen, dass ein Hitze-Schock keine nukleäre Translokation von Metallothionein induziert. Weiterhin zeigte sich, dass ein Hitze-Schock bei Metallothionein knock-out Zellen ebenfalls eine

intrazelluläre Zinkionenfreisetzung bewirkt. Diese ist sogar noch intensiver, sodass hier von einem Metallothionein-unabhängigen Effekt gesprochen werden kann. Die Tatsache, dass Metallothionein das wichtigste zelluläre zinkspeichernde Protein ist, erklärt den Befund, dass Metallothionein knock-out Zellen bezüglich einer  $Zn^{2+}$ -Freisetzung viel sensibler auf einen Hitze-Schock reagieren (Maret, 2004). In Abwesenheit von Metallothionein sind vermutlich andere zinkspeichernde Proteine für die Bindung von freiem intrazellulären Zink verantwortlich, diese haben jedoch eine geringere Bindungsaffinität zum  $Zn^{2+}$ , so dass es leichter ist, durch einen Hitze-Schock eine Freisetzung von intrazellulären Zinkionen herbeizuführen. Die Tatsache, dass bei einem Hitze-Schock Metallothionein keine wesentliche Rolle spielt zeigt, dass dieses nicht der eigentliche bzw. einzige Faktor ist, der eine protektive Funktion besitzt, wie in einigen Publikationen postuliert (Gunther et al., 1991; Coogan et al., 1992).

Es wurde gezeigt, dass während eines Hitze-Schocks der mammalian heat shock factor 1 vom inaktiven Monomer zum DNA-bindenden Homotrimer aktiviert wird mittels Bildung einer Disulfid-Bindung zwischen zwei essentiellen Cystein-Resten (Ahn und Thiele, 2003). Es wurde vermutet, dass ROS entweder durch direkte oder durch indirekte Wirkung diesen Prozess in Gang setzen können. Versuche mit verschiedenen Zellarten zeigten, dass ein Hitze-Schock keinen (Katschinski et al., 2000; Zhao et al., 2006) oder nur einen 1,2- bis 2-fachen Anstieg des intrazellulären Gehaltes an ROS bewirkt. In meinen Versuchen mit Maus-Aorta-Endothelzellen (MAEC) bewirkte ein Hitze-Schock im Gegensatz zur UV-A Behandlung, keine signifikante Erhöhung der ROS-Konzentration, so dass die durch Hitze-Schock hervorgerufene intrazelluläre Zinkionenfreisetzung nicht durch oxidativen Stress hervorgerufen werden kann. 3,3-Dihydroxy-Isorenieratin (DHIR) ist ein natürliches Karotinoid, welches vom Bakterium *Brevibacterium linens* synthetisiert und aufgrund seiner einzigartigen Struktur als Antioxidans in der Industrie verwendet wird. Es wurde gezeigt, dass die Vorbehandlung von humanen Hautfibroblasten mit DHIR die durch eine UV-A Bestrahlung bewirkte intrazelluläre Zinkionenfreisetzung durch Verringerung des intrazellulären Gehaltes an ROS signifikant hemmt, während es die durch einen Hitze-Schock induzierte Zinkionenfreisetzung nicht hemmt (Lutter et al., 2010). Durch welchen Mechanismus ein Hitze-Schock einen Einfluss auf die zelluläre Zinkhomöostase hat, bleibt im Augenblick also unklar. Eine Hypothese ist, dass erhöhte Temperaturen eine Konformationsänderung von Zinkfingerstrukturen bewirken könnten, was zu einer Freisetzung des gebundenen Zinks führen würde.

#### **4.4. Kälte-Schock und dessen Einfluss auf die zelluläre Zinkhomöostase**

Hypothermie findet Verwendung bei der Lagerung und beim Transport von verschiedenen Zellarten und Organen, des Weiteren stellt es ein medizinisches Verfahren bei der Durchführung von Gehirn- und Herzoperationen dar. Es wurde gezeigt, dass das Aufbewahren von Kanninchen-Nieren für 24 oder 48 Stunden bei 0°C zu einem Anstieg von freien Eisenionen in den Nieren auf das 2- und 3-fache führt. Eine anschließende Erwärmung auf 37°C führt zu einem 7-fachen Anstieg der Eisenionen (Healing et al., 1990). Gezeigt wurde außerdem, dass ein Kälte-Schock, definiert als Hypothermie von 4°C über mehrere Stunden, zu einem etwa 2,5-fachen Anstieg des intrazellulären freien Eisenionengehaltes in Hepatozyten führt. Dies geschieht ohne die Bildung entsprechender ROS wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Singulett-Sauerstoff, weder während der Hypothermie noch nach anschließender Erwärmung auf 37°C (Rauen et al., 2000). In meinen Versuchen mit L929-Fibroblasten und MAEC zeigte sich keine relevante intrazelluläre Zinkionenfreisetzung während eines Kälte-Schocks (mehrere Stunden bei 1°C) bzw. nach einer anschließenden Erwärmung auf 37°C. Dies steht im Gegensatz zu den Versuchen, in denen ein Kälte-Schock die oben beschriebene Erhöhung des intrazellulären freien Eisenionengehaltes bewirkte. Viele zelluläre Prozesse, z.B. die Genexpression, die durch eine Hypothermie ausgelöst werden, werden auch durch eine Hyperthermie ausgelöst (Sonna et al., 2002), doch scheinen diese Gemeinsamkeiten die zelluläre Zinkhomöostase nicht zu betreffen.

#### **4.5. Hypoosmolarität und dessen Einfluss auf die zelluläre Zinkhomöostase**

Im Bereich des Zentralen Nervensystems (ZNS) spielen intrazelluläre und transsynaptische Zinkionenfreisetzungen pathophysiologisch beispielsweise im Rahmen von Schlaganfällen und Schädel-Hirn-Traumata eine wichtige Rolle (Frederickson et al., 2004; Galasso und Dyck, 2007). Insbesondere das Anschwellen der Astrozyten als Frühereignis dieses Pathomechanismus nimmt dabei eine wichtige Rolle ein (Haussinger und Schliess, 2005; Kimelberg, 2005; Haussinger, 2006). Es wurde beschrieben, dass das Anschwellen von Astrozyten sowohl zur Generierung von oxidativem als auch von nitrosativem Stress führt (Rao, 2002; Schliess et al., 2006; Gorg et al., 2010). Bei der hepatischen Enzephalopathie kommt es aufgrund einer Beeinträchtigung der Entgiftungsfunktion der Leber zur Akkumulation verschiedener Stoffe, insbesondere von Ammoniak, im Körper. Dies wiederum führt aus bisher noch nicht genau bekannten Gründen zu Hirnödemen und somit zu entsprechenden neurologischen Ausfällen. In meinen Versuchen habe ich gezeigt, dass Hypoosmolarität, welches ein gängiges Modell für das Anschwellen von Zellen ist, bei der

humanen Astrozyten-Zelllinie MOG-G-CCM zu einer transienten intrazellulären Zinkionenfreisetzung führt. Dass es sich dabei vermutlich um einen zellspezifischen Effekt handelt zeigten entsprechende Versuche mit L929-Fibroblasten, wo eine Hypoosmolarität keinen sichtbaren Einfluss auf die zelluläre Zinkhomöostase hat. Kruczek et al. konnten zeigen, dass die beschriebene Zinkionenfreisetzung in Astrozyten auf einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen enzymatischen NO-Synthese beruht, vermutlich bewirkt durch die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) (Kruczek et al., 2009). Hieraus ergibt sich ein möglicher Erklärungsversuch für diesen zellspezifischen Effekt, da die nNOS zwar in Astrozyten, nicht jedoch in Fibroblasten exprimiert wird. Des Weiteren wurde auch gezeigt, dass neben  $\text{NH}_3$  auch die Inkubation mit TNF-alpha oder mit Diazepam eine intrazelluläre Zinkionenfreisetzung bewirkt.

Ob die beobachtete  $\text{Zn}^{2+}$ -Freisetzung einen protektiven Effekt ausübt, z.B. mittels Expression bestimmter Proteine, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantworten und muss in weiteren Versuchen untersucht werden. Positive Effekte einer Zinksupplementationstherapie bei der Hepatischen Enzephalopathie sind zwar bekannt (Bresci et al., 1993; Takuma et al., 2010), jedoch sind die genauen Wirkungsmechanismen nicht ausreichend beschrieben.

#### **4.6. Silberionen und deren Einfluss auf die zelluläre Zinkhomöostase**

Es wurde gefunden, dass Schwer- bzw. Übergangsmetalle wie  $\text{Pb}^{2+}$  und auch  $\text{Hg}^{2+}$  unter subtoxischen Bedingungen zu einer intrazellulären Zinkionenfreisetzung führen (Brand und Kleineke, 1996; Haase et al., 2006). Untersuchungen, ob Silbernitrat ( $\text{AgNO}_3$ ), welches als antimikrobielles Agens häufig in der Wundbehandlung eingesetzt wird (Lansdown, 2006; Atiyeh et al., 2007;), einen Einfluss auf die zelluläre Zinkhomöostase hat, lagen bisher nicht vor. In meinen Versuchen konnte ich zeigen, dass die Inkubation mit subtoxischen Silbernitratkonzentrationen zu einer transienten reversiblen intrazellulären Zinkionenfreisetzung führt. Auch hier zeigte sich das Auftreten von Zinkionenansammlungen in Nukleoli aller Zellen. Aufbauend darauf zeigten Cortese-Krott et al. (Cortese-Krott et al., 2009) dies auch bei Versuchen mit humanen Hautfibroblasten. Cortese-Krott et al. zeigten auch, dass eine Silbernitratbehandlung zu einer Erniedrigung des Spiegels an reduziertem GSH führt und dass dies zu einer Zunahme eines durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  induzierten Zelltodes führt. Bekanntermaßen führt die Behandlung verschiedener Zellarten mit Silberionen zu einer Generierung verschiedener ROS (Hultberg et al., 1997; Yoshimaru et al., 2006; Wardman, 2007), so dass zusammenfassend eine massive Generierung von oxidativem Stress und damit

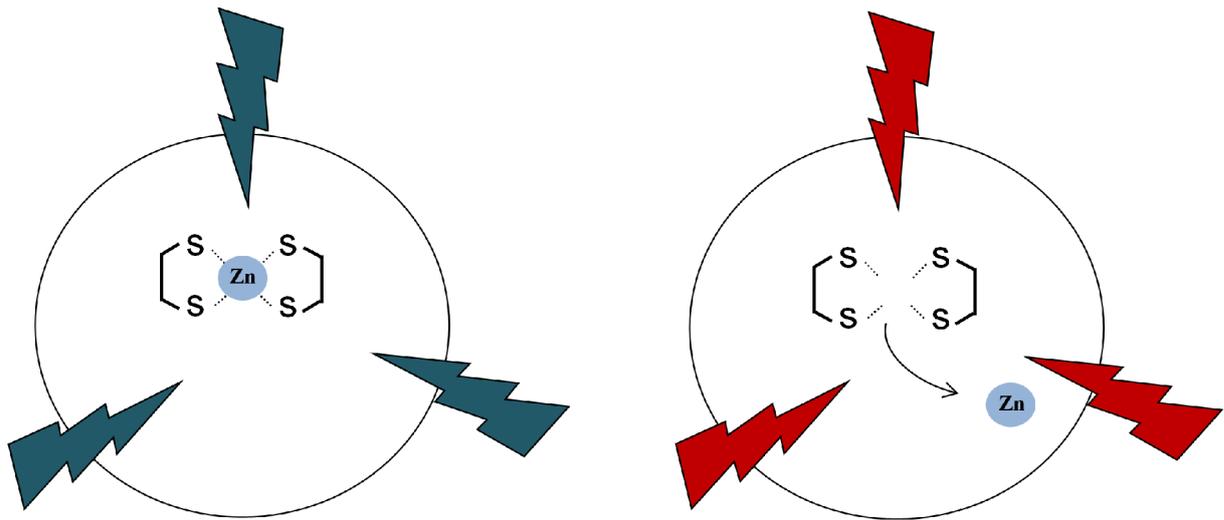
eine Verschiebung des zellulären Redox-Status im Rahmen einer Silbernitratbehandlung eine Freisetzung von Zinkionen in Zellen bewirkt. Auch hier stellt sich die Frage, ob diese intrazelluläre Zinkionenfreisetzung möglicherweise einen protektiven Effekt ausüben soll.

#### **4.7. Scherstress bzw. DMSO und ihr Einfluss auf die zelluläre Zinkhomöostase**

Die Wirkungen von Scherstress, welches als Model für die Auswirkungen von Strömungen auf Zellen, z.B. das Gefäß-Endothel, benutzt wird, auf die zelluläre Zinkhomöostase sind bisher völlig unbekannt. Ein Scherstress bewirkte weder in MAEC noch in L929-Fibroblasten zu irgendeinem untersuchten Zeitpunkt eine signifikante intrazelluläre Zinkionenfreisetzung. Dimethylsulfoxid (DMSO) wird in der Zellkulturtechnik als Gefrierschutzmittel bei der Kryokonservierung eingesetzt. Weiterhin wird es bei versehentlicher subkutaner Applikation von Zytostatika dermal appliziert, wo es unter anderem zu einem Scavengen von Radikalen führen soll (Jacob und Herschler 1986; Jacob und de la Torre, 2009). Versuche mit L929-Fibroblasten zeigten, dass die Kryokonservierung mit 10% DMSO bei einer Kurzzeit-Kultivierung für 10 Stunden zu keiner  $Zn^{2+}$ -Freisetzung führte. Sowohl die Versuche mit Scherstress als auch die mit DMSO unterstreichen, dass nicht alle Stressarten zu einer Zinkionenfreisetzung in Zellen führen.

## 4.8. Überblick über verschiedene Stressarten und ihre Auswirkungen auf die zelluläre Zinkhomöostase

Bisher sind nur wenige zelluläre Stressarten identifiziert worden, die zu einer intrazellulären Freisetzung von  $Zn^{2+}$  aus Proteinen führen. Abbildung 20 zeigt eine Übersicht über die von mir untersuchten Stressarten und ihren jeweiligen Einfluss auf die  $Zn^{2+}$ -Freisetzung.



**UV-B-Strahlung**

**IR-A-Strahlung**

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei Fibroblasten**

**Redox-Cycler (Chinone)**

**Hemmung der GSH-Biosynthese**

**Hypothermie (bis 5h 1°C, dann bis 2h 37°C)**

**Hypoosmolarität bei Fibroblasten**

**Scherstress**

**DMSO**

**UV-A-Strahlung**

**tert-Butyl-Hydroperoxid**

**Singulett-Sauerstoff (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)**

**Oxidation von GSH**

**Hyperthermie (> 41°C)**

**Silberionen (Ag<sup>+</sup>)**

**Hypoosmolarität bei Astrozyten**

**Abb. 20** Verschiedene Stressarten und ihre Auswirkungen auf die zelluläre Zinkhomöostase:

Die Abbildung zeigt eine Liste der verschiedenen von mir untersuchten Stressarten und ihre Auswirkungen auf die zelluläre Zinkhomöostase unter subtoxischen Bedingungen.

#### 4.9. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde erstmals systematisch untersucht, welche Stressarten zu einer Freisetzung von intrazellulären Zinkionen führen können. Dabei wurden die Bedingungen immer so gewählt, dass mehr als 80% der Zellen nach 24 Stunden mit einer normalen Zellkernmorphologie überlebten. Eine Bestrahlung mit UV-A führte zu einer transienten intrazellulären  $Zn^{2+}$ -Freisetzung, nicht jedoch eine Bestrahlung mit UV-B oder IRA Strahlen. Auch die Behandlung mit tert-butyl-Hydroperoxid, Singulett-Sauerstoff oder die Oxidation von Glutathion mittels Diamid führte zu einer  $Zn^{2+}$ -Freisetzung, während die Behandlung mit  $H_2O_2$  oder Chinonen zur intrazellulären Generierung von Superoxid-Anion-Radikalen oder auch die Hemmung der Glutathion-Synthese zu keiner  $Zn^{2+}$ -Freisetzung führte. Weiterhin wurde gezeigt, dass es bei einem Hitze-Schock, im Gegensatz zu einem Kälteschock, ebenfalls zu einer intrazellulären transienten  $Zn^{2+}$ -Freisetzung kommt. Diese war nach einem weiteren Hitze-Schock nach 24 Stunden wiederholbar, eine Thermoadaptation wurde also nicht beobachtet. Die Hitze-Schock induzierte  $Zn^{2+}$ -Freisetzung war unabhängig von Metallothionein, dem wichtigsten zellulären  $Zn^{2+}$ -Speicherprotein. Bei den Hitze-Schock-Versuchen zeigte sich zusätzlich zur zytoplasmatischen Freisetzung auch eine  $Zn^{2+}$ -Freisetzung in runden abgegrenzten nukleären Arealen, die als Nukleoli identifiziert wurden. Auch die Behandlung der Zellen mit dem Schwermetall  $Ag^+$  bewirkte eine  $Zn^{2+}$ -Freisetzung, während weder Scherstress noch die Behandlung mit DMSO diesen Effekt zeigte. Dass bestimmte Stressarten auch zellspezifisch die intrazelluläre Zinkhomöostase beeinflussen können wurde in Hypoosmolaritäts-Versuchen deutlich, in denen eine  $Zn^{2+}$ -Freisetzung in Astrozyten, nicht jedoch in Fibroblasten gefunden wurde.

Diese Arbeit zeigt, dass eine intrazelluläre  $Zn^{2+}$ -Freisetzung kein generelles Phänomen nach zellulärem Stress darstellt. Intrazellulär generierte reaktive Sauerstoffradikale (z.B. bei UV-A,  $Ag^+$ ) scheinen eine wichtige Rolle bei der  $Zn^{2+}$ -Freisetzung zu spielen. Jedoch konnten auch Bedingungen identifiziert werden (z.B. Hitze-Schock), bei denen intrazellulär keine reaktiven Sauerstoffradikale generiert werden. Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, ob intrazellulär freigesetzte Zinkionen, wie sie bei vielen Erkrankungen gefunden werden, eine funktionelle Rolle haben, z.B. als Signalatome eine protektive Reaktion der Zelle auslösen können, oder ob es sich um ein reines Epiphänomen handelt.

## 5. Literaturverzeichnis

- Ahn, S. G. and D. J. Thiele. "Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress." Genes Dev. 17.4 (2003): 516-28.
- Aizenman, E., et al. "Induction of neuronal apoptosis by thiol oxidation: putative role of intracellular zinc release." J.Neurochem. 75.5 (2000): 1878-88.
- Alia, M., et al. "Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2)." J.Biochem.Mol.Toxicol. 19.2 (2005): 119-28.
- Åslund, F. and J. Beckwith. "Bridge over troubled waters: sensing stress by disulfide bond formation." Cell 96.6 (1999): 751-53.
- Atiyeh, B. S., et al. "Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature." Burns 33.2 (2007): 139-48.
- Bauman, J. W., J. Liu, and C. D. Klaassen. "Production of metallothionein and heat-shock proteins in response to metals." Fundam.Appl.Toxicol. 21.1 (1993): 15-22.
- Bielski, BHJ, D. E. Cabelli, R. L. Arudi, and A. B. Ross. "Reactivity of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>-</sup> Radicals in Aqueous Solution." J Phys Chem Ref Data 14 (1985): 1041-1100.
- Benon, H. J., J. Bielski, D. E. Cabelli, L. Ravindra, L. Arudi, and A. B. Ross. "Reactivity of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>-</sup> Radicals in Aqueous Solution." J Phys Chem Ref Data 14 (1985): 1041-1100.
- Berendji, D., et al. "Influence of nitric oxide on the intracellular reduced glutathione pool: different cellular capacities and strategies to encounter nitric oxide-mediated stress." Free Radic.Biol.Med. 27.7-8 (1999): 773-80.
- Berg, K., et al. "Zinc potentiates the antiviral action of human IFN-alpha tenfold." J.Interferon Cytokine Res. 21.7 (2001): 471-74.
- Brand, I. A. and J. Kleineke. "Intracellular zinc movement and its effect on the carbohydrate metabolism of isolated rat hepatocytes." J.Biol.Chem. 271.4 (1996): 1941-49.
- Brenneisen, P., H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek. "Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events." Ann.N.Y.Acad.Sci. 973 (2002): 31-43.
- Bresci, G., G. Parisi, and S. Banti. "Management of hepatic encephalopathy with oral zinc supplementation: a long-term treatment." Eur.J.Med. 2.7 (1993): 414-16.
- Bush, A. I., et al. "Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc." Science 265.5177 (1994): 1464-67.
- Capasso, M., et al. "Zinc dyshomeostasis: a key modulator of neuronal injury." J.Alzheimers.Dis. 8.2 (2005): 93-108.
- Chimienti, F., et al. "In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion." J.Cell Sci. 119.Pt 20 (2006): 4199-206.
- Coogan, T. P., R. M. Bare, and M. P. Waalkes. "Cadmium-induced DNA strand damage in cultured liver cells: reduction in cadmium genotoxicity following zinc pretreatment." Toxicol.Appl.Pharmacol. 113.2 (1992): 227-33.

- Cortese-Krott, M. M., et al. "Silver ions induce oxidative stress and intracellular zinc release in human skin fibroblasts." Free Radic.Biol.Med. 47.11 (2009): 1570-77.
- Cortese-Krott, M. M., et al. "Nitric oxide-mediated protection of endothelial cells from hydrogen peroxide is mediated by intracellular zinc and glutathione." Am.J.Physiol Cell Physiol 296.4 (2009): C811-C820.
- Cuajungco, M. P. and K. Y. Faget. "Zinc takes the center stage: its paradoxical role in Alzheimer's disease." Brain Res.Brain Res.Rev. 41.1 (2003): 44-56.
- DeMoor, J. M., et al. "Zinc-metallothionein levels are correlated with enhanced glucocorticoid responsiveness in mouse cells exposed to ZnCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, and heat shock." Toxicol.Sci. 64.1 (2001): 67-76.
- Ferencik, M. and L. Ebringer. "Modulatory effects of selenium and zinc on the immune system." Folia Microbiol.(Praha) 48.3 (2003): 417-26.
- Ferri, C. P., et al. "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study." Lancet 366.9503 (2005): 2112-17.
- Fliss, H., M. Menard, and M. Desai. "Hypochlorous acid mobilizes cellular zinc." Can.J.Physiol.Pharmacol. 69.11 (1991): 1686-91.
- Frederickson, C. J., J. Y. Koh, and A. I. Bush. "The neurobiology of zinc in health and disease." Nat.Rev.Neurosci. 6.6 (2005): 449-62.
- Frederickson, C. J., W. Maret, and M. P. Cuajungco. "Zinc and excitotoxic brain injury: a new model." Neuroscientist. 10.1 (2004): 18-25.
- Galasso, S. L. and R. H. Dyck. "The role of zinc in cerebral ischemia." Mol.Med. 13.7-8 (2007): 380-87.
- Gorg, B., et al. "Oxidative stress markers in the brain of patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy." Hepatology 52.1 (2010): 256-65.
- Graeme, K. A. and C. V. Pollack, Jr. "Heavy metal toxicity, Part I: arsenic and mercury." J.Emerg.Med. 16.1 (1998A): 45-56.
- Graeme, K. A. and C. V. Pollack, Jr. "Heavy metal toxicity, part II: lead and metal fume fever." J.Emerg.Med. 16.2 (1998B): 171-77.
- Grüingreiff K. "Zink und Leber." 4. Dr. Falk Pharma GmbH aktualisierte Auflage (2006).
- Gryglewski, R. J., R. M. Palmer, and S. Moncada. "Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor." Nature 320.6061 (1986): 454-56.
- Gunther, T., et al. "Protection against salicylate-induced hepatic injury by zinc. A histochemical and biochemical study." Histochem.J. 23.2 (1991): 75-82.
- Haase, H. and D. Beyersmann. "Intracellular zinc distribution and transport in C6 rat glioma cells." Biochem.Biophys.Res.Commun. 296.4 (2002): 923-28.
- Haase, H., et al. "Flow cytometric measurement of labile zinc in peripheral blood mononuclear cells." Anal.Biochem. 352.2 (2006): 222-30.
- Haussinger, D. "Low grade cerebral edema and the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis." Hepatology 43.6 (2006): 1187-90.

- Haussinger, D. "[Hepatic encephalopathy]." Praxis.(Bern.1994.) 95.40 (2006): 1543-49.
- Haussinger, D. and F. Schliess. "Astrocyte swelling and protein tyrosine nitration in hepatic encephalopathy." Neurochem.Int. 47.1-2 (2005): 64-70.
- Healing, G., et al. "Intracellular iron redistribution. An important determinant of reperfusion damage to rabbit kidneys." Biochem.Pharmacol. 39.7 (1990): 1239-45.
- Ho, L. H., et al. "Labile zinc and zinc transporter ZnT4 in mast cell granules: role in regulation of caspase activation and NF-kappaB translocation." J.Immunol. 172.12 (2004): 7750-60.
- Hufschmidt A. und C. H. Lücking. "Neurologie compact / Für Klinik und Praxis." Thieme Verlag 4. aktualisierte und erweiterte Auflage, 2009.
- Hultberg, B., A. Andersson, and A. Isaksson. "The effects of homocysteine and copper ions on the concentration and redox status of thiols in cell line cultures." Clin.Chim.Acta 262.1-2 (1997): 39-51.
- Jacob, S. W. and J. C. de la Torre. "Pharmacology of dimethyl sulfoxide in cardiac and CNS damage." Pharmacol.Rep. 61.2 (2009): 225-35.
- Jacob, S. W. and R. Herschler. "Pharmacology of DMSO." Cryobiology 23.1 (1986): 14-27.
- Jackson MJ: Physiology of zinc. General aspects. In: Mills CF: Zinc in human biology. 1-14, Springer Verlag London, Berlin, Heidelberg, New York, Paris,Tokyo, 1989.
- Johnston, M. "Genetic evidence that zinc is an essential co-factor in the DNA binding domain of GAL4 protein." Nature 328.6128 (1987): 353-55.
- Kahmann, L., et al. "Effect of improved zinc status on T helper cell activation and TH1/TH2 ratio in healthy elderly individuals." Biogerontology. 7.5-6 (2006): 429-35.
- Kappus, H. and H. Sies. "Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation." Experientia 37.12 (1981): 1233-41.
- Karagulova, G., et al. "Protective role of intracellular zinc in myocardial ischemia/reperfusion is associated with preservation of protein kinase C isoforms." J.Pharmacol.Exp.Ther. 321.2 (2007): 517-25.
- Katschinski, D. M., et al. "Pivotal role of reactive oxygen species as intracellular mediators of hyperthermia-induced apoptosis." J.Biol.Chem. 275.28 (2000): 21094-98.
- Kimelberg, H. K. "Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy." Glia 50.4 (2005): 389-97.
- Kishida, K. T. and E. Klann. "Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory." Antioxid.Redox.Signal. 9.2 (2007): 233-44.
- Klotz, L. O., N. J. Holbrook, and H. Sies. "UVA and singlet oxygen as inducers of cutaneous signaling events." Curr.Probl.Dermatol. 29 (2001): 95-113.
- Klotz, L. O., et al. "Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA." Eur.J.Biochem 260.3 (1999): 917-22.
- Klug, A. and J. W. Schwabe. "Protein motifs 5. Zinc fingers." FASEB J. 9.8 (1995): 597-604.

- Koh, J. Y., et al. "The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia." Science 272.5264 (1996): 1013-16.
- Kolominsky-Rabas, P. L. and P. U. Heuschmann. "[Incidence, etiology and long-term prognosis of stroke]." Fortschr.Neurol.Psychiatr. 70.12 (2002): 657-62.
- Korichneva, I., et al. "Zinc release from protein kinase C as the common event during activation by lipid second messenger or reactive oxygen." J.Biol.Chem. 277.46 (2002): 44327-31.
- Kosower, N. S. and E. M. Kosower. "Diamide: an oxidant probe for thiols." Methods Enzymol. 251 (1995): 123-33.
- Kregel, K. C. "Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance." J.Appl.Physiol. 92.5 (2002): 2177-86.
- Krezel, A., Q. Hao, and W. Maret. "The zinc/thiolate redox biochemistry of metallothionein and the control of zinc ion fluctuations in cell signaling." Arch Biochem Biophys 463.2 (2007): 188-200.
- Krezel, A. and W. Maret. "Zinc-buffering capacity of a eukaryotic cell at physiological pZn." J.Biol.Inorg.Chem. 11.8 (2006): 1049-62.
- Kroncke, K. D. and C. Carlberg. "Inactivation of zinc finger transcription factors provides a mechanism for a gene regulatory role of nitric oxide." FASEB J. 14.1 (2000): 166-73.
- Kroncke, K. D., K. Fehsel, and V. Kolb-Bachofen. "Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities." Biol.Chem.Hoppe Seyler 376.6 (1995): 327-43.
- Kroncke, K. D., et al. "Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9." Biochem.Biophys.Res.Commun. 200.2 (1994): 1105-10.
- Kroncke, K. D., et al. "Comparing nitrosative versus oxidative stress toward zinc finger-dependent transcription. Unique role for NO." J.Biol.Chem. 277.15 (2002): 13294-301.
- Kruczek, C., et al. "Hypoosmotic swelling affects zinc homeostasis in cultured rat astrocytes." Glia 57.1 (2009): 79-92.
- Lansdown, A. B. "Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use." Curr.Probl.Dermatol. 33 (2006): 17-34.
- Lautier, D., P. Luscher, and R. M. Tyrrell. "Endogenous glutathione levels modulate both constitutive and UVA radiation/hydrogen peroxide inducible expression of the human heme oxygenase gene." Carcinogenesis 13.2 (1992): 227-32.
- Lazarczyk, M., et al. "Regulation of cellular zinc balance as a potential mechanism of EVER-mediated protection against pathogenesis by cutaneous oncogenic human papillomaviruses." J.Exp.Med. 205.1 (2008): 35-42.
- Li, W., et al. "The role of zinc in the disulphide stress-regulated anti-sigma factor RsrA from *Streptomyces coelicolor*." J.Mol.Biol. 333.2 (2003): 461-72.
- Lovell, M. A., et al. "Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques." J.Neurol.Sci. 158.1 (1998): 47-52.

- Lovell, M. A., C. Xie, and W. R. Markesbery. "Decreased glutathione transferase activity in brain and ventricular fluid in Alzheimer's disease." Neurology 51.6 (1998): 1562-66.
- Lutter, K., et al. "3,3'-Dihydroxyisoreinieratene prevents UV-induced formation of reactive oxygen species and the release of protein-bound zinc ions in human skin fibroblasts." Mol.Nutr.Food Res. 54.2 (2010): 285-91.
- Maret, W. "Zinc and sulfur: a critical biological partnership." Biochemistry 43.12 (2004): 3301-09.
- Maret, W. "Zinc coordination environments in proteins as redox sensors and signal transducers." Antioxid.Redox.Signal. 8.9-10 (2006): 1419-41.
- Maret, W. and B. L. Vallee. "Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 95.7 (1998): 3478-82.
- Matsumura, Y. and H. N. Ananthaswamy. "Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin." Toxicol.Appl.Pharmacol. 195.3 (2004): 298-308.
- Maytin, E. V. and D. A. Young. "Separate glucocorticoid, heavy metal, and heat shock domains in thymic lymphocytes." J.Biol.Chem. 258.20 (1983): 12718-22.
- Neldner, K. H., K. M. Hambidge, and P. A. Walravens. "Acrodermatitis enteropathica." Int.J.Dermatol. 17.5 (1978): 380-87.
- Olson, M. O. "Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus?" Sci.STKE. 2004.224 (2004): pe10.
- Palmiter, R. D. and S. D. Findley. "Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc." EMBO J. 14.4 (1995): 639-49.
- Phillips, S. G. and D. M. Phillips. "Nucleoli of diploid cell strains. The normal ultrastructure and the effects of toyocamycin and actinomycin D." J.Cell Biol. 49.3 (1971): 785-802.
- Pourzand, C., et al. "Ultraviolet A radiation induces immediate release of iron in human primary skin fibroblasts: the role of ferritin." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 96.12 (1999): 6751-56.
- Quesada, A. R., et al. "Direct reaction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with sulfhydryl groups in HL-60 cells: zinc-metallothionein and other sites." Arch.Biochem.Biophys. 334.2 (1996): 241-50.
- Quintana, C., et al. "The occurrence of metals Al, Fe, Ni, Cu, Zn in the nuclei of animal cells: an ultrastructural, in situ, X-ray microanalytical study." Biol.Cell 61.3 (1987): 115-19.
- Rao, V. L. "Nitric oxide in hepatic encephalopathy and hyperammonemia." Neurochem.Int. 41.2-3 (2002): 161-70.
- Rauen, U., et al. "Hypothermia injury/cold-induced apoptosis - evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation." FASEB J. 14.13 (2000): 1953-64.
- Regland, B., et al. "Treatment of Alzheimer's disease with clioquinol." Dement.Geriatr.Cogn Disord. 12.6 (2001): 408-14.
- Richards, M. P. and R. J. Cousins. "Mammalian zinc homeostasis: requirement for RNA and metallothionein synthesis." Biochem.Biophys.Res.Commun. 64.4 (1975): 1215-23.
- Riger, C. J., et al. "Evaluation of heavy metal toxicity in eukaryotes using a simple functional assay." Metallomics. (2011).

- Rimbach, G., et al. "[Zinc--update of an essential trace element]." Z.Ernahrungswiss. 35.2 (1996): 123-42.
- Rink, L. and P. Gabriel. "Zinc and the immune system." Proc.Nutr.Soc. 59.4 (2000): 541-52.
- Rink, L. and P. Gabriel. "Extracellular and immunological actions of zinc." Biometals 14.3-4 (2001): 367-83.
- Rink, L. and H. Haase. "Zinc homeostasis and immunity." Trends Immunol. 28.1 (2007): 1-4.
- Rink, L., et al. "Enhanced phosphorylation of Nbs1, a member of DNA repair/checkpoint complex Mre11-RAD50-Nbs1, can be targeted to increase the efficacy of imatinib mesylate against BCR/ABL-positive leukemia cells." Blood 110.2 (2007): 651-60.
- Ritchie, C. W., et al. "Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Abeta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial." Arch.Neurol. 60.12 (2003): 1685-91.
- Roberts, E. A. and D. W. Cox. "Wilson disease." Baillieres Clin.Gastroenterol. 12.2 (1998): 237-56.
- Rubbi, C. P. and J. Milner. "Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses." EMBO J. 22.22 (2003): 6068-77.
- Schliess, F., B. Gorg, and D. Häussinger. "Pathogenetic interplay between osmotic and oxidative stress: the hepatic encephalopathy paradigm." Biol.Chem. 387.10-11 (2006): 1363-70.
- Schroeder, P., C. Calles, and J. Krutmann. "Prevention of infrared-A radiation mediated detrimental effects in human skin." Skin Therapy.Lett. 14.5 (2009): 4-5.
- Schroeder, P., et al. "Infrared radiation-induced matrix metalloproteinase in human skin: implications for protection." J.Invest Dermatol. 128.10 (2008): 2491-97.
- Schroeder, P., et al. "Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling." Free Radic.Biol.Med. 43.1 (2007): 128-35.
- Schwabe, J. W., D. Neuhaus, and D. Rhodes. "Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor." Nature 348.6300 (1990): 458-61.
- Sies, H. "Antioxidant activity in cells and organs." Am.Rev.Respir.Dis. 136.2 (1987): 478-80.
- Sies, H.. "Role of reactive oxygen species in biological processes." Klin.Wochenschr. 69.21-23 (1991): 965-68.
- Sies, H. and Groot H. de. "Role of reactive oxygen species in cell toxicity." Toxicol.Lett. 64-65 Spec No (1992): 547-51.
- Sonna, L. A., et al. "Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression." J.Appl.Physiol. 92.4 (2002): 1725-42.
- Spahl, D. U., et al. "Regulation of zinc homeostasis by inducible NO synthase-derived NO: nuclear metallothionein translocation and intranuclear Zn<sup>2+</sup> release." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 100.24 (2003): 13952-57.
- Spector, A., et al. "The effect of H2O2 and tertiary butyl hydroperoxide upon a murine immortal lens epithelial cell line, alphaTN4-1." Exp.Eye Res. 75.5 (2002): 573-82.
- Stone, J. R. and S. Yang. "Hydrogen peroxide: a signaling messenger." Antioxid.Redox.Signal. 8.3-4 (2006): 243-70.

- Stremmel, W., et al. "Wilson disease: clinical presentation, treatment, and survival." Ann.Intern.Med. 115.9 (1991): 720-26.
- Suh, S. W., et al. "Evidence that synaptically-released zinc contributes to neuronal injury after traumatic brain injury." Brain Res. 852.2 (2000): 268-73.
- Suh, S. W., et al. "Histochemically-reactive zinc in amyloid plaques, angiopathy, and degenerating neurons of Alzheimer's diseased brains." Brain Res. 852.2 (2000): 274-78.
- Takuma, Y., et al. "Clinical trial: oral zinc in hepatic encephalopathy." Aliment.Pharmacol.Ther. 32.9 (2010): 1080-90.
- Tapiero, H. and K. D. Tew. "Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins." Biomed.Pharmacother. 57.9 (2003): 399-411.
- Tyrrell, R. M. and S. M. Keyse. "New trends in photobiology. The interaction of UVA radiation with cultured cells." J.Photochem.Photobiol.B 4.4 (1990): 349-61.
- Uciechowski, P., et al. "TH1 and TH2 cell polarization increases with aging and is modulated by zinc supplementation." Exp.Gerontol. 43.5 (2008): 493-98.
- Vallee, B. L. and K. H. Falchuk. "The biochemical basis of zinc physiology." Physiol Rev. 73.1 (1993): 79-118.
- Vile, G. F. and R. M. Tyrrell. "UVA radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins in vitro and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen." Free Radic.Biol.Med. 18.4 (1995): 721-30.
- Wardman, P. "Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects." Free Radic.Biol.Med. 43.7 (2007): 995-1022.
- Wiseman, D. A., et al. "Alterations in zinc homeostasis underlie endothelial cell death induced by oxidative stress from acute exposure to hydrogen peroxide." Am.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol. 292.1 (2007): L165-L177.
- Yoshimaru, T., et al. "Silver activates mast cells through reactive oxygen species production and a thiol-sensitive store-independent Ca<sup>2+</sup> influx." Free Radic.Biol.Med. 40.11 (2006): 1949-59.
- Zalewski, P. D., et al. "Flux of intracellular labile zinc during apoptosis (gene-directed cell death) revealed by a specific chemical probe, Zinquin." Chem.Biol. 1.3 (1994): 153-61.
- Zalewski, P. D., et al. "Video image analysis of labile zinc in viable pancreatic islet cells using a specific fluorescent probe for zinc." J.Histochem.Cytochem. 42.7 (1994): 877-84.
- Zhao, Q. L., Y. Fujiwara, and T. Kondo. "Mechanism of cell death induction by nitroxide and hyperthermia." Free Radic.Biol.Med 40.7 (2006): 1131-43.

## 6. Danksagung

*"Es ist nichts als die Tätigkeit nach einem bestimmten Ziel, was das Leben erträglich macht." (Friedrich von Schiller)*

Dieses Ziel neigt sich somit einem lang ersehntem Ende zu in welches ich jahrelang sehr viel Zeit und Kraft investiert habe. Die Jahre der Erstellung meiner Doktorarbeit waren gekennzeichnet von sehr vielen Rückschlägen unter anderem mit frustrierten Abenden gemeinsam verbracht mit einem Fluoreszenzmikroskop in einem menschenleeren Labor. Dieses hat mir den Einblick in die Welt der Zellen ermöglicht, die manchmal sehr eigensinnig schienen und sich eher den verschiedenen Mondphasen entsprechend verhielten als sich wissenschaftlichen Prinzipien zu beugen. Doch auch diese Rückschläge haben mich geprägt, so dass ich sie aus heutiger Sicht nicht missen möchte. Es waren aber nicht nur meine eigenen Fähigkeiten, die mich dieses Ziel erreichen lassen haben, es waren auch die Menschen, jeder auf seine spezielle Art und Weise, die um mich herum die Weichen gestellt haben und somit einen wesentlichen Beitrag dazu geleistet haben, dass ich soweit gekommen bin. Auf diese Weise möchte ich nochmals Danke sagen.

Als erstes gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Klaus-Dietrich Kröncke, der mich in die Welt der Wissenschaft eingeführt hat, mich jahrelang auf einem unbeschreiblich hohem Niveau betreut hat und mir immer zur Seite gestanden hat. Er hat sich immer Zeit für mich genommen, hat mich nie mit meinen unzähligen wissenschaftlichen Problemen alleine gelassen und hat sofort nach entsprechenden Lösungen dafür gesucht. Es gab in all den Jahren keinen Zeitpunkt, an dem er mich getröstet hat oder mir nicht innerhalb kürzester Zeit eine wegweisende Antwort auf eine von mir gestellte Frage geliefert hat. Ihm habe ich nicht nur die Fähigkeit zu verdanken wissenschaftlich zu arbeiten, sondern auch wissenschaftlich zu denken. Ohne ihn wäre diese Arbeit in dieser Form nicht ansatzweise denkbar gewesen.

Ein besonderer Dank gilt auch an das ehemalige Team des Institutes für Molekularbiologie und Biochemie I unter der damaligen Leitung von Prof. Dr. Helmut Sies, dessen herausragenden wissenschaftlichen Leistungen für mich immer eine große Motivation darstellten. Es war eine besondere Ehre für mich solch eine bekannte Persönlichkeit erleben zu dürfen und seine weisen Ratschläge anzunehmen. Hervorzuheben sind auch meine damalige Kollegin Yasemin Ince mit der ich damals nicht nur ein kollegiales, sondern auch ein freundschaftliches Verhältnis gepflegt habe. Andrea Borchardt, die als biologisch-

technische Assistentin des Institutes für alle Fragen eines Medizinstudenten zu jeder Zeit geduldig zur Verfügung stand, gilt auch ein großer Dank. Menschlich jemand Einzigartiges.

Ohne meine Familie wäre ich nicht zu dem geworden, was ich jetzt bin. Meine Eltern Ceca und Cedomir Pirev sind als Gastarbeiter in dieses Land gekommen und haben dafür gekämpft, dass meine Schwester Iveta und ich die bestmögliche Ausbildung erhalten. Sie haben trotz aller Widrigkeiten alles dafür getan, dass es uns an nichts fehlt und dass wir wie mein Vater es immer einfach formuliert, in der Lage sind unser Brot selbständig zu verdienen. Sie haben uns niemals unter Druck gesetzt und haben immer unser Wohl über ihr eigenes gestellt. Insbesondere meiner Mutter muss ich dafür danken, dass sie soviel Geduld mit mir gehabt hat, wenn ich mal wieder frustriert am Wochenende nach Hause gekommen bin und schlechte Laune gehabt habe, was zu meinem Bedauern desöfteren der Fall gewesen ist. Auch meine große Schwester hat meine schlechte Launen immer ertragen müssen, hat mir ihre Unterstützung aber niemals verwehrt. Sie ist einer der gutherzigsten Menschen, die ich kenne und auch wenn ich ihr das nie gesagt habe liebe ich sie über alles.

***"Es sind Freunde, die man um 4 Uhr morgens anrufen kann, welche von Bedeutung sind."(Marlene Dietrich)***

Neben der Familie sind Freunde eine der wichtigsten Stützen im Leben eines jeden. Richtige Freunde gibt es wenige und diese sind auch nicht mehr als Freunde sondern als Familie zu bezeichnen. Laila El-Mehallawi ist eine solche Person. Wir haben das Medizinstudium zusammen überstanden und alles andere was in dieser Zeit so angefallen ist (Details würden eine zweite Doktorarbeit mit dem Thema "Auswirkungen über das Aufeinandertreffen von zwei heißblütigen Dickschädeln mit Migrationshintergrund" erforderlich machen). Unvergessen sind ihre Worte, wenn sie mich wieder einmal abends an der Medizinischen Fakultät abgesetzt hat, weil ich eine meiner Nachtversuchsreihen starten musste, nachdem tagsüber wieder einmal nichts geklappt hatte: "So jetzt arbeite kleiner Serbe! (lol)". Entsprechend endete unserer beider Studium erfolgreich, ich wurde Trauzeuge auf ihrer Hochzeit, durfte eine Hochzeitsrede halten und das darauffolgende Jahr Patenonkel ihrer Tochter Emilia werden, übrigens auch ein Dickkopf, aber ein unheimlich niedlicher. Ein Dank gilt auch meinen besten Freunden Savas und Ulas Tekin (alphabetische Reihenfolge). Die Reise nach Berlin hat zwar meine 8-jährige Ära als Bowling-Gott mit einer Niederlage enden lassen, aber sie hat mir neue Kraft gegeben diese Arbeit endgültig zu beenden. Wir kennen uns seit unserer Zeit auf dem Clauberg-Gymnasium (seit 1992) und damit verbindet uns eine langjährige Freundschaft mit einem unbeschreiblichen Fundament.

## 7. Lebenslauf

### Elvis Pirev

---

Geburtsdatum: 16.05.1982  
Geburtsort: Oberhausen  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: serbisch

### Schullaufbahn

---

1988-1992 Städtische Gemeinschaftsgrundschule in Duisburg-Marxloh  
1992-2001 Clauberg-Gymnasium in Duisburg-Hamborn  
  
06/2001 Abitur am Clauberg-Gymnasium

### Studium

---

10/2001-05/2008 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf  
09/2003 Ärztliche Vorprüfung  
02-08/2004 Wissenschaftliches Forschungshalbjahr im Institut für Molekular-  
biologie und Biochemie I (Leitung: Prof. Dr. Helmut Sies) an der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
02/2007-01/2008 Praktisches Jahr an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
05/2008 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Praktisches Jahr

---

Chirurgie: Klinik für Gefäßchirurgie und Nierentransplantation unter der  
Leitung von Prof. Dr. h.c. W. Sandmann  
Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie unter der  
Leitung von Prof. Dr. W.T. Knoefel  
Neurologie: Neurologische Klinik unter der Leitung von Prof. Dr. H.P. Hartung  
Innere Medizin: Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie unter der  
Leitung von Prof. Dr. B.E. Strauer

## **Praktische Erfahrung**

---

09/2008 bis 09/2012      Assistenzarzt im Fachbereich Neurologie im Johanna-Etienne Krankenhaus in Neuss unter der Leitung von Dr. S. Mohr

07/2010 bis 01/2012      Bereitschaftsdienste als Assistenzarzt im Fachbereich Neurochirurgie im Helios-Klinikum Krefeld

## **Dissertation**

---

Experimentelle Forschung auf dem Gebiet „Zellulärer Stress und seine Auswirkungen auf die zelluläre Zinkhomöostase“ im Institut für Molekularbiologie und Biochemie I (Leitung: Prof. Dr. Helmut Sies), wissenschaftliche Betreuung durch Prof. Dr. rer. nat. Klaus-Dietrich Kröncke

### **Veröffentlichungen:**

E. Pirev, C. Calles, P. Schroeder, H. Sies, K.-D. Kröncke (2008). Ultraviolet-A irradiation but not ultraviolet-B or infrared-A irradiation leads to a disturbed zinc homeostasis in cells;  
**Free Radic. Biol. Med.** 45, 86-91 (Impact-Factor 5,399);

C. Kruczek, B. Görg, V. Keitel, E. Pirev, K.-D. Kröncke, F. Schliess, D. Häussinger (2009). Hypoosmotic swelling affects zinc homeostasis in cultured rat astrocytes;  
**GLIA** 57, 79-92 (Impact-Factor: 4,932);

M. M. Cortese-Krott, M. Münchow, E. Pirev, F. Heßner, A. Bozkurt, P. Uciechowski, N. Pallua, K.-D. Kröncke, C. V. Suschek (2009). Silver ions induce oxidative stress and intracellular zinc release in human skin fibroblasts;  
**Free Radic. Biol. Med.** 47, 1570-1577 (Impact-Factor 6,081);

E. Pirev, Y. Ince, H. Sies, K.-D. Kröncke (2010). Heat shock but not cold shock leads to disturbed intracellular zinc homeostasis.;  
**Journal of Cellular Physiology** 223, 103-109 (Impact-Factor 3,986);

## **Aktivitäten**

---

PJ-Sprecher (02/2007-01/2008)

Assistenzarzt-Sprecher der Neurologischen Abteilung im Johanna-Etienne Krankenhaus (01/2012 bis 09/2012)