

Aus dem Institut für Physiologische Chemie I
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Helmut Sies

**Aktivierung Mitogen-aktivierter Proteinkinasen durch Peroxynitrit:
Abschwächung durch Selensupplementierung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Stefan Michael Schieke

(2002)

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Sies

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Krutmann

Meinen Eltern

“The art of research [is] the art of making difficult problems soluble by devising means of getting at them.“

- Sir Peter Medawar

Besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. Helmut Sies dafür, dass er mir diese Arbeit anvertraute, vor allem aber für seine stete Hilfe, seinen Rat und seine Förderung.

Herrn Professor Dr. Jean Krutmann danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferates.

Priv.-Doz. Dr. Karlis Briviba danke ich herzlich für die Betreuung meiner Arbeit, für die Einweisung in wissenschaftliches Arbeiten, die Diskussion von Ergebnissen und viele wertvolle Tipps für die Zukunft.

Priv.-Doz. Dr. Lars-Oliver Klotz danke ich herzlich für die Einweisung in Methoden, das Korrekturlesen dieser Arbeit und vor allem für die lehrreiche und gewinnbringende Zusammenarbeit.

Prof. Dr. Wilhelm Stahl danke ich für die wertvolle Unterstützung bei der Vorbereitung auf das Promotionskolloquium.

Darius Buchczyk danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Für ausgezeichnetes Arbeitsklima danke ich den noch nicht erwähnten ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Briviba, Dr. Gavin Arteel, Dr. Annika Assmann, Sherry Hsieh, Dr. Hammou Oubrahim, Dr. Corrine Pellieux, Frau Annette Reimann, Dr. Victor Sharov, Dr. Ronald Tamler und Dr. Jens Thiele.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Peroxynitrit, oxidativer und nitrosativer Stress	1
1.2	Selen und Selenoproteine	5
1.3	Schutz vor durch Peroxynitrit induzierter Schädigung	8
1.4	MAP Kinasen und Genregulation	11
1.5	Ziele der Arbeit	15
2.	Material und Methoden	16
2.1	Zellkultur	16
2.2	Toxizitätstest (MTT)	16
2.3	Synthese von Peroxynitrit (ONOO ⁻)	17
2.4	Zellbehandlung mit Peroxynitrit	18
2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	19
2.6	Western-Blotting und Immunanfärbung	20
2.6.1	Elektrotransfer	20
2.6.2	Immunanfärbung	21
2.6.3	Entfernen von Antikörpern von der Membran („Strippen“)	22
2.7	Bestimmung der Glutathionperoxidase-Aktivität	22
3.	Ergebnisse	24
3.1	Aktivierung von MAP Kinasen durch Peroxynitrit	24
3.1.1	Konzentrationsabhängigkeit der Aktivierung von p38	24
3.1.2	Zeitverlauf der Aktivierung von p38, JNK1/2 und ERK1/2	25
3.2	Zytotoxizität von Natriumselenit	26
3.3	Aktivität der Glutathionperoxidase nach Selenitzugabe zum Zellkulturmedium	28
3.4	Effekt von Natriumselenit auf die MAP Kinase-Aktivierung und Proteintyrosin-Nitrierung durch Peroxynitrit	28

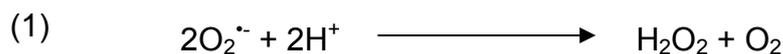
4.	Diskussion	31
4.1	Aktivierung von MAP Kinasen durch Peroxynitrit	31
4.2	Abschwächung der Kinase-Aktivierung und Proteintyrosin-Nitrierung durch Selensupplementierung des Zellkulturmediums	34
5.	Zusammenfassung	36
6.	Literatur	37
7.	Anhang	55

1. Einleitung

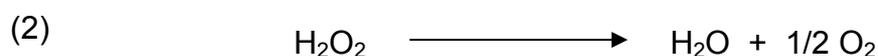
1.1 Peroxynitrit, oxidativer und nitrosativer Stress

Zum Erhalt des lebendigen Organismus ist molekularer Sauerstoff (O_2) erforderlich. In der mitochondrialen Atmungskette wird daraus Energie in Form von ATP, dem hauptsächlichen Energieträger *in vivo*, gewonnen. Dabei wird der Organismus jedoch mit einer schädlichen Form des Sauerstoffs, dem Superoxidanionradikal, konfrontiert (Chance *et al.*, 1979; Sies, 1986). Das Superoxidanionradikal, $O_2^{\cdot-}$, entsteht durch Reduktion von molekularem Sauerstoff. Diese Reaktion findet bei der Atmungskette in den Mitochondrien (Loschen *et al.*, 1974) und bei der Immunabwehr in der Plasmamembran der Phagozyten - katalysiert durch das Enzym NAD(P)H-Oxidase (Babior *et al.*, 1973; Babior, 1999) - statt.

Zum Schutz vor Superoxid-Radikalen dient dem Organismus das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD, McCord & Fridovich, 1969; Übersicht bei Fridovich, 1995). Die Dismutation (1) von $O_2^{\cdot-}$ wird intrazellulär durch die zytosolische Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase (CuZn-SOD) und die mitochondriale Mangan-Superoxid-Dismutase (Mn-SOD) katalysiert. Die extrazelluläre Dismutation von $O_2^{\cdot-}$ wird durch die membranständige, extrazelluläre Form der SOD (EC-SOD) katalysiert.



Das bei dieser Reaktion entstehende Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird durch die Katalase zu Wasser und Sauerstoff umgewandelt (2).



Aufgrund der spontan ablaufenden und durch SOD katalysierten Dismutation wird die Konzentration von $O_2^{\cdot-}$ im pikomolaren Bereich gehalten (Boveris & Cadenas, 1975; Übersicht bei Cadenas & Davies, 2000). Im Rahmen dieser Prozesse entsteht jedoch auch das hochreaktive Hydroxylradikal, $\cdot OH$, in der metallkatalysierten Fentonreaktion (3).



Die erwähnten reaktiven Sauerstoffspezies - $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$ – können zu Lipid-, Protein- und DNA-Schädigung führen.

Im Organismus spielt Stickstoffmonoxid ($\cdot NO$) eine entscheidende Rolle in der Regulation physiologischer und pathologischer Vorgänge.

Stickstoffmonoxid entsteht *in vivo* aus der Aminosäure Arginin, Sauerstoff und NADPH in einer von dem Enzym NO-Synthase (NOS) katalysierten Reaktion, welches in zwei konstitutiven (endotheliale und neuronale cNOS) und einer induzierbaren (iNOS) Form existiert. Diese Isoformen von NOS konnten in zahlreichen Zelltypen im Säugerorganismus nachgewiesen werden, so zum Beispiel in Endothelzellen, Neuronen und Makrophagen. Im Gefäßsystem reguliert $\cdot NO$ den Vasotonus, im Gehirn führt es zu einer Modulation neuronaler Kommunikation und im Immunsystem hat es zytotoxische, tumorizide, antivirale aber auch immunoregulatorische Eigenschaften. Unter pathologischen Bedingungen, z.B. Entzündung, Sepsis, Autoimmunerkrankungen und Ischämie, wird es über eine Aktivitätszunahme der iNOS vermehrt gebildet. Dabei kann die $\cdot NO$ -Konzentration *in vivo* von normalerweise 10-100 nM (Malinski & Taha, 1992) auf Werte bis zu 4 μM (bei Zerebralarterienverschluss) ansteigen (Malinski *et al.*, 1993). Die $\cdot NO$ -Konzentration wird aber nicht nur über die Aktivität der NOS reguliert, sondern auch über die Reaktion mit Oxyhämoglobin. In dieser Reaktion von $\cdot NO$ mit Oxyhämoglobin(Fe^{2+}) entstehen Nitrat und Methämoglobin(Fe^{3+}). Aufgrund der hohen Konzentration von Oxyhämoglobin und der schnellen Reaktion mit $\cdot NO$ stellt dieser Mechanismus einen der hauptsächlichen Reaktionswege von $\cdot NO$ *in vivo* dar (Lancaster, Jr., 1994).

Stickstoffmonoxid und Superoxidanion können jedoch auch miteinander reagieren. Diese Reaktion läuft mit einer sehr hohen Geschwindigkeit ($\sim 7 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$, Huie & Padmaja, 1993) nahezu diffusionskontrolliert ab. Bei der Reaktion der beiden Radikale entsteht Peroxynitrit¹, $ONOO^-$ (4).



¹ Die Bezeichnung Peroxynitrit bezieht sich im Folgenden sowohl auf die anionische Form ($ONOO^-$) sowie auf die konjugierte Säure ($ONOOH$). Die von der IUPAC empfohlenen Namen sind Oxoperoxonitrat(1-) bzw. Hydrogenoxoperoxonitrat.

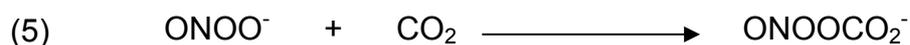
Der Anteil von $O_2^{\cdot-}$, der in dieser Reaktion mit $\cdot NO$ zu Peroxynitrit reagiert, wird dabei durch die Konzentration von $\cdot NO$ bestimmt. Unter Normalbedingungen wird nahezu alles $O_2^{\cdot-}$ trotz der 10fach höheren Geschwindigkeit der Reaktion mit $\cdot NO$ ($k = 2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, Kissner *et al.*, 1997) in der durch die SOD katalysierten Dismutation zu H_2O_2 und O_2 umgesetzt ($k = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, Klug *et al.*, 1972). Dies ist aufgrund der hohen intrazellulären Konzentration von SOD möglich (4–10 μM , Nakano *et al.*, 1990). Steigt die $\cdot NO$ -Konzentration unter pathologischen Bedingungen jedoch an, so reagiert $O_2^{\cdot-}$ zunehmend mit $\cdot NO$ unter Bildung von Peroxynitrit (Koppenol, 1998).

Das Peroxynitritanion ($ONOO^-$) ist bei alkalischem pH stabil. Es zerfällt nur sehr langsam in Nitrit (NO_2^-) und Sauerstoff. Durch Protonierung entsteht die konjugierte Säure, $ONOOH$, $pK_a = 6,8$ (Koppenol *et al.*, 1992), die sehr schnell durch Isomerisierung zu Nitrat (NO_3^-) umgewandelt wird. Bei pH 7,5 und 37°C zerfällt Peroxynitrit zu 30% NO_2^- und 15% O_2 , bei pH 3 entsteht ausschließlich NO_3^- (Pfeiffer *et al.*, 1997). Die Halbwertszeit von Peroxynitrit beträgt in einfachem Puffer bei pH 7,4 und 37°C etwa 0,8 s (Koppenol *et al.*, 1992). In biologischen Systemen ist jedoch aufgrund der hohen Reaktivität von Peroxynitrit mit einer kleineren Halbwertszeit zu rechnen.

Peroxynitrit ist eine stark oxidierende und nitrierende Verbindung (Übersicht bei Beckman, 1996; Murphy *et al.*, 1998). Durch Oxidation kommt es zur Reaktion mit Proteinen (Ischiropoulos & al Mehdi, 1995), Thiolen (Radi *et al.*, 1991a), DNA (Inoue & Kawanishi, 1995) und Lipiden (Radi *et al.*, 1991b). Durch Nitrierung und Nitrosylierung werden die Aminosäuren Tyrosin (Ischiropoulos, 1998) und Tryptophan (Alvarez *et al.*, 1996) bzw. Purine (Skinner *et al.*, 1998) verändert. Die Nitrierung von Tyrosinresten in Proteinen mit der Bildung von 3-Nitrotyrosin wird dabei als biologischer Marker für Peroxynitrit angesehen (Ischiropoulos, 1998). Über diese Mechanismen kann Peroxynitrit in vielfältiger und schädigender Weise in biologische Prozesse eingreifen. Es kommt zur Inaktivierung von Enzymen, z.B. Mn-SOD (MacMillan-Crow *et al.*, 1996), Kreatinkinase (Konorev *et al.*, 1998), Prostazyklinsynthase (Zou & Ullrich, 1996), α -1-Antiproteinase (Moreno & Pryor, 1992), zur DNA-Basenmodifikation mit der Bildung von 8-Hydroxydeoxyguanosin (Inoue & Kawanishi, 1995), zum DNA-Einzel- und -Doppelstrangbruch (Salgo *et al.*, 1995; Szabo *et al.*, 1996), zur Interaktion mit Proteintyrosinkinasen (Kong *et al.*, 1996). Desweiteren ist eine Induktion von Stressgenen, Hämoxxygenase I (Foresti *et al.*, 1999), c-fos (Müller *et al.*, 1997), Mn-SOD (Jackson *et al.*, 1998), und eine

Induktion der Apoptose (Brito *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1998; Virag *et al.*, 1998) beschrieben.

Aufgrund der hohen intrazellulären Konzentration von Thiolen (5-10 mM), hauptsächlich in Form von Glutathion (GSH), kommt es intrazellulär vorwiegend zur Thioloxydation durch Peroxynitrit ($2\text{-}5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) mit der Bildung von Disulfiden (Radi *et al.*, 1991a). Thiole stellen somit eine Möglichkeit der Entgiftung von Peroxynitrit dar. Die extrazelluläre Konzentration von Thiolen ist mit 0,5 mM deutlich kleiner als intrazellulär (Ellman & Lysko, 1979). Im Plasma beträgt die Konzentration von Kohlendioxid (CO_2) und Bikarbonat 1,3 bzw. 26 mM. Bedingt durch die höhere Konzentration von CO_2 und die schnelle Reaktion mit Peroxynitrit ($5,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pH unabhängig) reagiert Peroxynitrit im extrazellulären Milieu bevorzugt mit CO_2 statt mit Thiolen (Lymar & Hurst, 1995; Denicola *et al.*, 1996).



Die dabei entstehende Verbindung, das Nitrosoperoxykarbonatanion² ($\text{ONO}_2\text{CO}_2^-$) zeigt eine erhöhte Fähigkeit zur Nitrierung und zur Ein-Elektronen-Oxidation von Thiolen unter Bildung von Thiylradikalen (Gow *et al.*, 1996; Scorza & Minetti, 1998). Die Zwei-Elektronen-Oxidation ist im Vergleich zu Peroxynitrit vermindert (Denicola *et al.*, 1996). Die Reaktion von Peroxynitrit mit CO_2 stellt somit keine Entgiftung dar. Die neu entstandene Verbindung weist lediglich eine veränderte aber nicht aufgehobene Reaktivität auf.

Im Organismus wird Peroxynitrit von aktivierten Makrophagen (Ischiropoulos *et al.*, 1992), Neutrophilen, Lymphozyten (Gagnon *et al.*, 1998) und Endothelzellen (Kooy & Royall, 1994) gebildet. So spielt Peroxynitrit eine Rolle bei Entzündungsvorgängen in der immunologischen Abwehr von z.B. Bakterien (Zhu *et al.*, 1992). Die Entstehung von Peroxynitrit *in vivo* konnte bei einer Reihe von menschlichen Erkrankungen durch den Nachweis von 3-Nitrotyrosin (durch Immunhistochemie, Western Blot, HPLC, Gaschromatographie) nachgewiesen werden: Atherosklerose, Ischämie-Reperfusion, Sepsis, Transplantatabstoßung, Amyotrophische Lateralsklerose, Multiple Sklerose, Alzheimer Erkrankung usw. (Übersicht bei Ischiropoulos, 1998). Peroxynitrit spielt im Organismus also nicht nur eine protektive Rolle in der

² Der systematische IUPAC Name für das Nitrosoperoxykarbonatanion ($\text{ONO}_2\text{CO}_2^-$) ist 1-Carboxylato-2-nitrosodioxidan.

Immunabwehr sondern ist auch an den pathophysiologischen Vorgängen zahlreicher Erkrankungen beteiligt.

1.2 Selen und Selenoproteine

Neben anderen Spurenelementen wie Kupfer, Mangan oder Zink kommt auch dem Selen (Se) im Organismus eine bedeutende Rolle zu. So kommt es bei Selenmangel zu der in China endemischen Keshan-Krankheit, einer Kardiomyopathie (Yang 1984), Knock-out Mäuse für das Selenocystein tRNA-Gen sterben frühembryonal (Bosl *et al.*, 1997). In Bakterien und im tierischen Organismus findet es sich hauptsächlich in Form von Selenocystein (Sec), der „21. Aminosäure“. Eine weitere organische Form des Selens ist Selenomethionin (SeMet). Dieses findet sich vor allem in Pflanzen- und Getreideprodukten (Allan *et al.*, 1999). In beiden Aminosäuren ist Se an die ursprüngliche Position des Schwefelatoms getreten.

Bei der Synthese von Selenoproteinen wird die Aminosäure Selenocystein spezifisch durch den zellulären Transkriptions- und Translationsapparat in die Polypeptidkette eingebaut. Dabei wird Sec durch das Codon UGA codiert, welches auch als Stop-Codon dient. Im nicht translatierten 3'-Bereich der jeweiligen Selenoprotein-mRNA befindet sich eine Selenocystein-Insertions-Sequenz (SECIS), die durch Ausbildung einer Sekundärhaarnadelstruktur eine Unterscheidung von Stop-UGA und Sec-UGA ermöglicht (Low & Berry, 1996). Die Aminosäure SeMet wird dagegen unspezifisch und zufällig anstelle von normalem Methionin in Proteine eingebaut (Cowie & Cohen, 1957; Sliwkowski & Stadtman, 1985).

Zur Zeit sind 19 eukaryontische Selenoproteine zumindest durch ihre DNA- und Aminosäuresequenzen bekannt (Tabelle 1.1). Alle enthalten Selen in Form von Sec. Das erste Selenoprotein, die zytosolische oder klassische Glutathionperoxidase, wurde 1973 entdeckt (Flohè; Rotruck). Seitdem kam es zur Entdeckung weiterer Proteine, die Sec enthalten, wobei aber bisher für die wenigsten die Funktion endgültig geklärt ist.

Tab. 1.1: Eukaryontische Selenoproteine und deren Funktion

Namen	Abkürzungen	Beeinflussung von/Funktion	Literatur
Glutathionperoxidasen	GPx	Abbau von H ₂ O ₂ , Peroxynitrit, Lipidhydroperoxiden	Brigelius-Flohè, 1999; Sies <i>et al.</i> , 1997
Zytosolische/klassische GPx	cGPx, GPx-1	Antioxidativer Schutz (auch in Mitochondrien), Lipoxygenaseregulation	Brigelius-Flohè, 1999; Esposito <i>et al.</i> , 2000; Flohè <i>et al.</i> , 1973; Rotruck <i>et al.</i> , 1973; Straif <i>et al.</i> , 2000
Gastrointestinale GPx	GI-GPx, GPx-2	Antioxidativer Schutz im Gastrointestinaltrakt	Brigelius-Flohè, 1999; Chu <i>et al.</i> , 1993
Plasma-GPx	pGPx, GPx-3	Antioxidativer Schutz, Beeinflussung der Lipoxygenase/Cyclooxygenase	Brigelius-Flohè, 1999; Takahashi <i>et al.</i> , 1987
Phospholipidhydroperoxid-GPx	PHGPx, GPx-4	Antioxidativer Schutz, Modulation der Leukotrienbiosynthese, der Zytokinsignaltransduktion, der Artherogenese, Spermienreifung	Brigelius-Flohè, 1999; Schuckelt <i>et al.</i> , 1991; Ursini <i>et al.</i> , 1982
Iodothyronideiodinasen			Köhrle, 1999
5'-Deiodinase, Typ I	5'DI-I	Triiodthyroninsynthese	Behne <i>et al.</i> , 1990
5'-Deiodinase, Typ II	5'DI-II	Triiodthyroninsynthese	Davey <i>et al.</i> , 1995
5'-Deiodinase, Typ III	5'DI-III	Abbau von Tri-/Tetraiodtyronin	Croteau <i>et al.</i> , 1995
Thioredoxinreduktasen			
Thioredoxinreduktase	TrxR1	Antioxidativer Schutz, Gentranskription	Arteel <i>et al.</i> , 1999a; Machado <i>et al.</i> , 1997; Tamura & Stadtman, 1996; Thelander & Reichard, 1979
Mitochondriale TR	TrxR2	Abbau von mitochondrialem H ₂ O ₂	Gasdaska <i>et al.</i> , 1999; Lee <i>et al.</i> , 1999; Miranda-Vizuete <i>et al.</i> , 1999
Thioredoxinreduktase-Homologa	SelZf1 SelZf2		Lescure <i>et al.</i> , 1999
Selenophosphatsynthetase-2		Selenoproteinsynthese	Guimaraes <i>et al.</i> , 1996
15-kDa Selenoprotein		Peroxidase-Aktivität	Gladyshev <i>et al.</i> , 1998; Liu <i>et al.</i> , 1999

Selenoprotein P	SelP	Antioxidativer Schutz (Diquat, Peroxynitrit, Phospholipid-hydroperoxid), Schwermetallbindung	Arteel <i>et al.</i> , 1998; Mostert, 2000; Motsenbocker & Tappel, 1982; Yang <i>et al.</i> , 1987
Selenoprotein W	SelW		Vendeland <i>et al.</i> , 1995
Selenoprotein X	SelX		Lescure <i>et al.</i> , 1999
Selenoprotein N	SelN		Lescure <i>et al.</i> , 1999
Selenoprotein R	SelR		Kryukov <i>et al.</i> , 1999
Selenoprotein T	SelT		Kryukov <i>et al.</i> , 1999

Die Expression und Aktivität der Selenoproteine in Zellkulturexperimenten ist abhängig von der Selenkonzentration im Medium. Dabei kommt es mit steigender Konzentration von Se zu einer erhöhten Stabilität der mRNA, zu erhöhten Proteinspiegeln und vor allem zu einer gesteigerten Aktivität von Thioredoxinreduktase, 5'-Deiodinase, Selenoprotein P, zytosolischer Glutathionperoxidase und Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase (Berggren *et al.*, 1997; Gallegos *et al.*, 1997; Gross *et al.*, 1995; Hill *et al.*, 1996a; Brigelius-Flohè *et al.*, 1995). Auch unter *in vivo* Bedingungen im tierischen und menschlichen Organismus lässt sich durch Se-Zufuhr mit der Nahrung die Expression der Selenoproteine P und W erhöhen (Hill *et al.*, 1996b; Persson-Moschos *et al.*, 1998; Yeh *et al.*, 1997).

In einer Reihe von Studien wurde die Bedeutung von Se bei der Prävention von Krebserkrankungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht. In Zellkulturexperimenten konnte eine chemopräventive Bedeutung durch Wachstumsstopp und Apoptoseinduktion in transformierten Zellen nachgewiesen werden (Lu *et al.*, 1995; Kaeck *et al.*, 1997; Sinha & Medina, 1997). In zahlreichen Tiermodellen wurde durch Fütterung von Se eine Krebsprävention erreicht (Ip, 1998; Combs, Jr. & Gray, 1998; El-Bayoumy, 1993; Medina & Morrison, 1988). Clark *et al.* (1996) konnten in einer groß angelegten Studie mit menschlichen Probanden zeigen, dass die Inzidenz und Sterblichkeit an Bronchial-, Kolorektal- und Prostatakarzinomen durch die tägliche Einnahme von 200 µg Selen (in Form von 0,5 g Selenhefe) signifikant gesenkt wurde. Diese chemopräventiven Effekte von Selen sind wahrscheinlich unter anderem auf die Beeinflussung von zellulären Signaltransduktionswegen zurückzuführen. Es konnten zahlreiche Interaktionen mit Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden: Hemmung der Protein Kinase C (PKC)

und c-Jun-NH₂-Terminus Kinase (JNK) (Gopalakrishna *et al.*, 1997a; Gopalakrishna *et al.*, 1997b; Park *et al.*, 2000a), Aktivierung von ERK1/2 (Stapleton *et al.*, 1997), Hemmung der Caspase-3-Aktivität (Park *et al.*, 2000b) und der Bindung von AP-1 und NF-κB an DNA (Handel *et al.*, 1995; Kim & Stadtman, 1997).

1.3 Schutz vor durch Peroxynitrit induzierter Schädigung

Der Organismus ist ständig der schädigenden Wirkung von oxidierenden Verbindungen ausgesetzt. Um den Schaden durch diese Verbindungen zu verhindern oder möglichst klein zu halten, hat die Natur eine Reihe von Strategien entwickelt. Beim Schutz vor Peroxynitrit kann man drei unterschiedliche Phasen unterscheiden: (1) Prävention, (2) Interzeption und (3) Reparatur (Sies, 1993; Arteel *et al.*, 1999b). In der ersten Phase kommt es darauf an, eine Reaktion der beiden Radikale, O₂^{•-} und [•]NO, und damit eine Bildung von Peroxynitrit zu verhindern. Wie schon in Abschnitt 1.1 dargestellt, geschieht dies unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich durch die Aktivität der Superoxid-Dismutasen und durch die Reaktion von [•]NO mit Oxyhämoglobin.

Ist es aber doch zur Bildung von Peroxynitrit gekommen, z.B. in Entzündungsarealen, so muss es in nachfolgenden Reaktionen unschädlich gemacht werden. Hierzu kommen eine Reihe von unterschiedlichen Verbindungen in Frage, die alle mit Peroxynitrit reagieren. Tabelle 1.2 gibt eine Übersicht dieser Verbindungen und Proteine. Angegeben sind neben den Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion mit Peroxynitrit auch bisher beschriebene protektive Effekte.

Tab 1.2: Übersicht über Verbindungen, die mit Peroxynitrit interagieren.
Abkürzungen: DHR, Dihydrorhodamin 123; 4-HPA, 4-Hydroxyphenylazetat

Verbindungen	Reaktion mit Peroxynitrit (Geschwindigkeitskonstante, M ⁻¹ s ⁻¹)	Schutz vor folgenden durch Peroxynitrit induzierten Effekten	Literatur
Selenverbindungen			
Selenit	Reagiert nicht mit Peroxynitrit (indirekter Schutz, s. u.)	Proteintyrosin-Nitrierung, MAPK-Aktivierung, Senkung der Gap Junction-Kommunikation	Briviba <i>et al.</i> , 1996; Schieke <i>et al.</i> , 1999; Sharov <i>et al.</i> , 1999

Ebselen	2×10^6	DHR-Oxidation, 4-HPA-Nitrierung, DNA-Einzelstrangbruch	Masumoto & Sies, 1996; Masumoto <i>et al.</i> , 1996; Roussyn <i>et al.</i> , 1996
Selenomethionin	$2,4 \times 10^3$	DHR-Oxidation, 4-HPANitrierung, DNA-Einzelstrangbruch	Assmann <i>et al.</i> , 1998; Briviba <i>et al.</i> , 1996; Padmaja <i>et al.</i> , 1996; Roussyn <i>et al.</i> , 1996
Selenocystin		DHR-Oxidation, 4-HPA-Nitrierung, DNA-Einzelstrangbruch	Briviba <i>et al.</i> , 1996; Roussyn <i>et al.</i> , 1996
GPx	8×10^6	DHR-Oxidation, Benzoat-Hydroxylierung, Proteintyrosin-Nitrierung	Briviba <i>et al.</i> , 1998a; Sies <i>et al.</i> , 1997
SelP		Benzoat-Hydroxylierung, Proteintyrosin-Nitrierung	Arteel <i>et al.</i> , 1998
TrxR		Benzoat-Hydroxylierung	Arteel <i>et al.</i> , 1999a
Organotelluride		DHR-Oxidation, Benzoat-Hydroxylierung, Proteintyrosin-Nitrierung	Briviba <i>et al.</i> , 1998b
Fe-, Mn-Porphyrine	$2,2 \times 10^6 - 1,8 \times 10^7$	Nitrierung, Zytotoxizität	Ferrer-Sueta <i>et al.</i> , 1999; Misko <i>et al.</i> , 1998; Stern <i>et al.</i> , 1996
Hämoglobin	$2,5 \times 10^4$		Alayash <i>et al.</i> , 1998; Kondo <i>et al.</i> , 1997
Myeloperoxidase	$4,8 \times 10^6$	Verstärkte Proteintyrosin-Nitrierung	Floris <i>et al.</i> , 1993; Sampson <i>et al.</i> , 1998
Albumin	$5,6 \times 10^3$		Radi <i>et al.</i> , 1991a
Glutathion	$5,8 \times 10^2$		Quijano <i>et al.</i> , 1997
Ascorbat	5×10^1	DHR-/NADH-Oxidation, Tyrosin-Nitrierung, Enzyminaktivierung (α_1 -Antiproteinase)	Bartlett <i>et al.</i> , 1995; Kirsch & de Groot, 2000; Whiteman & Halliwell, 1996
Polyphenole		DHR-Oxidation, Tyrosin-Nitrierung	Arteel & Sies, 1999; Arteel <i>et al.</i> , 2000
Ubichinol		Proteintyrosin-Nitrierung, Mitochondrienschädigung	Schöpfer <i>et al.</i> , 2000

Eine sehr effektive Möglichkeit zur Entgiftung von Peroxynitrit stellen Selenoproteine dar. Die bisher beschriebene Funktion der Glutathionperoxidase besteht in dem Abbau von Hydroperoxiden (ROOH) zu den entsprechenden Alkoholen (ROH). Analog dazu kann in einer schnell ablaufenden Reaktion ($k = 8 \times 10^6$, Briviba *et al.*, 1998a) Peroxynitrit zu Nitrit reduziert und damit unschädlich gemacht werden (Abb.

1.1). Das Recycling des Selen im aktiven Zentrum der GPx geschieht über eine Oxidation von Glutathion (GSH) zu Glutathiondisulfid (GSSG).

Die Glutathionperoxidase erfüllt somit neben der bekannten Funktion einer Hydroperoxidreduktase die einer Peroxynitritreduktase (Sies *et al.*, 1997).

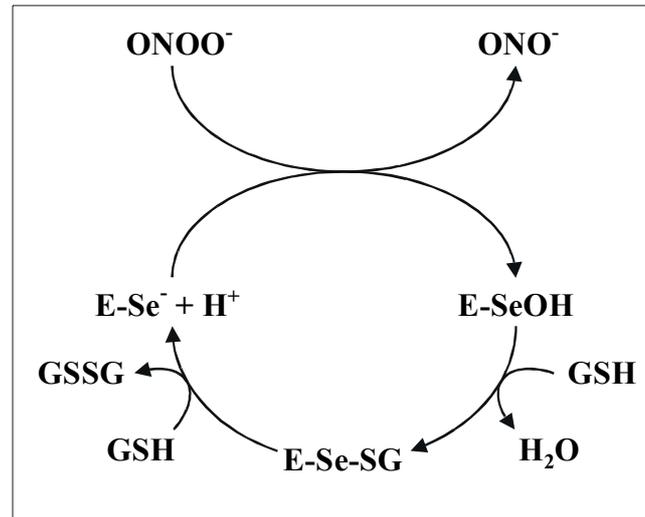


Abb. 1.1: Katalytischer Mechanismus der Reduktion von Peroxynitrit zu Nitrit durch Selenoperoxidasen (Sies *et al.*, 1997). Der dargestellte Reaktionsmechanismus entspricht dem von Ebselen mit Peroxynitrit (Sies & Masumoto, 1997).

Desweiteren konnte ein Schutz vor Peroxynitrit durch Selenoprotein P (Arteel *et al.*, 1998) und Thioredoxinreduktase (Arteel *et al.*, 1999a) nachgewiesen werden. Auch niedermolekulare organische Substanzen wie Selenomethionin, Selenocystin und Ebselen zeigen durch ihre Reaktion mit Peroxynitrit einen protektiven Effekt, z.B. Verhinderung von DNA-Strangbrüchen (Roussyn *et al.*, 1996). Für Ebselen ließ sich in Tierversuchen und klinischen Studien ein neuroprotektiver Effekt bei zerebraler Ischämie bzw. Infarkt zeigen (Saito *et al.*, 1998; Yamaguchi *et al.*, 1998). Dieser protektive Effekt ist möglicherweise über eine Reaktion mit Peroxynitrit zu erklären, das in ischämischem Gewebe entsteht. Selenverbindungen spielen somit durch ihre schnelle Reaktion mit Peroxynitrit und ihr ubiquitäres Vorkommen im Organismus eine bedeutende Rolle im Schutz vor durch Peroxynitrit induzierter Schädigung.

Daneben gibt es auch noch eine Reihe von anderen Substanzen, u.a. Ascorbat, Polyphenole, und Telluride, die einen Schutz durch ihre Reaktion mit Peroxynitrit

bieten (s. Tabelle 1.2). Somit verfügt der Organismus über eine Reihe von Möglichkeiten, sich gegen die schädlichen Effekte von Peroxynitrit zu schützen.

1.4 MAP Kinasen und Genregulation

Als Teil der zellulären Antwort auf externe Stimuli kommt es zu einer Aktivierung von Signaltransduktionswegen. Bei den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) handelt es sich um Serin-/Threonin-Proteinkinasen, die sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Proteine phosphorylieren können. Über diesen Mechanismus können sie zahlreiche zelluläre Vorgänge wie z.B. die Gentranskription regulieren (Übersicht bei Whitmarsh & Davis, 1996).

Die klassischen Mitogen-aktivierten Proteinkinasen sind die extrazellulär-regulierten Kinasen (ERK1 und ERK2, Cobb *et al.*, 1991). Sie werden durch Wachstumsfaktoren und Serumschock aktiviert. Dabei erfolgt die Aktivierung durch doppelt-spezifische Kinasen, MKK1/2, die sowohl Serin-/Threoninreste als auch Tyrosinreste phosphorylieren können.

Tab. 1.3: Nomenklatur von MAP Kinasen und MAP Kinasen Kinasen (Cohen, 1997)

Gruppe	In dieser Arbeit verwendete Bezeichnung	Alternativbezeichnungen
ERK	ERK1	MAPK 1, p44 MAPK
	ERK2	MAPK 2, p42 MAPK
JNK	JNK1	SAPK1c; SAPK γ
	JNK2	SAPK1a; SAPK α
	JNK3	SAPK1b; SAPK β
p38	p38 α	SAPK2a; CSBP; RK; Mpk2; Mxi2
	p38 β	SAPK2b
	p38 γ	SAPK3; ERK6
	p38 δ	-
MKK	MKK1	MEK1; MAPKK1
	MKK2	MEK2; MAPKK2
	MKK3	SKK2; SAPKK2
	MKK4	JNKK; SKK1; SEK1; SAPKK1
	MKK6	SKK3; MEK6; SAPKK3
	MKK7	SKK4; SAPKK4; SAPKK5

Nach Phosphorylierung von Thr und Tyr im Thr-Glu-Tyr-Motiv kommt es zu einer Translokation von ERK in den Zellkern, wo sie Transkriptionsfaktoren an Serin-/Threoninresten gefolgt von Prolin phosphorylieren und dadurch aktivieren (Abb. 1.2). Aufgrund dieser Eigenschaft spricht man von „Prolin-gerichteten“ Kinasen. Diese spezifische Art der Substraterkennung weisen auch die anderen erwähnten MAP Kinasen auf.

Eine weitere Unterfamilie der MAPK sind die c-Jun-NH₂-Terminus Kinasen (JNK) (Ip & Davis, 1998). Es sind drei Gene bekannt, die für die beim Menschen beschriebenen Proteine JNK1/2/3 kodieren (Gupta *et al.*, 1996). Aufgrund ihrer Aktivierbarkeit durch Cycloheximid-Injektion, die zu ihrer Entdeckung geführt hat (Kyriakis & Avruch, 1990), UV und Hitzeschock werden sie auch alternativ als Stress-aktivierbare Proteinkinase (SAPK) bezeichnet (Kyriakis *et al.*, 1994) (Tab. 1.3).

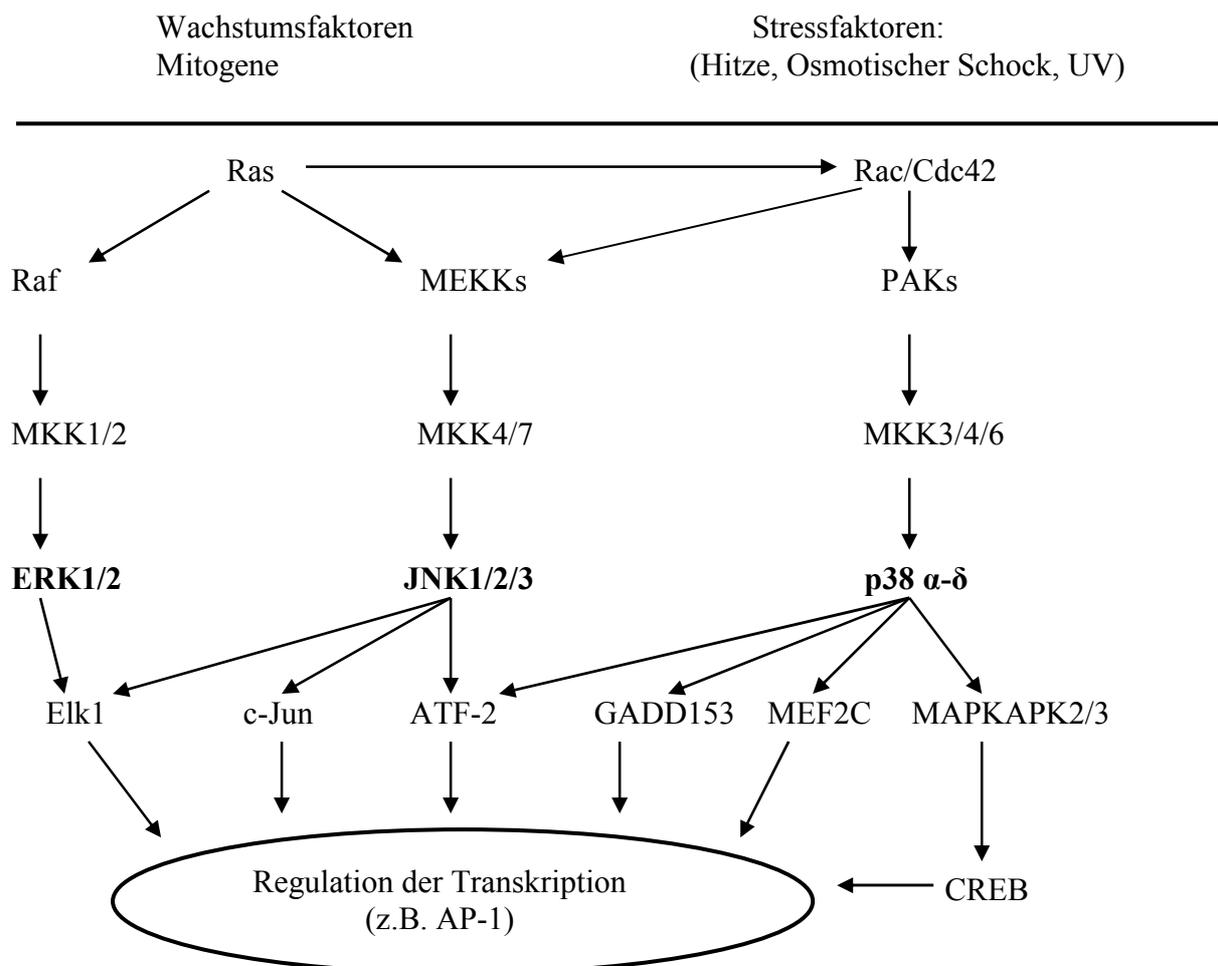


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der MAPK-Signaltransduktionswege. Erläuterungen s. Text

Die Aktivierung erfolgt durch die Phosphorylierung von Thr/Tyr im Thr-Pro-Tyr-Motiv durch die doppelt spezifischen Kinasen MKK 4/7. Nach Translokation in den Zellkern kommt es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren.

Ebenfalls durch zelluläre Stressfaktoren aktiviert wird die p38-MAPK-Unterfamilie. Sie ist durch Hyperosmolarität, Lipopolysaccharid, inflammatorische Zytokine (IL-1, TNF α) und UV aktivierbar (Han *et al.*, 1994; Raingeaud *et al.*, 1995). Daher werden p38-MAPK alternativ ebenfalls den SAPK zugerechnet. Die doppelt spezifischen Kinasen MKK3/4/6 setzen am Phosphorylierungsmotiv Thr-Gly-Tyr an und aktivieren p38-MAPK, welche im Kern Transkriptionsfaktoren aktivieren.

Die durch ERK1/2, JNK1/2/3 und p38 α - δ aktivierten Transkriptionsfaktoren, cJun, Elk1, ATF2, MEF2C u.a., sind an der Regulation der Expression der beiden Protoonkogene c-jun und c-fos beteiligt, deren Proteinprodukte, c-Jun und c-Fos, als Heterodimer die klassische Form des Transkriptionsfaktors AP-1 bilden (Abb. 1.3, Übersicht bei Karin, 1995 und Whitmarsh & Davis, 1996).

In der Promotrregion des c-jun Gens befinden sich als regulatorische Elemente zwei Tetradeconoyl-Phorbolacetat (TPA)-responsive Elemente, Jun1 und Jun2, die konstitutiv c-Jun/ATF2-Heterodimere binden. Nach zweifacher Phosphorylierung durch JNK und p38 führen sie zu einer Aktivierung der Transkription. Ein weiteres regulatorisches Element in der Promotorregion ist die Bindungsstelle für die Transkriptionsfaktoren der MEF2-Familie. MEF2C wird in Makrophagen nach LPS-Stimulation durch p38 phosphoryliert und führt zur Induktion der c-Jun-Expression. Der c-fos-Promotor besitzt als regulatorische Elemente u.a. ein Serum-responsives Element (SRE) und ein cAMP-responsives Element (CRE). Das c-fos-SRE bindet einen ternären Komplex bestehend aus einem Serumresponsivfaktor (SRF)-Homodimer und einem Ternärkomplexfaktor (TCF), Elk1, Sap-1 oder Sap-2. Nach Phosphorylierung führt dieser Komplex zu einer Aktivierung der Transkription. Das c-fos-CRE bindet ein Homodimer aus CRE-Bindeprotein (CREB), das durch Phosphorylierung durch p108-CREB Kinase und MAP Kinase-aktivierte Proteinkinase 2 (MAPKAPK2) Transaktivierungsaktivität erlangt.

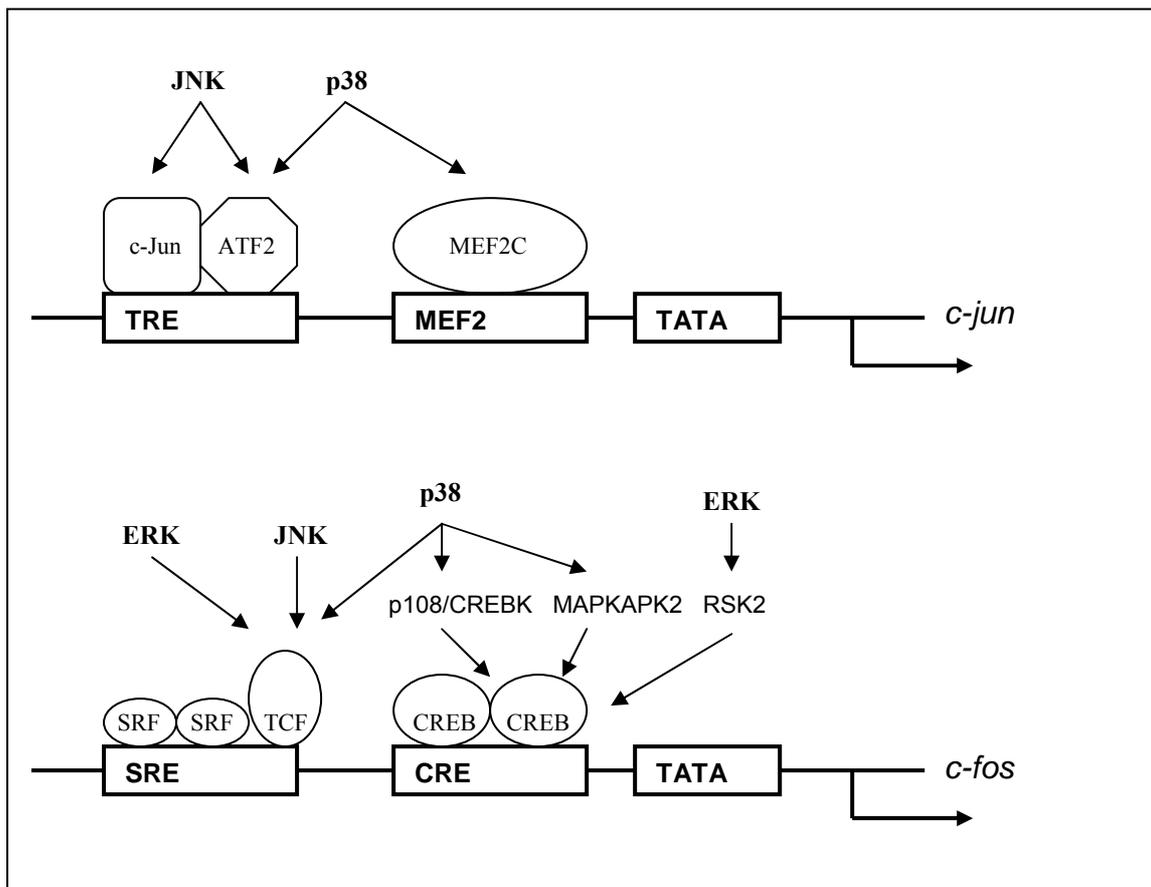


Abb. 1.3: Transkriptionsregulation der *c-jun* und *c-fos* Gene durch MAP Kinasen.

Abkürzungen: CRE, cAMP-responsives Element; CREB, CRE-Bindeprotein; CREBK, CREB-Kinase; MAPKAPK2, MAP Kinase-aktivierte Proteinkinase 2; RSK2, Ribosomalprotein S6 Kinase 2; SRE, Serum-responsives Element; SRF, Serumresponsivfaktor; TATA, TATA-Box; TCF, Ternärkomplexfaktor; TRE, TPA-responsives Element. Nach Minden & Karin, 1997; Whitmarsh & Davis, 1996.

Für diese Signaltransduktionswege wurden zahlreiche Aktivatoren beschrieben. Neben den bereits erwähnten, wie Wachstumsfaktoren, proinflammatorischen Zytokinen, UV, osmotischem Schock, wurde auch für reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies eine aktivierende Wirkung beschrieben. So führen Superoxid, Stickstoffmonoxid, Wasserstoffperoxid zur Aktivierung der MAP Kinasen (Baas & Berk, 1995; Lander *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998). Für $\cdot\text{NO}$ und H_2O_2 wurde eine Induktion von *c-fos* und *c-jun* nachgewiesen (Janssen *et al.*, 1997), ONOO^- führt zu gesteigerter *c-Fos*-Expression (Müller *et al.*, 1997).

1.5 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte der Effekt von Peroxynitrit auf die Signaltransduktionswege in Zellkultur untersucht werden. Um bei den Experimenten unphysiologisch starke Konzentrationsänderungen von Peroxynitrit zu vermeiden, sollte ein Infusionssystem entwickelt werden, mit dem eine Fließgleichgewichtskonzentration von Peroxynitrit einstellbar wurde. Zellkulturexperimente in diesem System hatten zum Ziel, eine mögliche Aktivierbarkeit der MAP Kinasen durch Peroxynitrit, eine stark oxidierende und nitrierende Verbindung, herauszufinden. Die MAP Kinasen stellen zelluläre Signalwege dar, für die eine Aktivierung durch Wachstumsfaktoren, UV-Strahlung oder osmotischen Schock und auch durch reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies (z.B. Stickstoffmonoxid und Wasserstoffperoxid) bekannt ist.

Für Selenoproteine ist bereits gezeigt, dass sie einen Schutz vor Peroxynitrit bieten. So kann die Glutathionperoxidase (GPx) als zelluläres Selenoprotein Peroxynitrit unter Verbrauch von Glutathion zu Nitrit reduzieren und damit unschädlich machen. In der vorliegenden Arbeit sollte daher weiterhin ermittelt werden, ob die durch erhöhte Selenkonzentration im Kulturmedium gesteigerte Expression und Aktivität von Selenoproteinen Schutz vor einer möglichen MAP Kinase-Aktivierung durch Peroxynitrit bietet.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

WB-F344 Rattenleberepithelzellen wurden von Dr. I.A. Cotgreave und Dr. L. Wärngård, Institut für Umweltmedizin, Karolinska Institut (Stockholm, Schweden), bezogen. Die Zellen wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM, Sigma, München) unter Zusatz von (Endkonzentrationen) hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS, 10 % (v/v); Biochrom/Seromed, Berlin, und Greiner, Frickenhausen), L-Glutamin (2 mM), Streptomycin (20 mg/l) und Penicillin (20000 IU/l) kultiviert. Etwa 2 Tage nach Aussäen wurden die Zellen bei einer 80-100%igen Konfluenz trypsinisiert und gesplittet.

Für Gefrierkulturen wurden Zellen in 1 ml Gefriermedium (90% FCS, 10% DMSO) suspendiert, eingefroren und bei -80°C gehalten.

Die Zugabe von Natriumselenit (1 µM Endkonzentration) zum Kulturmedium erfolgte 48 h vor der Zellbehandlung. Unspezifische Hintergrundaktivierung der MAPK (ERK) als Reaktion auf Wachstumsfaktoren im Serum wurde durch ein 24-stündiges Aushungern der 80-90% konfluenten Zellen in serumfreiem Medium mit ansonsten gleicher Zusammensetzung verringert.

2.2 Toxizitätsmessung (MTT-Test)

Die Messung der Vitalität erfolgte mittels des MTT-Reduktionstests (Carmichael et al., 1987). Grundlage dieses Tests ist die Fähigkeit vitaler Zellen zur Reduktion von MTT (3-[4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) zum entsprechenden blauen Formazan aufgrund mitochondrialer und mikrosomaler Dehydrogenaseaktivität (Berridge et al., 1996). Vor Behandlung wurden die Zellen in 24-well Platten bis zu 80-90%iger Konfluenz herangezogen; 48 h nach Behandlung wurde das Medium entfernt, die Zellen gewaschen und mit 200 µl MTT (0,5 mg/ml in Medium) für etwa 2 h im Brutschrank inkubiert. Die Reaktion wurde durch den Zusatz von 200 µl/well 0,1% (w/v) HCl / 10% (w/v) SDS gestoppt und die Zellen lysiert. Als Negativkontrolle diente eine Lösung aus gleichen Teilen MTT und HCl/SDS. Zur Solubilisierung des Präzipitates wurden die Platten über Nacht im Brutschrank

inkubiert. Danach wurde jeweils die Extinktion bei 570 nm gemessen. Als Hintergrundkontrolle für Präzipitat und Bläschen diente die Messung der Absorption bei 690 nm. Zur Berechnung der Vitalität wurde die Hintergrundabsorption von der Absorption bei 570 nm abgezogen. Bei unbehandelten Kontrollzellen wurde die Differenz $A_{570\text{nm}} - A_{690\text{nm}} = 1$ (Vitalität 100%) gesetzt, bei der Negativkontrolle wurde $A_{570\text{nm}} - A_{690\text{nm}} = 0$ (keine Vitalität) gesetzt.

2.3 Synthese von Peroxynitrit (ONOO^-)

Die Synthese von Peroxynitrit (ONOO^-) erfolgte in einem sogenannten „Quenched-flow-Reaktor“ (Koppenol et al., 1992), wobei Wasserstoffperoxid / Salzsäure (0,6 M H_2O_2 / 0,7 M HCl) und Natriumnitrit (0,6 M) durch ein Pumpensystem in einem T-Stück miteinander vermischt und die entstehende Säure (ONOOH) in 1,2 M NaOH geleitet wird, bei deren pH-Wert das stabilere Peroxynitritanion (ONOO^-) entsteht (Abb. 2.1).

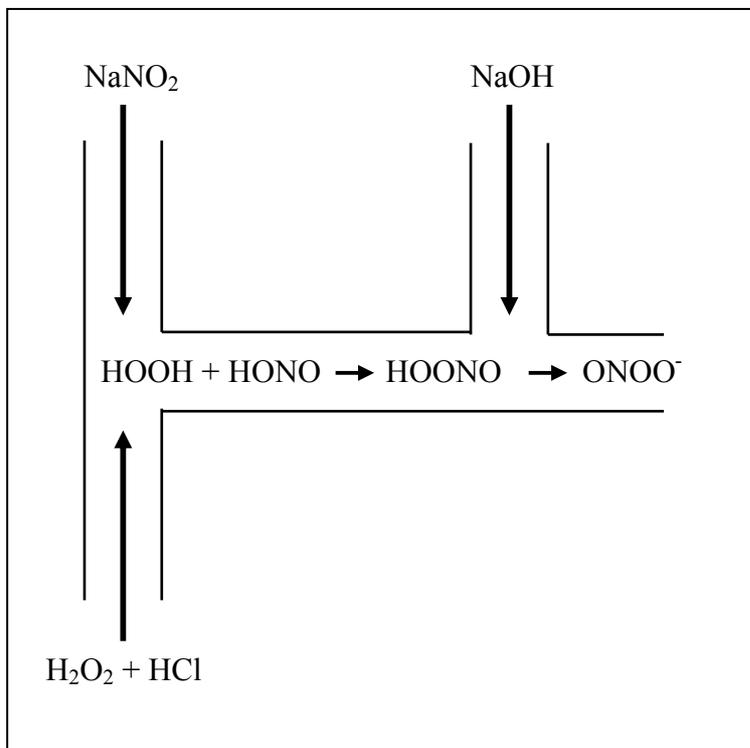


Abb. 2.1: Peroxynitritsynthese im „Quenched-flow-Reaktor“.
(Modifiziert nach Beckman et al., 1994)

Zur Zersetzung des überschüssigen H_2O_2 wird Mangandioxid (MnO_2) hinzugegeben. Mit diesem Syntheseverfahren kann eine Peroxynitritkonzentration von ca. 80-90 mM erreicht werden. Die Peroxynitritlösung wird bei -20 bis -80°C eingefroren. Dabei lagert sich eine flüssige Schicht tiefgelben, hochkonzentrierten Peroxynitrits auf der gefrorenen Lösung ab. Durch anschließendes fraktioniertes Auftauen lässt sich eine Steigerung der Konzentration auf bis zu 300 mM erreichen. Bei -80°C ist diese Peroxynitritlösung für einige Monate haltbar. Durch langsamen, spontanen Zerfall in alkalischer Lösung entstehen dabei zunehmende Mengen von Nitrit (NO_2^-) und Sauerstoff. Daneben enthält die Lösung signifikante Mengen an Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Nitrat und Wasserstoffperoxid. Diese Kontamination und der hohe pH-Wert werden in Kontrollversuchen durch Einsatz zerfallenen Peroxynitrits berücksichtigt. Dafür wird der Peroxynitritlösung 37%ige Salzsäure zugesetzt und nach vollständigem Zerfall der alkalische pH durch Zugabe äquimolarer Menge Natronlauge wiederhergestellt. Die Konzentration von Peroxynitrit wird nach 100- bis 1000facher Verdünnung in 0,1% (w/v) NaOH spektrophotometrisch als Extinktion bei 302 nm gemessen ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Hughes & Nicklin, 1968).

2.4 Zellbehandlung mit Peroxynitrit

Zu behandelnde Zellen wurden in 30 mm-Schalen zu etwa 80-90% Konfluenz herangezogen, mit PBS gewaschen und für weitere 24 h in serumfreiem Medium gehalten. Vor Behandlungen wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Kulturschalen wurden mit der Öffnung nach unten in einem Zylinder fixiert, der 750 ml PBS (pH 7,2; Raumtemperatur) enthielt (Abbildung 2.2). Peroxynitrit (120 mM) wurde mit einer Mikropumpe ca. 5 mm unterhalb der Kulturschalen mit einer Rate von 1 ml/min in den Zylinder infundiert. Die Infusion lief unter ständigem Rühren zur besseren Verteilung des Peroxynitrit im PBS ab. Bei einer Infusionsdauer von 3 min ergab sich dabei eine kumulative Konzentration von $480 \mu\text{M}$ bei einer Peroxynitritinfusionsrate (v) von $2,67 \mu\text{M/s}$. Unter Einbeziehung der Zerfallsrate (K_d) von Peroxynitrit in Phosphatpuffer bei 25°C , pH 7,4 von $0,41 \text{ s}^{-1}$ (Denicola et al., 1996) lässt sich eine Fließgleichgewichtskonzentration von $6,5 \mu\text{M}$ errechnen:

$$d[\text{ONOO}^-] / dt = v - K_d[\text{ONOO}^-] = 0$$

$$[\text{ONOO}^-] = v/K_d = 2,67 \mu\text{M} \times \text{s}^{-1} / 0,41 \text{s}^{-1} \approx 6,5 \mu\text{M}.$$

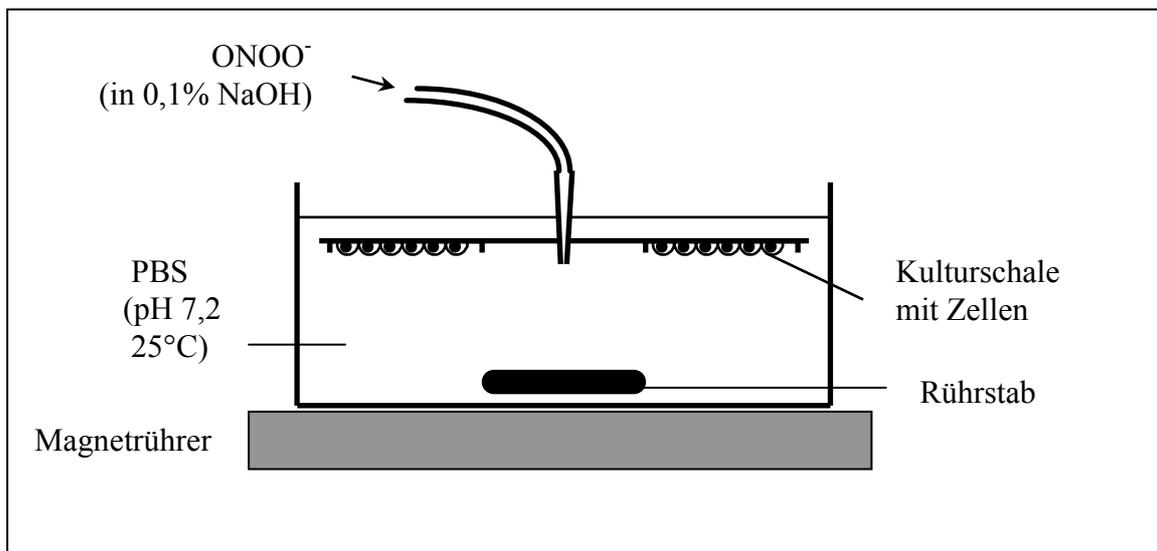


Abb. 2.2: Infusionsapparatur zur Behandlung von Zellen mit Peroxynitrit. Peroxynitrit wurde mit einer Rate von 1 ml/min für 3 min unter ständigem Rühren infundiert, wodurch sich eine Fließgleichgewichtskonzentration ergab (Berechnung s. Text, Schieke et al., 1999).

Für niedrigere Konzentrationen wurde die Peroxynitritstammlösung in 0,1% (w/v) NaOH verdünnt. Die Behandlung der Zellen dauerte jeweils 3 min. Die Infusion von Peroxynitrit mit einer resultierenden Fließgleichgewichtskonzentration von 1,6 μM oder niedriger führte zu keiner messbaren pH-Änderung. Bei einer Fließgleichgewichtskonzentration von 6,5 μM stieg der pH-Wert auf 7,7 an. Der Effekt dieses pH-Anstieges wurde mit dem Einsatz zerfallenen Peroxynitrits kontrolliert (s. o.).

2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse des Proteinbestandes der Zellen werden diese mit doppelt konzentriertem SDS-PAGE-Ladepuffer (in doppelt konzentrierter Form (2x) ist dessen Zusammensetzung: 125 mM Tris, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerin, 100 mM

DTT, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8) lysiert, die Proben dann zur Denaturierung der zähflüssigen DNA und aller Proteine für 3-5 min gekocht und schließlich zur Lagerung eingefroren. Zur Auftragung auf das aus Sammel- und Trenngel bestehende SDS-Polyacrylamidgel werden die aufgetauten Proben noch einmal für 2-3 min erhitzt. Die Zusammensetzung der eingesetzten SDS-Polyacrylamid-Gele folgte den Angaben von Laemmli (1970):

Trenngel (12% Acrylamid): 4%(v/v) Sol 1, 2,5% (v/v) Sol 2, 3,5% (v/v) H₂O, 7×10^{-3} % (v/v) APS, 7×10^{-4} % (v/v) N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin (TEMED); Sammelgel (4% Acrylamid): 1,34% (v/v) Sol 1, 3% (v/v) Sol 3, 5,66% (v/v) H₂O, $7,5 \times 10^{-3}$ % (v/v) APS, $7,5 \times 10^{-4}$ % (v/v) TEMED.

Zusammensetzung der einzelnen Lösungen: Sol 1: 30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid; Sol 2: 0,4 % (w/v) SDS, 1,5 M Tris (8 mM EDTA), pH 8,8; Sol 3: 0,4 % (w/v) SDS, 1,5 M Tris (8 mM EDTA), pH 6,8; Elektrodenpuffer: 0,2 M Glycin, 0,1 M Tris, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,8; APS: 10-12% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat.

Nach Elektrophorese werden die Proteine im Gel entweder angefärbt oder auf eine Membran elektrotransferiert (s. Abschnitt 2.6.). Zur Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue werden die Proteine im Gel durch Schwenken in einer Lösung aus 0,1% (w/v) Coomassie Serva Blue R in 10% (v/v) Eisessig, 30-40% (v/v) Methanol oder Ethanol und 50-60 % Wasser für 15-30 min fixiert und angefärbt. Überschüssiger Farbstoff wird durch Schwenken des Gels in Entfärberlösung (10% (v/v) Eisessig, 30% (v/v) Ethanol oder Methanol) entfernt.

2.6 Western Blotting und Immunanfärbung

2.6.1 Elektrotransfer

Nach Elektrophorese wird das zu blottende Gel kurz in Transferpuffer (25 mM Tris; 0,2 M Glycin; 20% (v/v) Methanol; pH 8,5) äquilibriert und zusammen mit in Gelgröße zurechtgeschnittenen und in Transferpuffer genässten 3 mm-Blottingpapieren (Schleicher & Schuell, Dassel) sowie gleichermaßen behandelte Nitrocellulosemembran (Hybond ECL, Amersham, Braunschweig) zum Blottingaufbau zusammengestellt (Abb. 2.3): Drei Blottingpapiere werden luftblasenfrei auf die Anode gebracht, gefolgt von Membran, Gel und zwei weiteren

Blottingpapieren. Der Elektrotransfer wurde bei ca. 60-100 mA je Minigel für 60-90 min (Richtwert: $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 1-2 h, die Spannung übersteigt hierbei keine 15 V) in einer Pharmacia-Multiphor-Kammer (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt.

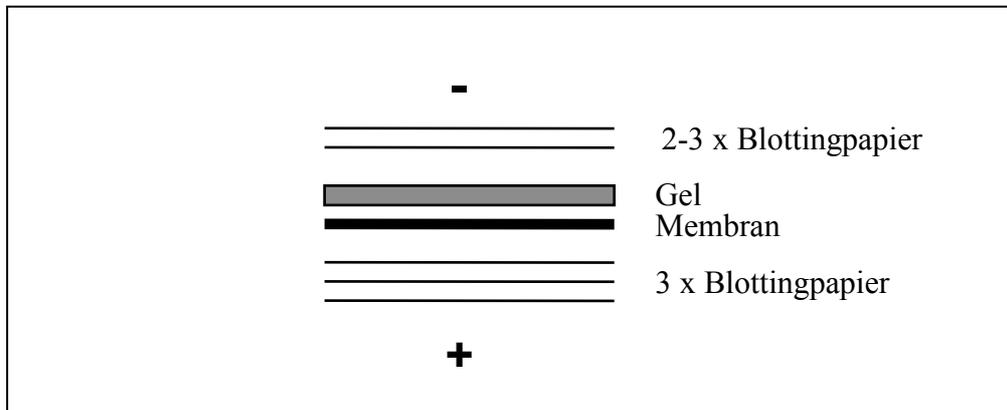


Abb. 2.3: Schematischer Aufbau einer Elektrotransfereinheit für Western Blotting.

Zur Kontrolle auf erfolgreichen Transfer wird die Membran nach Blot für 1 min in essigsaurer Ponceau S-Lösung (0,1% (w/v) Ponceau S in 5% (v/v) Essigsäure) geschwenkt und dann in Wasser entfärbt. Proteinspuren und -banden werden rot sichtbar.

2.6.2 Immunanfärbung

Nachweis der MAPK-Phosphorylierung

Auf den Elektrobplot folgt ein kurzes Waschen der Membran in TBST (TBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6) + 0,1% (v/v) Tween-20). Die Membran wird nun für 1-3 h bei Raumtemperatur in Blockierpuffer (5% (w/v) Magermilchpulver (z.B. Glücksklee, Nestlé) in TBST) geschwenkt, gefolgt von Inkubation mit in Blockierpuffer verdünntem (1:1000) primären Antikörper über Nacht bei 4°C . Die Immunanfärbung von phosphoryliertem p38 erfolgt mit polyklonalen anti-phospho-p38 Antikörpern (New England Biolabs, Schwalbach), von phospho-JNK1/2 und phospho-ERK1/2 mit polyklonalen anti-active-JNK und anti-active-MAPK Antikörpern (Promega, Mannheim). Nach dreimaligem Waschen mit TBST (je 5-10 min) wird für 1-2 h bei

Raumtemperatur mit in Blockierpuffer verdünntem (1:1000) meerrettichperoxidasegekoppelten sekundären anti-Kaninchen Antikörper (Cappel/ICN, Eschwege) inkubiert. Nachweis gebundener Antikörper über Chemilumineszenz erfolgt mit einem kommerziellen Kit, LumiGlo (New England Biolabs, Schwalbach).

Nachweis von 3-Nitrotyrosin

Zum Nachweis von proteingebundenem 3-Nitrotyrosin wird ein monoklonaler anti-Nitrotyrosin Antikörper (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) in einer 1:1000-Verdünnung in Blockierpuffer eingesetzt. Als sekundärer Antikörper dient ein meerrettichperoxidasegekoppelter anti-Maus Antikörper (Cappel/ICN, Eschwege) in der Verdünnung 1:1000.

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

Zum Entfernen von Antikörpern von der Nitrocellulosemembran zum Zwecke des Detektierens anderer Proteine mit neuen Antikörpern wird die Membran für 30 min im Wasserbad bei 55°C in Stripping-Puffer (100 mM β -Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS, 62,5 mM Tris, pH 6,8) geschwenkt. Danach wird 2-3 Male für ca. 10 min in großen Volumina von TBST bei Raumtemperatur gewaschen und mit dem Blockierungsschritt für die neue Immunanfärbung begonnen. Anschließend erfolgt die Inkubation mit anti-total-p38 (New England Biolabs, Schwalbach) oder anti-total-JNK2 Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Die nachfolgenden Schritte entsprechen dem in Abschnitt 2.6.2 beschriebenen Ablauf. Da mit dem Strippen auch geblottetes Protein verlorenght, sollte zunächst immer das in vermutlich geringeren Mengen vorliegende Antigen nachgewiesen werden.

2.7 Bestimmung der Glutathionperoxidase-Aktivität

Die Aktivität der Glutathionperoxidase (GPx) wurde aus Lysaten von WB-F344 Leberepithelzellen bestimmt. Die Zellen wurden abtrypsinisiert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer resuspendiert. Die Lysate wurden auf Eis gehalten, sonifiziert und abzentrifugiert. Die so gewonnenen

Überstände wurden bei -20°C bis zur Bearbeitung eingefroren. Der Proteingehalt wurde mit dem Assay nach Bradford (1976) der Firma BioRad, München, ermittelt. Die Messung der GPx-Aktivität in den Lysaten erfolgte in leicht modifizierter Weise nach der von Roveri et al. (1994) und Flohè and Günzler (1985) beschriebenen Methode. Der Testansatz enthielt 1 mM GSH, 1mM Diethyltriaminpentaessigsäure, GSSG Reduktase (0,6 U/ml) und 0,1 mM NADPH in 0,1 mM Natriumphosphat, pH 7,3. Nach Zugabe der Lysatprobe bei Raumtemperatur erfolgte eine Hintergrundmessung der unspezifischen NADPH-Oxidation für eine Minute. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,2 mM tert-Butylhydroperoxid gestartet. Durch Messung der oxidationsbedingten Abnahme von NADPH ($\Delta[\text{NADPH}]/\text{min}$) bei 340 nm und Subtraktion der unspezifischen Oxidation erfolgte die Berechnung der Enzymaktivität in $\mu\text{M} \times \text{Min}^{-1}$ pro mg Protein.

3. Ergebnisse

3.1 Aktivierung von MAP Kinasen durch Peroxynitrit

3.1.1 Konzentrationsabhängigkeit der Aktivierung von p38

Die Halbwertszeit von Peroxynitrit unter physiologischen Bedingungen (37°C, pH 7,4) beträgt etwa 0,8 s (Koppenol *et al.*, 1992). Aufgrund dieser kurzen Halbwertszeit ist es nur schwer möglich, mit einer einmaligen Bolusgabe von Peroxynitrit unter *in vitro*-Bedingungen die pathologischen *in vivo*-Verhältnisse nachzuahmen, bei denen Peroxynitrit kontinuierlich gebildet wird. Aus diesem Grunde haben wir ein Infusionssystem für Peroxynitrit entwickelt (s. Material und Methoden), mit dem es möglich ist, Zellen einer Fließgleichgewichtskonzentration von Peroxynitrit auszusetzen (Schieke *et al.*, 1999).

Unter diesen Bedingungen wurden für 24 h Serum-frei gehaltene WB-F344 Leberepithelzellen im Infusionssystem einer Fließgleichgewichtskonzentration von Peroxynitrit von 0, 0,4, 1,6 oder 6,5 μM für 3 Min ausgesetzt. Nach dieser Behandlung wurden die Zellen sofort lysiert und die Aktivierung der p38-MAP Kinase im Western-Blot mit Antikörpern gegen die doppelt phosphorylierte Form nachgewiesen (Abb. 3.1). Es zeigte sich, dass p38 durch Peroxynitrit aktiviert wird und die Intensität der Aktivierung von der Peroxynitritkonzentration abhängt. Bei der maximalen eingesetzten Peroxynitritkonzentration von 6,5 μM fand sich auch die stärkste Aktivierung von p38 im untersuchten Bereich. Bei dieser Konzentration kam es jedoch zu einem Anstieg des pH-Wertes im PBS von 7,2 auf 7,7. Um einen Effekt dieses pH-Anstieges auf die Aktivierung der MAPK auszuschließen, wurde als Negativkontrolle (0 μM) zerfallenes Peroxynitrit eingesetzt (s. Material und Methoden). Desweiteren diente diese Negativkontrolle dem Ausschluss eines Effektes durch die Anteile von Nitrit (NO_2^-), Nitrat (NO_3^-) und Wasserstoffperoxid in der Peroxynitritlösung. Unter diesen Bedingungen kam es nicht zu einer Aktivierung von p38. Hierdurch konnte ein Effekt des pH-Anstiegs und der verunreinigenden Substanzen in der Peroxynitritlösung ausgeschlossen werden. Als Positivkontrolle diente die Behandlung der Zellen mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Die Zellen wurden dafür 2 h mit H_2O_2 in serumfreiem Medium inkubiert, gewaschen und lysiert. Hier

zeigte sich eine deutlich Aktivierung von p38 in Übereinstimmung mit den bekannten Daten (Wang *et al.*, 1998).

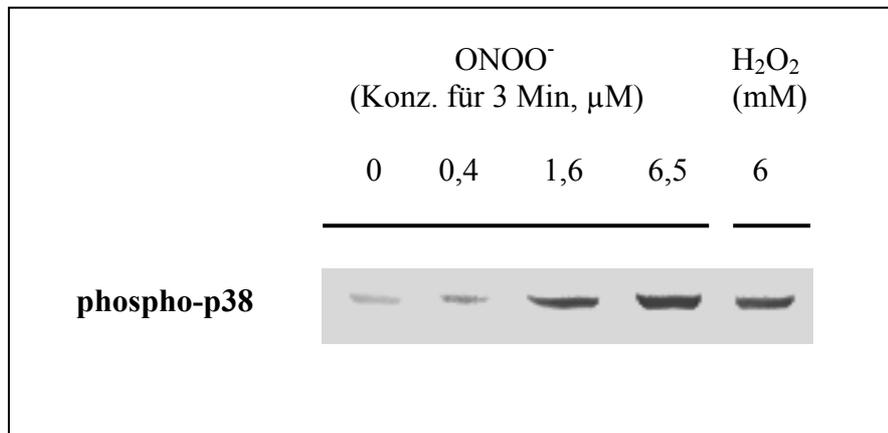


Abb. 3.1: Konzentrationsabhängigkeit der p38-MAP Kinase-Aktivierung durch Peroxynitrit. Die Leberepithelzellen wurden den angegebenen Fließgleichgewichtskonzentrationen von Peroxynitrit für 3 Min ausgesetzt und anschließend sofort lysiert. Als Negativkontrolle (0 μM) diente zerfallenes Peroxynitrit. Der Phosphorylierungsstatus von p38 wurde mit polyklonalen phospho-spezifischen Antikörpern erhoben. In der Positivkontrolle wurden die Zellen für 2 h mit Wasserstoffperoxid in serumfreiem Medium inkubiert. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

3.1.2 Zeitverlauf der Aktivierung von p38, JNK1/2 und ERK1/2

Um zu testen, ob die Aktivierbarkeit durch Peroxynitrit auch für andere MAPK zu finden ist, wurde im nächsten Experiment ein Zeitverlauf der Aktivierung aller drei genannten MAP Kinase-Arten, p38, JNK1/2 und ERK1/2, erstellt. Dazu wurden die WB Zellen nach 24-stündiger Inkubation in Serum-freiem Medium im Infusionssystem mit Peroxynitrit in einer Konzentration von 6,5 μM behandelt und danach zweimal mit PBS gewaschen. Die Lyse erfolgte dann entweder sofort (~ 1 Min) oder nach 15, 30, 60 oder 120 Min. Für die angegebenen Zeiten (15-120 Min) wurden die Zellen mit Serum-freiem Medium bei 37°C inkubiert und danach lysiert. Im anschließenden Western-Blot wurde der Zeitverlauf der MAP Kinase-Aktivierung mit Antikörpern gegen die doppelt phosphorylierte Form nachgewiesen (Abb. 3.2). Dabei zeigte sich eine Aktivierung von p38-MAP Kinase, JNK1/2 und ERK1/2.

Die Aktivierung von p38 war bereits nach ca. 1 Min zu sehen und fiel innerhalb der nächsten 30 Min auf das Basisniveau ab, so dass nach 30 Min keine erhöhte Aktivität von p38-MAPK mehr nachgewiesen werden konnte. Eine Aktivierung der c-Jun-NH₂-Terminus Kinasen, JNK1/2, war dagegen erst nach einem Zeitraum von 1 h nachweisbar. Zu einer Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinasen, ERK1/2, kam es 15 Min nach Behandlung der Zellen. Diese Aktivierung war 30 Min nach Behandlung bereits nicht mehr festzustellen.

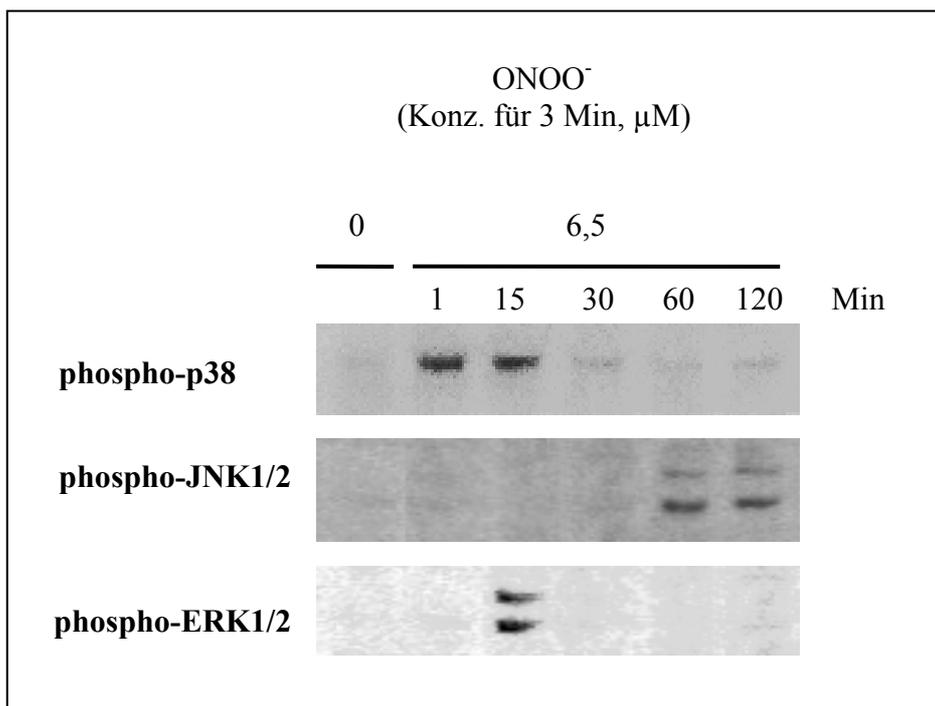


Abb. 3.2: Zeitverlauf der MAP Kinase-Aktivierung durch Peroxynitrit.

Die Leberepithelzellen wurden den angegebenen Fließgleichgewichtskonzentrationen von Peroxynitrit für 3 Min ausgesetzt und 1, 15, 30, 60 oder 120 Min nach der Infusionsbehandlung lysiert. Zwischenzeitlich (15-120 Min) wurden die Zellen in serumfreiem Medium bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle (0 μM) diente zerfallenes Peroxynitrit. Der Phosphorylierungsstatus von p38, JNK1/2 und ERK1/2 wurde mit polyklonalen phospho-spezifischen Antikörpern erhoben. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

3.2 Zytotoxizität von Natriumselenit

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Effekt von Selen auf die im ersten Teil beschriebene Aktivierung der MAPK durch Peroxynitrit untersucht. Dazu wurde dem

Zellkulturmedium Natriumselenit (Na_2SeO_3) zugesetzt. Um einen toxischen Effekt des zugesetzten Selenits auszuschließen, wurde in einem ersten Schritt ein MTT-Test zur Ermittlung des toxischen Konzentrationsbereiches durchgeführt.

Leberepithelzellen wurden in 24-well Platten bis zu einer Konfluenz von 80-90% kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt wurde dem Kulturmedium Natriumselenit für 48 h in Endkonzentrationen bis zu 10 μM zugesetzt. Danach wurde das Medium abgesaugt und der MTT-Test wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt (Abb. 3.3). Es zeigte sich keine wesentliche Toxizität von Natriumselenit in dem verwendeten Konzentrationsbereich bis 1 μM . Erst höhere Konzentrationen führten zu einer deutlichen Einschränkung der Vitalität, bis diese bei 10 μM Selenit nur noch 50% betrug ($\text{LD}_{50} = 10 \mu\text{M}$). Diese gewonnenen Daten korrelieren mit den von Golczewski *et al.* (1989) veröffentlichten Angaben zur Abhängigkeit des zellulären Proliferationsverhaltens von der Mediumselenitkonzentration. Bei den im Folgenden beschriebenen Experimenten wurde Selenit in nicht toxischer Konzentration von 1 μM dem Kulturmedium zugesetzt.

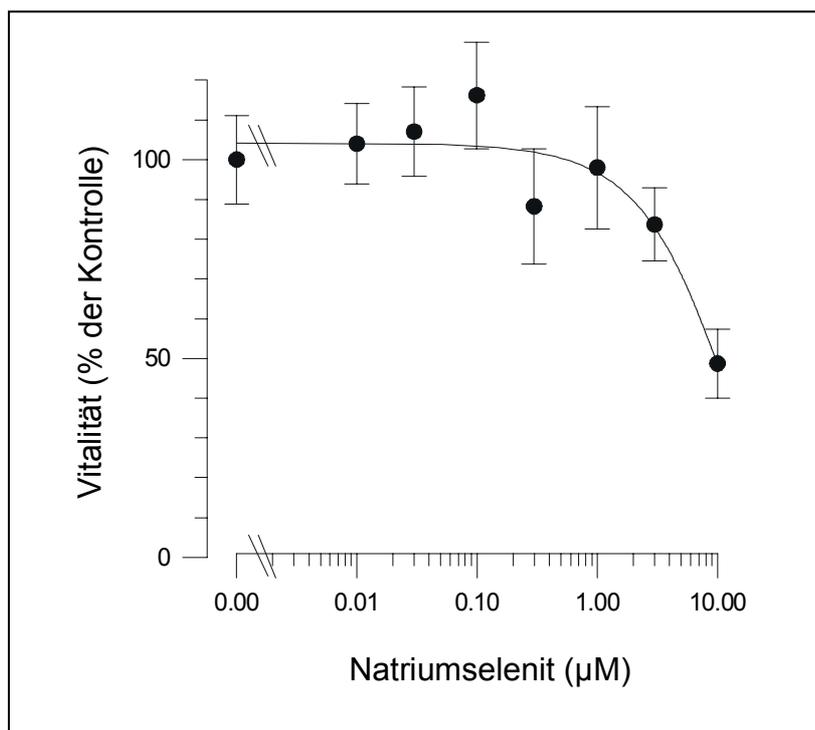


Abb. 3.3: Toxizität von Natriumselenit in Leberepithelzellen.

Die Vitalität wurde nach 48-stündiger Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen von Natriumselenit im Zellkulturmedium mittels des MTT-Assays bestimmt. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$).

3.3 Aktivität der Glutathionperoxidase nach Selenitzugabe zum Zellkulturmedium

Wie in der Einleitung dargestellt, lässt sich die Expression und Aktivität von Selenoproteinen durch Erhöhung der Selenkonzentration steigern. Bei erhöhter Selenkonzentration des Kulturmediums (1 μM) wurde in Zell-Lysaten die Aktivität der Glutathionperoxidase bestimmt. Wie aus den im Abschnitt 3.2 dargestellten Toxizitätsdaten hervorgeht führte die verwendete Konzentration von Selenit nicht zu einer Beeinträchtigung der Vitalität. Die oxidationsbedingte Abnahme der NADPH-Konzentration wurde photometrisch bei 340 nm gemessen und daraus die Enzymaktivität berechnet. Dabei zeigte sich, dass die Supplementierung des Mediums mit 1 μM Selenit zu einem fast 13fachen Anstieg der Aktivität der Glutathionperoxidase führte (Tab. 3.1).

	GPx-Aktivität (nmol x Min⁻¹/mg Protein)
Medium^a	4,3 ± 0,5
+ Natriumselenit (1μM)^b	54,3 ± 1,4

Tab. 3.1.: Glutathionperoxidaseaktivität in Leberepithelzell-Lysaten nach 48-stündiger Inkubation mit selenithaltigem Kulturmedium (Mittelwert \pm Standardabweichung; ^a n=5; ^b n=3).

3.4 Effekt von Natriumselenit auf die MAP Kinase-Aktivierung und Proteintyrosin-Nitrierung durch Peroxynitrit

In einem letzten Schritt wurde nun die Aktivierbarkeit der MAP Kinasen und die Proteintyrosin-Nitrierung durch Peroxynitrit unter erhöhter Se-Konzentration im Kulturmedium bestimmt. Dadurch sollte untersucht werden, ob die gesteigerte Aktivität der Selenoproteine, beispielsweise der GPx als Peroxynitritreduktase, einen Einfluss auf diese Effekte hat. Die WB Zellen wurden über 48 h vor der Infusionsbehandlung in Kulturmedium gehalten, dem 1 μM Natriumselenit zugesetzt worden war, was zu einem 13fachen Anstieg der GPx-Aktivität führte (Abschnitt 3.3). Im Infusionssystem wurde eine Peroxynitritkonzentration von 6,5 μM eingesetzt. Als

Negativkontrolle diente wie in den vorhergehenden Experimenten die Behandlung mit zerfallenem Peroxynitrit (0 μM). Die Lyse der Zellen erfolgte direkt im Anschluss ohne weitere Inkubationszeiten. Im Western-Blot wurde neben dem Aktivierungsniveau von p38 auch die Bildung von proteingebundenem 3-Nitrotyrosin, einem Marker für die Wirkung von Peroxynitrit, ermittelt (Abb. 3.4).

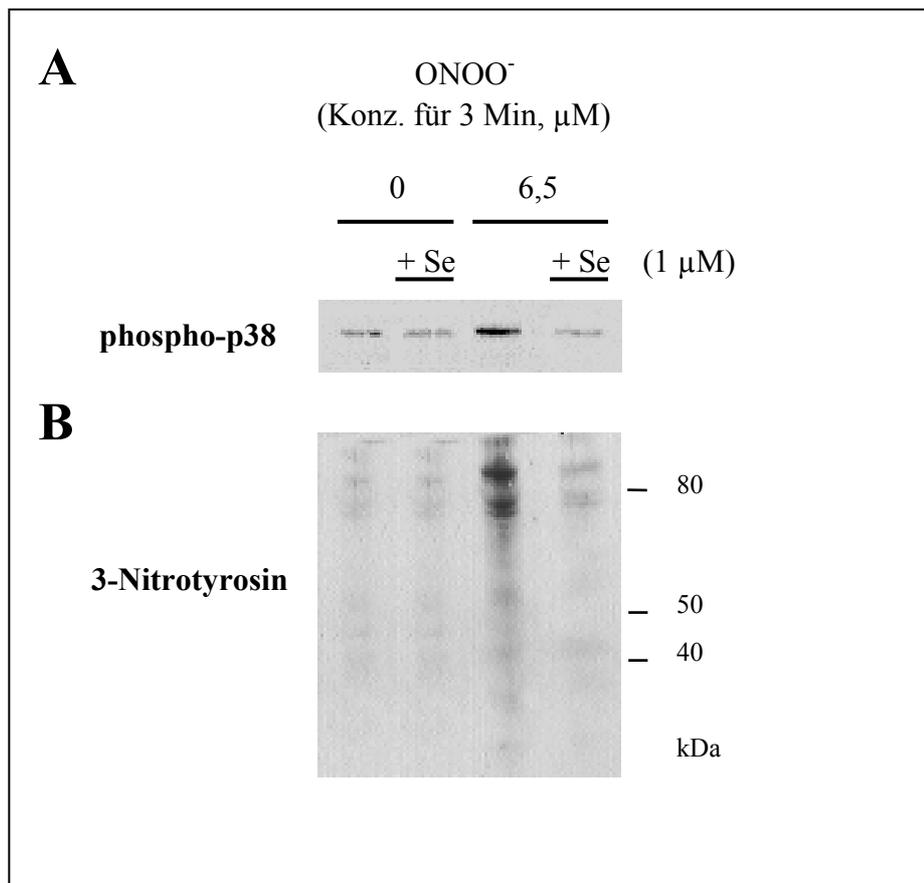


Abb. 3.4: Einfluss von Selenit auf die Aktivierung von p38-MAPK (A) und Tyrosin-Nitrierung (B) durch Peroxynitrit.

Leberepithelzellen wurden für 48 Stunden in selenithaltigem Medium inkubiert. Danach erfolgte die Behandlung der Zellen im Infusionssystem mit Peroxynitrit wie in Abb. 3.1. Die Zellen wurden anschließend sofort lysiert und der Phosphorylierungsstatus von p38 (A) mit polyklonalen phosphospezifischen Antikörpern ermittelt. Nitrotyrosin (B) wurde mit einem monoklonalen anti-3-Nitrotyrosin Antikörper detektiert (siehe Material und Methoden). Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

Zunächst einmal konnte ein Effekt von 1 μM Natriumselenit im Kulturmedium auf die Aktivierung von p38 ausgeschlossen werden. Für höhere Konzentrationen von Selenit wurde dies von Stapleton *et al.* (1997) beschrieben. In den Lysaten der mit

Peroxynitrit (6,5 μM Fließgleichgewichtskonzentration) behandelten Zellen konnte eine Aktivierung von p38 nachgewiesen. Desweiteren war in diesen Zellen eine Nitrierung von Tyrosinresten zu erkennen. Die Bildung von 3-Nitrotyrosin ist dabei als biochemischer Marker für die Wirkung von Peroxynitrit zu sehen. Wurden die Zellen jedoch zuvor mit selenhaltigem Kulturmedium inkubiert, zeigte sich ein anderes Bild. Unter diesen Bedingungen führte eine 6,5 μM Fließgleichgewichtskonzentration von Peroxynitrit nicht zu einer gesteigerten Bildung von 3-Nitrotyrosin im Vergleich zur Negativkontrolle. Auch auf der Ebene der Kinasephosphorylierung bzw. -aktivierung hatte Peroxynitrit keinen Effekt mehr. Der aktivierende Effekt auf p38 wurde im Vergleich zur Negativkontrolle vollständig unterdrückt. Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass durch Selenzugabe zum Kulturmedium ein Schutz vor der durch Peroxynitrit induzierten MAP Kinase-Aktivierung und der Nitrierung von Tyrosinresten zu erreichen war.

4. Diskussion

4.1 Aktivierung von MAP Kinasen durch Peroxynitrit

In der vorliegenden Arbeit werden die Effekte von Peroxynitrit auf das Aktivierungsniveau der MAP Kinasen, p38, JNK und ERK, untersucht. Zur Behandlung der kultivierten Zellen mit Peroxynitrit wird ein dafür entwickeltes Infusionssystem eingesetzt. Dieses bietet den Vorteil der Exposition der Zellen gegenüber einer genau zu kalkulierenden Fließgleichgewichtskonzentration von Peroxynitrit. In den üblicherweise durchgeführten Experimenten wird Peroxynitrit als Bolus zugefügt. Dabei kommt es bei Zugabe von Peroxynitrit zu einer hohen initialen Konzentration, die, bedingt durch die kurze Halbwertszeit von Peroxynitrit, schnell abfällt. Mit dem Infusionssystem lassen sich solche starken Konzentrationsänderungen vermeiden und somit die *in vivo*-Verhältnisse mit kontinuierlicher Peroxynitritbildung besser nachahmen.

Unter diesen Bedingungen zeigt sich, dass Peroxynitrit zu einer Aktivierung der MAPK p38, JNK und ERK führt. Das sich dabei ergebende Aktivierungsmuster der MAP Kinasen unterscheidet sich von dem für andere Stimuli und Zelltypen bekannten Muster. So führt Stickstoffmonoxid innerhalb weniger Minuten zu einer Aktivierung von p38 und JNK in Jurkat T Zellen, während die ERK-Aktivität langsam mit der \cdot NO-Behandlungsdauer ansteigt (Lander *et al.*, 1996). Superoxid induziert eine Aktivierung von ERK1/2 nach 5-10 min in glatten Gefäßmuskelzellen (Baas *et al.*, 1995). Die Aktivierung von p38 und ERK durch Wasserstoffperoxid setzt verzögert ein und hält im Vergleich zu Peroxynitrit länger an (Wang *et al.*, 1998). UVA oder Singulett-Sauerstoff zeigen eine Aktivierung von p38 und JNK aber nicht von ERK in Hautfibroblasten (Klotz *et al.*, 1999). UVB führt zu einer langanhaltenden Aktivierung von p38 und JNK für 8 h und von ERK für 24 h (Fisher *et al.*, 1998). UVC aktiviert alle drei MAPK 5-30 min nach Bestrahlung (Raingeaud *et al.*, 1995; Derijard *et al.*, 1994; Dhanwada *et al.*, 1995). Es zeigt sich somit, dass die beschriebenen MAPK-Aktivierungsmuster ein für den jeweiligen Stimulus und Zelltyp spezifisches Bild ergeben.

Nach Veröffentlichung der vorliegenden Arbeit (Schieke *et al.*, 1999) sind zahlreiche weitere Arbeiten erschienen, die sich mit einer MAPK-Aktivierung durch Peroxynitrit beschäftigen (Oh-hashii *et al.*, 1999; Go *et al.*, 1999; Saeki *et al.*, 2000; Jope *et al.*, 2000). Eine wesentliche Frage bei der Kinase-Aktivierung ist, an welchem Punkt des

Signalweges vom Rezeptor bis zur phosphorylierten Kinase Peroxynitrit eingreift. Es ist sowohl eine Aktivierung auf Rezeptorebene als auch an nachgeschalteten Punkten möglich. Am Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR) führt Peroxynitrit über Dityrosinbildung zu einer kovalenten Dimerisierung mit einer Beeinflussung der nachfolgenden Phospholipase C- γ 1 (van der Vliet *et al.*, 1998). Im Signalweg von ERK (EGFR – Ras – Raf – MEK – ERK) aktiviert Peroxynitrit den EGF-Rezeptor, Raf1 und MEK in pulmonalen Myoepithelzellen. Dabei führt nur eine Hemmung von MEK, nicht von EGFR oder Raf zu einer Abschwächung der ERK-Aktivierung, d.h., dass die drei Kinasen unabhängig voneinander aktiviert werden und die ERK-Aktivierung durch Peroxynitrit nur von der MEK-Phosphorylierung abhängt (Zhang *et al.*, 2000). In der Phäochromocytom-Zelllinie PC12 ist dagegen eine Abhängigkeit der ERK-Aktivierung von der EGFR-Phosphorylierung beschrieben (Jope *et al.*, 2000). Auch für den Signalweg „PDGFR – PI3K – Akt“ ist eine Aktivierung bereits auf Rezeptorebene nachweisbar, bei deren Hemmung durch einen spezifischen PDGFR-Inhibitor (AG 1295) es zu einer deutlich verminderten Aktivierung von Akt kommt (Klotz *et al.*, 2000). Anhand dieser Daten wird deutlich, dass Peroxynitrit in unterschiedlichen Zelltypen auf verschiedenen Stufen des Signalweges eingreifen kann – ein Indiz für seine hohe und gleichzeitig unspezifische Reaktivität mit vielen Proteinen.

Über welchen Mechanismus kommt es zu der Aktivierung von MAP Kinasen durch Peroxynitrit? Grundsätzlich lässt sich eine gesteigerte Kinaseaktivität durch direkte Aktivierung der Kinasen und/oder eine Inhibition von Phosphotyrosinphosphatasen (PTPasen) erreichen. Der letztere Mechanismus ist für eine Reihe von oxidativen Stimuli beschrieben worden. Als gemeinsames Merkmal besitzen alle bekannten PTPasen einen Cysteinrest in ihrem aktiven Zentrum, der als Nucleophil den Phosphatrest des Substrates unter intermediärer Bildung eines Phosphocysteins angreift (Fauman *et al.*, 1996). Weiterhin findet man einen konservierten Tyrosinrest im aktiven Zentrum, der die Spezifität für Phosphotyrosin als Substrat gegenüber Phosphoserin oder –threonin bedingt. Eine Oxidation des Cysteinrestes resultiert in einer PTPase-Inaktivierung und somit in einer gesteigerten Kinaseaktivität. So führen H_2O_2 und $\cdot\text{NO}$ über eine Thioloxydation im aktiven Zentrum zu einer Phosphataseinaktivierung (Caselli *et al.*, 1994; Caselli *et al.*, 1998) ebenso wie UVA-, -B- oder -C-Bestrahlung von Zellen (Knebel *et al.*, 1996). Ein Hinweis darauf, dass dieser Mechanismus auch für die Kinase-Aktivierung durch Peroxynitrit eine Rolle

spielen kann, ergibt sich aus den Ergebnissen von Takakura *et al.* (1999). Peroxynitrit führt zu einer schnellen und irreversiblen Inaktivierung der isolierten Phosphatase PTP1 B (u.a.). Als wesentlicher Mechanismus ist dabei die Oxidation des Thiolrestes im aktiven Zentrum des Enzyms anzusehen (Reaktionskonstante $2,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Eine Tyrosin-Nitrierung ist erst nach der vollständigen Inaktivierung der PTPase nachweisbar.

In Experimenten mit primären Hautfibroblasten führt Peroxynitrit zu einer Aktivierung der Serin-/Threoninkinase Akt über den PI3K-Signalweg (PDGFR – PI3K – Akt – GSK3). Die Aktivierung dieser Kinase kann jedoch nicht allein auf eine Phosphataseinaktivierung zurückgeführt werden. Eine Peroxynitritvorbehandlung der Zellen mit nachfolgender Inkubation in wachstumsfaktorhaltigem Medium führt zu einer deutlich verringerten Aktivierung von Akt im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen. Käme es in diesem Fall zu einer Phosphataseinaktivierung durch Peroxynitrit, würde der aktivierende Effekt der Wachstumsfaktoren noch verstärkt werden. So muss man annehmen, dass in diesen Zellen eine PTPase-Inaktivierung zumindest nicht alleine für die Kinase-Aktivierung verantwortlich sein kann (Klotz *et al.*, 2000).

Eine Aktivierung von p38-MAPK, JNK und ERK führt zu einer Phosphorylierung und gesteigerten Expression von c-Jun und c-Fos, die zusammen die klassische Variante des Transkriptionsfaktors AP-1 bilden, der Bindungsstellen in Promotorregionen zahlreicher Gene besitzt. Auf diesem Wege kann Peroxynitrit zu einer Modulation der Expression verschiedener Gene führen, was für die c-Fos-Expression gezeigt wurde (Müller *et al.*, 1997); das gilt auch für die Expression anderer Gene, z. B. HO-1, Mn-SOD (Foresti *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 1998).

Peroxynitrit führt jedoch nicht in jedem Fall zu einer Kinase-Aktivierung. Durch die irreversible Nitrierung von Tyrosinresten in zellulären Proteinen kann die Tyrosinphosphorylierung verhindert und damit die Signaltransduktion gestört werden (Kong *et al.*, 1996; Brito *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1998). Peroxynitrit besitzt somit durch seine Fähigkeit zur Nitrierung und Oxidation vielfältige Möglichkeiten in die zelluläre Signaltransduktion an unterschiedlichen Punkten sowohl hemmend als auch aktivierend einzugreifen und dadurch die Genexpression zu modulieren.

4.2 Abschwächung der Kinase-Aktivierung und Proteintyrosin-Nitrierung durch Selensupplementierung des Zellkulturmedium

In der vorliegenden Arbeit wird neben der MAPK Aktivierung durch Peroxynitrit der Einfluss einer Supplementierung von Natriumselenit auf diese Kinase-Aktivierung und Proteintyrosin-Nitrierung durch Peroxynitrit untersucht. Ein Zusatz von Natriumselenit zum Kulturmedium führt zu einer gesteigerten Aktivität und Expression von Selenoproteinen, z.B. der Glutathionperoxidase (Brigelius-Flohè *et al.*, 1995). In der eigenen Arbeit nimmt die GPx-Aktivität nach 48-stündiger Supplementierung von 1 µM Selenit um den Faktor 13 zu. Aufgrund von Daten in zellfreien Systemen ist bereits bekannt, dass GPx in Anwesenheit von Glutathion (GSH) in der Lage ist, Peroxynitrit zu Nitrit zu reduzieren (Sies *et al.*, 1997). Dabei wird die Oxidation von Dihydrorhodamin 123, Hydroxylierung von Benzoat und Tyrosin-Nitrierung in Zellysaten durch Peroxynitrit gehemmt. Die Glutathionperoxidase stellt somit einen GSH-abhängigen Schutzmechanismus vor der Oxidation und Nitrierung durch Peroxynitrit dar. In dieser Arbeit kann in Zellkulturexperimenten gezeigt werden, dass ein Se-Zusatz zum Kulturmedium Schutz vor MAP Kinase-Aktivierung und Proteintyrosin-Nitrierung durch Peroxynitrit bietet.

Der Schutz vor Peroxynitrit ist dabei nicht auf eine direkte Reaktion mit dem zugesetztem Natriumselenit zurückzuführen. In einer vorhergehenden Studie von Briviba *et al.* (1996) konnte gezeigt werden, dass die Peroxynitrit-induzierte Oxidation von Dihydrorhodamin 123 und Nitrierung von 4-Hydroxyphenylacetat durch Selenomethionin, -cystin und Ebselen abgeschwächt wird. Natriumselenit hat in einer Konzentration von 1 mM keinen und bei 10 mM kaum einen Effekt auf die Oxidation und Nitrierung.

Selenverbindungen führen zu einer Beeinflussung der zellulären Signaltransduktion an unterschiedlichen Punkten. Eine Hemmung der Protein Kinase C und JNK (Park *et al.*, 2000; Gopalakrishna *et al.*, 1997), der Caspase-3-Aktivität (Park *et al.*, 2000) und der Bindung von AP-1 und NF-κB an DNA (Handel *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1997) ist bekannt. Desweiteren führt Selenat (500 und 1000 µM) zu einer Aktivierung von ERK1/2 in primären Hepatocyten und 3T3 L1 Adipocyten (Stapleton *et al.*, 1997). In der vorliegenden Arbeit werden jedoch deutlich niedrigere Konzentration von Se (1 µM) verwendet, bei denen sich in Kontrollen keine Aktivierung von MAPK zeigt.

Somit kann ein störender, aktivierender Effekt von Se auf die MAPK als unwahrscheinlich angesehen werden. Bei der Abschwächung der Kinase-Aktivierung nach Selenzusatz ist ebenfalls ein direkter, hemmender Einfluss von Selenit auf die MAP Kinasen unwahrscheinlich. Nach Inkubation der Zellen in Se-haltigem Medium kommt es nicht nur zu einer abgeschwächten Kinase-Aktivierung sondern auch zu einer deutlichen Reduktion der Tyrosin-Nitrierung durch Peroxynitrit. Die verminderte Bildung von 3-Nitrotyrosin als Marker für Peroxynitrit ist dabei als Hinweis auf eine abgeschwächte Wirkung von Peroxynitrit zu deuten. In diesem Sinne ist auch die reduzierte Kinase-Aktivierung als Folge der durch Se-Zusatz verminderten Peroxynitritwirkung zu sehen.

Es läßt sich deshalb die Schlußfolgerung ziehen, dass der in dieser Arbeit beobachtete protektive Effekt einer Se-Supplementierung auf eine erhöhte Aktivität von zellulären Selenoproteinen, z.B. GPx, zurückzuführen ist. Die Beteiligung anderer intrazellulärer Selenoproteine an diesem Effekt, für die teilweise ebenfalls eine schützende Wirkung vor Peroxynitrit beschrieben ist, z.B. TrxR (Arteel *et al.*, 1999), ist dabei wahrscheinlich.

5. Zusammenfassung

In der Reaktion der beiden Radikale Superoxid, $O_2^{\cdot -}$, und Stickstoffmonoxid, $\cdot NO$, entsteht Peroxynitrit, welches im Organismus von aktivierten Makrophagen, Endothelzellen etc. gebildet wird. Diese oxidierende und nitrierende Verbindung spielt bei zahlreichen Erkrankungen eine Rolle, z.B. bei neurodegenerativen Erkrankungen oder Entzündungsvorgängen. Als Teil der zellulären Antwort auf äußere Stimuli wie inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren oder UV-Strahlung kommt es zur Aktivierung von MAP Kinase-Signalwegen, die über eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, z.B. AP-1, zu einer Modulation der Genexpression führen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Peroxynitrit auf MAP Kinasen in Rattenleberepithelzellen (WB-F344) untersucht. Dazu wurde ein Infusionssystem entwickelt, das es ermöglichte, die Zellen einer Fließgleichgewichtskonzentration von Peroxynitrit auszusetzen. Bei einer 3-minütigen Exposition gegenüber $6,5 \mu M$ Peroxynitrit kam es zu einer Aktivierung von p38-MAPK, JNK1/2 und ERK1/2. Die dabei erfolgte Nitrierung von Tyrosinresten zellulärer Proteine ist als Marker für die Wirkung von Peroxynitrit anzusehen. Es zeigt sich somit, dass Peroxynitrit die zellulären Signaltransduktionswege aktivieren kann.

Der Organismus hat eine Reihe von Mechanismen entwickelt, um sich gegen die schädlichen Einflüsse reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffspezies zu schützen. Intrazelluläre Selenoproteine stellen einen Teil dieses antioxidativen Schutzsystems dar. Die Glutathionperoxidase kann Peroxynitrit unter Oxidation von Glutathion zu Nitrit reduzieren. In dieser Arbeit wurde der Effekt einer Selensupplementierung des Kulturmediums auf die durch Peroxynitrit induzierte MAP Kinase-Aktivierung und Proteintyrosin-Nitrierung untersucht. Nach Inkubation von WB Zellen in selenhaltigem Medium ($1 \mu M$) für 48h kam es zu einem 13fachen Anstieg der Glutathionperoxidase-Aktivität. Eine Behandlung dieser selensupplementierten Zellen mit Peroxynitrit führte zu einer deutlich abgeschwächten MAP Kinase-Aktivierung und Tyrosin-Nitrierung. Diese Daten unterstreichen somit die protektive Rolle der Selenoproteine beim Schutz vor Peroxynitrit.

6. Literatur

- Alayash,A.I., Ryan, B. A., and Cashon, R. E. (1998). Peroxynitrite-mediated heme oxidation and protein modification of native and chemically modified hemoglobins. *Arch.Biochem.Biophys.* **349**, pp. 65-73.
- Allan,C.B., Lacourciere, G. M., and Stadtman, T. C. (1999). Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. *Annu.Rev.Nutr.* **19**, pp. 1-16.
- Alvarez,B., Rubbo, H., Kirk, M., Barnes, S., Freeman, B. A., and Radi, R. (1996). Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration. *Chem.Res.Toxicol.* **9**, pp. 390-396.
- Arteel,G.E., Briviba, K., and Sies, H. (1999a). Function of thioredoxin reductase as a peroxynitrite reductase using selenocystine or ebselen. *Chem.Res.Toxicol.* **12**, pp. 264-269.
- Arteel,G.E., Briviba, K., and Sies, H. (1999b). Protection against peroxynitrite. *FEBS Lett.* **445**, pp. 226-230.
- Arteel,G.E., Mostert, V., Oubrahim, H., Briviba, K., Abel, J., and Sies, H. (1998). Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration. *Biol.Chem.* **379**, pp. 1201-1205.
- Arteel,G.E., Schroeder, P., and Sies, H. (2000). Reactions of peroxynitrite with cocoa procyanidin oligomers . *J.Nutr.* **130**, pp. 2100S-2104S.
- Arteel,G.E., and Sies, H. (1999). Protection against peroxynitrite by cocoa polyphenol oligomers. *FEBS Lett.* **462**, pp. 167-170.
- Assmann,A., Briviba, K., and Sies, H. (1998). Reduction of methionine selenoxide to selenomethionine by glutathione. *Arch.Biochem.Biophys.* **349**, pp. 201-203.
- Baas,A.S., and Berk, B. C. (1995). Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H₂O₂ and O₂⁻ in vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* **77**, pp. 29-36.
- Babior,B.M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood* **93**, pp. 1464-1476.

- Babior, B.M., Kipnes, R. S., and Curnutte, J. T. (1973). Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J.Clin.Invest* **52**, pp. 741-744.
- Bartlett, D., Church, D. F., Bounds, P. L., and Koppenol, W. H. (1995). The kinetics of the oxidation of L-ascorbic acid by peroxynitrite. *Free Radic.Biol.Med.* **18**, pp. 85-92.
- Beckman, J.S. (1996). The physiological and pathophysiological chemistry of nitric oxide. In *Nitric Oxide: Principles and Actions* (Lancaster, J., Ed.), pp. 1-82. Academic Press, San Diego, CA
- Beckman, J.S., Chen, J., Ischiropoulos, H., and Crow, J. P. (1994). Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol.* **233**, pp. 229-240.
- Behne, D., Kyriakopoulos, A., Meinhold, H., and Köhrle, J. (1990). Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochim.Biophys.Res.Commun.* **173**, pp. 1143-1149.
- Berggren, M., Gallegos, A., Gasdaska, J., and Powis, G. (1997). Cellular thioredoxin reductase activity is regulated by selenium. *Anticancer Res.* **17**, pp. 3377-3380.
- Berridge, M.V., Tan, A. S., McCoy, K. D., and Wang, R. (1996). The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Boehringer Biochemica* **4/96**, pp. 14-19.
- Bosl, M.R., Takaku, K., Oshima, M., Nishimura, S., and Taketo, M. M. (1997). Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (Trsp). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **94**, pp. 5531-5534.
- Boveris, A., and Cadenas, E. (1975). Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett.* **54**, pp. 311-314.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal.Biochem.* **72**, pp. 248-254.
- Brigelius-Flohè, R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic.Biol.Med.* **27**, pp. 951-965.

Brigelius-Flohè, R., Lotzer, K., Maurer, S., Schultz, M., and Leist, M. (1995). Utilization of selenium from different chemical entities for selenoprotein biosynthesis by mammalian cell lines. *Biofactors* **5**, pp. 125-131.

Brito, C., Naviliat, M., Tiscornia, A. C., Vuillier, F., Gualco, G., Dighiero, G., Radi, R., and Cayota, A. M. (1999). Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *J. Immunol.* **162**, pp. 3356-3366.

Briviba, K., Kissner, R., Koppenol, W. H., and Sies, H. (1998a). Kinetic study of the reaction of glutathione peroxidase with peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, pp. 1398-1401.

Briviba, K., Roussyn, I., Sharov, V. S., and Sies, H. (1996). Attenuation of oxidation and nitration reactions of peroxynitrite by selenomethionine, selenocystine and ebselen. *Biochem. J.* **319 (Pt 1)**, pp. 13-15.

Briviba, K., Tamler, R., Klotz, L. O., Engman, L., Cotgreave, I. A., and Sies, H. (1998b). Protection by organotellurium compounds against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration reactions. *Biochem. Pharmacol.* **55**, pp. 817-823.

Cadenas, E., and Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, pp. 222-230.

Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., and Mitchell, J. B. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, pp. 936-942.

Caselli, A., Camici, G., Manao, G., Moneti, G., Pazzagli, L., Cappugi, G., and Ramponi, G. (1994). Nitric oxide causes inactivation of the low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* **269**, pp. 24878-24882.

Caselli, A., Marzocchini, R., Camici, G., Manao, G., Moneti, G., Pieraccini, G., and Ramponi, G. (1998). The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase by H₂O₂. *J. Biol. Chem.* **273**, pp. 32554-32560.

Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**, pp. 527-605.

Chu, F.F., Doroshov, J. H., and Esworthy, R. S. (1993). Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J.Biol.Chem.* **268**, pp. 2571-2576.

Clark, L.C., Combs, G. F., Jr., Turnbull, B. W., Slate, E. H., Chalker, D. K., Chow, J., Davis, L. S., Glover, R. A., Graham, G. F., Gross, E. G., Krongrad, A., Leshner, J. L., Jr., Park, H. K., Sanders, B. B., Jr., Smith, C. L., and Taylor, J. R. (1996). Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA* **276**, pp. 1957-1963.

Cobb, M.H., Boulton, T. G., and Robbins, D. J. (1991). Extracellular signal-regulated kinases: ERKs in progress. *Cell Regul.* **2**, pp. 965-978.

Cohen, P. (1997). The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trends Cell.Biol.* **7**, pp. 353-361.

Combs, G.F., Jr., and Gray, W. P. (1998). Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol.Ther.* **79**, pp. 179-192.

Cowie, D.B., and Cohen, G. N. (1957). Biosynthesis by *Escherichia coli* of active altered proteins containing selenium instead of sulfur. *Biochim.Biophys.Acta* **26**, pp. 252-261.

Croteau, W., Whittemore, S. K., Schneider, M. J., and Germain, G. L. (1995). Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase. *J.Biol.Chem.* **270**, pp. 16569-16575.

Davey, J.C., Becker, K. B., Schneider, M. J., Germain, G. L., and Galton, V. A. (1995). Cloning of a cDNA for the type II iodothyronine deiodinase. *J.Biol.Chem.* **270**, pp. 26786-26789.

Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M., and Radi, R. (1996). Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch.Biochem.Biophys.* **333**, pp. 49-58.

Derijard, B., Hibi, M., Wu, I. H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., and Davis, R. J. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**, pp. 1025-1037.

Dhanwada, K.R., Dickens, M., Neades, R., Davis, R., and Pelling, J. C. (1995). Differential effects of UV-B and UV-C components of solar radiation on MAP kinase signal transduction pathways in epidermal keratinocytes. *Oncogene* **11**, pp. 1947-1953.

El-Bayoumy, K. (1993). The role of selenium in cancer prevention. In *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (DeVita, V.T.J., Hellman, S., and Rosenberg, S.A., Eds.), pp. 1-15. Lippincott, Philadelphia, PA

Ellman, G., and Lysko, H. (1979). A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. *Anal. Biochem.* **93**, pp. 98-102.

Esposito, L.A., Kokoszka, J. E., Waymire, K. G., Cottrell, B., MacGregor, G. R., and Wallace, D. C. (2000). Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, pp. 754-766.

Fauman, E.B., and Saper, M. A. (1996). Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends Biochem. Sci.* **21**, pp. 413-417.

Ferrer-Sueta, G., Batinic-Haberle, I., Spasojevic, I., Fridovich, I., and Radi, R. (1999). Catalytic scavenging of peroxynitrite by isomeric Mn(III) N-methylpyridylporphyrins in the presence of reductants. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, pp. 442-449.

Fisher, G.J., Talwar, H. S., Lin, J., Lin, P., McPhillips, F., Wang, Z. Q., Li, X., Wan, Y., Kang, S., and Voorhees, J. J. (1998). Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo. *J. Clin. Invest.* **101**, pp. 1432-1440.

Flohè, L., and Günzler, W. A. (1985). Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **105**, pp. 114-121.

Flohè, L., Günzler, W. A., and Schock, H. H. (1973). Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* **32**, pp. 132-134.

Floris,R., Piersma, S. R., Yang, G., Jones, P., and Wever, R. (1993). Interaction of myeloperoxidase with peroxynitrite. A comparison with lactoperoxidase, horseradish peroxidase and catalase. *Eur.J.Biochem.* **215**, pp. 767-775.

Foresti,R., Sarathchandra, P., Clark, J. E., Green, C. J., and Motterlini, R. (1999). Peroxynitrite induces haem oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis. *Biochem.J.* **339 (Pt 3)**, pp. 729-736.

Fridovich,I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu.Rev.Biochem.* **64**, pp. 97-112.

Gagnon,C., Leblond, F. A., and Filep, J. G. (1998). Peroxynitrite production by human neutrophils, monocytes and lymphocytes challenged with lipopolysaccharide. *FEBS Lett.* **431**, pp. 107-110.

Gallegos,A., Berggren, M., Gasdaska, J. R., and Powis, G. (1997). Mechanisms of the regulation of thioredoxin reductase activity in cancer cells by the chemopreventive agent selenium. *Cancer Res.* **57**, pp. 4965-4970.

Gasdaska,P.Y., Berggren, M. M., Berry, M. J., and Powis, G. (1999). Cloning, sequencing and functional expression of a novel human thioredoxin reductase. *FEBS Lett.* **442**, pp. 105-111.

Gladyshev,V.N., Jeang, K. T., Wootton, J. C., and Hatfield, D. L. (1998). A new human selenium-containing protein. Purification, characterization, and cDNA sequence. *J.Biol.Chem.* **273**, pp. 8910-8915.

Go,Y.M., Patel, R. P., Maland, M. C., Park, H., Beckman, J. S., Darley-USmar, V. M., and Jo, H. (1999). Evidence for peroxynitrite as a signaling molecule in flow-dependent activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Am.J.Physiol.* **277**, pp. H1647-H1653.

Golczewski,J.A., and Frenkel, G. D. (1989). Cellular selenoproteins and the effects of selenite on proliferation. *Biol.Trace Elem.Res.* **20**, pp. 115-126.

Gopalakrishna,R., Chen, Z. H., and Gundimeda, U. (1997a). Selenocompounds induce a redox modulation of protein kinase C in the cell, compartmentally

independent from cytosolic glutathione: its role in inhibition of tumor promotion. *Arch.Biochem.Biophys.* **348**, pp. 37-48.

Gopalakrishna,R., Gundimeda, U., and Chen, Z. H. (1997b). Cancer-preventive selenocompounds induce a specific redox modification of cysteine-rich regions in Ca(2+)-dependent isoenzymes of protein kinase C. *Arch.Biochem.Biophys.* **348**, pp. 25-36.

Gow,A., Duran, D., Thom, S. R., and Ischiropoulos, H. (1996). Carbon dioxide enhancement of peroxynitrite-mediated protein tyrosine nitration. *Arch.Biochem.Biophys.* **333**, pp. 42-48.

Gross,M., Oertel, M., and Köhrle, J. (1995). Differential selenium-dependent expression of type I 5'-deiodinase and glutathione peroxidase in the porcine epithelial kidney cell line LLC- PK1. *Biochem.J.* **306 (Pt 3)**, pp. 851-856.

Guimaraes,M.J., Peterson, D., Vicari, A., Cocks, B. G., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Ferrick, D. A., Kastalein, R. A., Bazan, J. F., and Zlotnik, A. (1996). Identification of a novel selD homolog from eukaryotes, bacteria, and archea; is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **93**, pp. 15086-15091.

Gupta,S., Barrett, T., Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Sluss, H. K., Derijard, B., and Davis, R. J. (1996). Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.* **15**, pp. 2760-2770.

Han,J., Lee, J. D., Bibbs, L., and Ulevitch, R. J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**, pp. 808-811.

Handel,M.L., Watts, C. K., deFazio, A., Day, R. O., and Sutherland, R. L. (1995). Inhibition of AP-1 binding and transcription by gold and selenium involving conserved cysteine residues in Jun and Fos. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **92**, pp. 4497-4501.

Hill,K.E., Chittum, H. S., Lyons, P. R., Boeglin, M. E., and Burk, R. F. (1996a). Effect of selenium on selenoprotein P expression in cultured liver cells. *Biochim.Biophys.Acta* **1313**, pp. 29-34.

Hill, K.E., Xia, Y., Akesson, B., Boeglin, M. E., and Burk, R. F. (1996b). Selenoprotein P concentration in plasma is an index of selenium status in selenium-deficient and selenium-supplemented Chinese subjects. *J.Nutr.* **126**, pp. 138-145.

Hughes, M.N., and Nicklin, H. G. (1968). The chemistry of pernitrites. Part 1. Kinetics of decomposition of pernitrous acid. *J.Chem.Soc. A*, pp. 450-452.

Huie, R.E., and Padmaja, S. (1993). The reaction of NO with superoxide. *Free Radic.Res.Commun.* **18**, pp. 195-199.

Inoue, S., and Kawanishi, S. (1995). Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. *FEBS Lett.* **371**, pp. 86-88.

Ip, C. (1998). Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. *J.Nutr.* **128**, pp. 1845-1854.

Ip, Y.T., and Davis, R. J. (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr.Opin.Cell.Biol.* **10**, pp. 205-219.

Ischiropoulos, H. (1998). Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch.Biochem.Biophys.* **356**, pp. 1-11.

Ischiropoulos, H., and al Mehdi, A. B. (1995). Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett.* **364**, pp. 279-282.

Ischiropoulos, H., Zhu, L., and Beckman, J. S. (1992). Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch.Biochem.Biophys.* **298**, pp. 446-451.

Jackson, R.M., Parish, G., and Helton, E. S. (1998). Peroxynitrite modulates MnSOD gene expression in lung epithelial cells. *Free Radic.Biol.Med.* **25**, pp. 463-472.

Janssen, Y.M., Matalon, S., and Mossman, B. T. (1997). Differential induction of c-fos, c-jun, and apoptosis in lung epithelial cells exposed to ROS or RNS. *Am.J.Physiol.* **273**, pp. L789-L796.

Jope, R.S., Zhang, L., and Song, L. (2000). Peroxynitrite modulates the activation of p38 and extracellular regulated kinases in PC12 cells. *Arch.Biochem.Biophys.* **376**, pp. 365-370.

Kaeck, M., Lu, J., Strange, R., Ip, C., Ganther, H. E., and Thompson, H. J. (1997). Differential induction of growth arrest inducible genes by selenium compounds. *Biochem. Pharmacol.* **53**, pp. 921-926.

Karin, M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **270**, pp. 16483-16486.

Kim, I. Y., and Stadtman, T. C. (1997). Inhibition of NF-kappaB DNA binding and nitric oxide induction in human T cells and lung adenocarcinoma cells by selenite treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, pp. 12904-12907.

Kirsch, M., and de Groot, H. (2000). Ascorbate is a potent antioxidant against peroxynitrite-induced oxidation reactions. Evidence that ascorbate acts by re-reducing substrate radicals produced by peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* **275**, pp. 16702-16708.

Kissner, R., Nauser, T., Bugnon, P., Lye, P. G., and Koppenol, W. H. (1997). Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, pp. 1285-1292.

Klotz, L. O., Pellieux, C., Briviba, K., Pierlot, C., Aubry, J. M., and Sies, H. (1999). Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA. *Eur. J. Biochem.* **260**, pp. 917-922.

Klotz, L. O., Schieke, S. M., Sies, H., and Holbrook, N. J. (2000). Peroxynitrite activates the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in human skin primary fibroblasts. *Biochem. J.* **352**, pp. 219-225.

Klug, D., Rabani, J., and Fridovich, I. (1972). A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. *J. Biol. Chem.* **247**, pp. 4839-4842.

Knebel, A., Rahmsdorf, H. J., Ullrich, A., and Herrlich, P. (1996). Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J.* **15**, pp. 5314-5325.

- Kondo,H., Takahashi, M., and Niki, E. (1997). Peroxynitrite-induced hemolysis of human erythrocytes and its inhibition by antioxidants. *FEBS Lett.* **413**, pp. 236-238.
- Kong,S.K., Yim, M. B., Stadtman, E. R., and Chock, P. B. (1996b). Peroxynitrite disables the tyrosine phosphorylation regulatory mechanism: Lymphocyte-specific tyrosine kinase fails to phosphorylate nitrated cdc2(6-20)NH₂ peptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **93**, pp. 3377-3382.
- Konorev,E.A., Hogg, N., and Kalyanaraman, B. (1998). Rapid and irreversible inhibition of creatine kinase by peroxynitrite. *FEBS Lett.* **427**, pp. 171-174.
- Kooy,N.W., and Royall, J. A. (1994). Agonist-induced peroxynitrite production from endothelial cells. *Arch.Biochem.Biophys.* **310**, pp. 352-359.
- Koppenol,W.H. (1998). The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Radic.Biol.Med.* **25**, pp. 385-391.
- Koppenol,W.H., Moreno, J. J., Pryor, W. A., Ischiropoulos, H., and Beckman, J. S. (1992). Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem.Res.Toxicol.* **5**, pp. 834-842.
- Köhrle,J. (1999). The trace element selenium and the thyroid gland. *Biochimie* **81**, pp. 527-533.
- Kryukov,G.V., Kryukov, V. M., and Gladyshev, V. N. (1999). New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. *J.Biol.Chem.* **274**, pp. 33888-33897.
- Kyriakis,J.M., and Avruch, J. (1990). pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L- lysine. *J.Biol.Chem.* **265**, pp. 17355-17363.
- Kyriakis,J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J., and Woodgett, J. R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**, pp. 156-160.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, pp. 680-685.

- Lancaster, J.R., Jr. (1994). Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **91**, pp. 8137-8141.
- Lander, H.M., Jacovina, A. T., Davis, R. J., and Tauras, J. M. (1996). Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species. *J.Biol.Chem.* **271**, pp. 19705-19709.
- Lee, S.R., Kim, J. R., Kwon, K. S., Yoon, H. W., Levine, R. L., Ginsburg, A., and Rhee, S. G. (1999). Molecular cloning and characterization of a mitochondrial selenocysteine-containing thioredoxin reductase from rat liver. *J.Biol.Chem.* **274**, pp. 4722-4734.
- Lescure, A., Gautheret, D., Carbon, P., and Krol, A. (1999). Novel selenoproteins identified in silico and in vivo by using a conserved RNA structural motif. *J.Biol.Chem.* **274**, pp. 38147-38154.
- Li, X., De Sarno, P., Song, L., Beckman, J. S., and Jope, R. S. (1998). Peroxynitrite modulates tyrosine phosphorylation and phosphoinositide signalling in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: attenuated effects in human 1321N1 astrocytoma cells. *Biochem.J.* **331 (Pt 2)**, pp. 599-606.
- Lin, K.T., Xue, J. Y., Lin, M. C., Spokas, E. G., Sun, F. F., and Wong, P. Y. (1998). Peroxynitrite induces apoptosis of HL-60 cells by activation of a caspase-3 family protease. *Am.J.Physiol.* **274**, pp. C855-C860.
- Liu, Q., Lauridsen, E., and Clausen, J. (1999). The major selenium-containing protein in human peripheral granulocytes. *Biol.Trace Elem.Res.* **68**, pp. 193-207.
- Loschen, G., Azzi, A., Richter, C., and Flohe, L. (1974). Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett.* **42**, pp. 68-72.
- Low, S.C., and Berry, M. J. (1996). Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes. *Trends Biochem.Sci.* **21**, pp. 203-208.
- Lu, J., Jiang, C., Kaeck, M., Ganther, H., Vadhanavikit, S., Ip, C., and Thompson, H. (1995). Dissociation of the genotoxic and growth inhibitory effects of selenium. *Biochem.Pharmacol.* **50**, pp. 213-219.

- Lymar, S.V., and Hurst, J. K. (1995). Rapid reaction between peroxynitrite ion and carbon dioxide: implications for biological activity. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, pp. 8867-8868.
- Machado, A.K., Morgan, B. A., and Merrill, G. F. (1997). Thioredoxin reductase-dependent inhibition of MCB cell cycle box activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **272**, pp. 17045-17054.
- MacMillan-Crow, L.A., Crow, J. P., Kerby, J. D., Beckman, J. S., and Thompson, J. A. (1996). Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, pp. 11853-11858.
- Malinski, T., Bailey, F., Zhang, Z. G., and Chopp, M. (1993). Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **13**, pp. 355-358.
- Malinski, T., and Taha, Z. (1992). Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature* **358**, pp. 676-678.
- Masumoto, H., Kissner, R., Koppenol, W. H., and Sies, H. (1996). Kinetic study of the reaction of ebselen with peroxynitrite. *FEBS Lett.* **398**, pp. 179-182.
- Masumoto, H., and Sies, H. (1996). The reaction of ebselen with peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, pp. 262-267.
- McCord, J.M., and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**, pp. 6049-6055.
- Medina, D., and Morrison, D. G. (1988). Current ideas on selenium as a chemopreventive agent. *Pathol. Immunopathol. Res.* **7**, pp. 187-199.
- Minden, A., and Karin, M. (1997). Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim. Biophys. Acta* **1333**, pp. F85-F104.
- Miranda-Vizueté, A., Damdimopoulos, A. E., Pedrajas, J. R., Gustafsson, J. A., and Spyrou, G. (1999). Human mitochondrial thioredoxin reductase cDNA cloning, expression and genomic organization. *Eur. J. Biochem.* **261**, pp. 405-412.

Misko, T. P., Highkin, M. K., Veenhuizen, A. W., Manning, P. T., Stern, M. K., Currie, M. G., and Salvemini, D. (1998). Characterization of the cytoprotective action of peroxynitrite decomposition catalysts. *J. Biol. Chem.* **273**, pp. 15646-15653.

Moreno, J. J., and Pryor, W. A. (1992). Inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor by peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, pp. 425-431.

Mostert, V. (2000). Selenoprotein P: properties, functions, and regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* **376**, pp. 433-438.

Motsenbocker, M. A., and Tappel, A. L. (1982). A selenocysteine-containing selenium-transport protein in rat plasma. *Biochim. Biophys. Acta* **719**, pp. 147-153.

Murphy, M. P., Packer, M. A., Scarlett, J. L., and Martin, S. W. (1998). Peroxynitrite: a biologically significant oxidant. *Gen. Pharmacol.* **31**, pp. 179-186.

Müller, T., Haussmann, H. J., and Schepers, G. (1997). Evidence for peroxynitrite as an oxidative stress-inducing compound of aqueous cigarette smoke fractions. *Carcinogenesis* **18**, pp. 295-301.

Nakano, M., Kimura, H., Hara, M., Kuroiwa, M., Kato, M., Totsune, K., and Yoshikawa, T. (1990). A highly sensitive method for determining both Mn- and Cu-Zn superoxide dismutase activities in tissues and blood cells. *Anal. Biochem.* **187**, pp. 277-280.

Oh-hashii, K., Maruyama, W., Yi, H., Takahashi, T., Naoi, M., and Isobe, K. (1999). Mitogen-activated protein kinase pathway mediates peroxynitrite-induced apoptosis in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, pp. 504-509.

Padmaja, S., Squadrito, G. L., Lemercier, J. N., Cueto, R., and Pryor, W. A. (1996). Rapid oxidation of DL-selenomethionine by peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* **21**, pp. 317-322.

Park, H. S., Huh, S. H., Kim, Y., Shim, J., Lee, S. H., Park, I. S., Jung, Y. K., Kim, I. Y., and Choi, E. J. (2000b). Selenite negatively regulates caspase-3 through a redox mechanism. *J. Biol. Chem.* **275**, pp. 8487-8491.

Park, H.S., Park, E., Kim, M. S., Ahn, K., Kim, I. Y., and Choi, E. J. (2000a). Selenite inhibits the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) through a thiol redox mechanism. *J.Biol.Chem.* **275**, pp. 2527-2531.

Persson-Moschos, M., Alfthan, G., and Akesson, B. (1998). Plasma selenoprotein P levels of healthy males in different selenium status after oral supplementation with different forms of selenium. *Eur.J.Clin.Nutr.* **52**, pp. 363-367.

Pfeiffer, S., Gorren, A. C. F., Schmidt, K., Werner, E. R., Hansert, B., Bohle, D. S., and Mayer, B. (1997). Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution. Reaction with nitric oxide and pH-dependent decomposition to nitrite and oxygen in a 2:1 stoichiometry. *J.Biol.Chem.* **272**, pp. 3465-3470.

Quijano, C., Alvarez, B., Gatti, R. M., Augusto, O., and Radi, R. (1997). Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *Biochem.J.* **322 (Pt 1)**, pp. 167-173.

Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., and Freeman, B. A. (1991b). Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch.Biochem.Biophys.* **288**, pp. 481-487.

Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., and Freeman, B. A. (1991a). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J.Biol.Chem.* **266**, pp. 4244-4250.

Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J., and Davis, R. J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J.Biol.Chem.* **270**, pp. 7420-7426.

Rotruck, J.T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G., and Hoekstra, W. G. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* **179**, pp. 588-590.

Roussyn, I., Briviba, K., Masumoto, H., and Sies, H. (1996). Selenium-containing compounds protect DNA from single-strand breaks caused by peroxynitrite. *Arch.Biochem.Biophys.* **330**, pp. 216-218.

Roveri, A., Majorino, M., and Ursini, F. (1994). Enzymatic and immunological measurements of soluble and membrane-bound phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **233**, pp. 202-212.

Saeki, M., Kamisaki, Y., and Maeda, S. (2000). Involvement of mitogen-activated protein kinase in peroxynitrite-induced cell death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosci. Res.* **38**, pp. 213-216.

Saito, I., Asano, T., Sano, K., Takakura, K., Abe, H., Yoshimoto, T., Kikuchi, H., Ohta, T., and Ishibashi, S. (1998). Neuroprotective effect of an antioxidant, ebselen, in patients with delayed neurological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **42**, pp. 269-277.

Salgo, M. G., Stone, K., Squadrito, G. L., Battista, J. R., and Pryor, W. A. (1995). Peroxynitrite causes DNA nicks in plasmid pBR322. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**, pp. 1025-1030.

Sampson, J. B., Ye, Y., Rosen, H., and Beckman, J. S. (1998). Myeloperoxidase and horseradish peroxidase catalyze tyrosine nitration in proteins from nitrite and hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **356**, pp. 207-213.

Schieke, S. M., Briviba, K., Klotz, L. O., and Sies, H. (1999). Activation pattern of mitogen-activated protein kinases elicited by peroxynitrite: attenuation by selenite supplementation. *FEBS Lett.* **448**, pp. 301-303.

Schöpfer, F., Riobo, N., Carreras, M. C., Alvarez, B., Radi, R., Boveris, A., Cadenas, E., and Poderoso, J. J. (2000). Oxidation of ubiquinol by peroxynitrite: implications for protection of mitochondria against nitrosative damage. *Biochem. J.* **349**, pp. 35-42.

Schuckelt, R., Brigelius-Flohé, R., Majorino, M., Roveri, A., Reumkens, J., Straßburger, W., Ursini, F., Wolf, B., and Flohé, L. (1991). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a selenoenzyme distinct from the classical glutathione peroxidase as evident from cDNA and amino acid sequencing. *Free Radic. Comms.* **14**, pp. 343-361.

Scorza, G., and Minetti, M. (1998). One-electron oxidation pathway of thiols by peroxynitrite in biological fluids: bicarbonate and ascorbate promote the formation of

albumin disulphide dimers in human blood plasma. *Biochem.J.* **329 (Pt 2)**, pp. 405-413.

Sharov, V.S., Briviba, K., and Sies, H. (1999). Peroxynitrite diminishes gap junctional communication: protection by selenite supplementation. *IUBMB.Life* **48**, pp. 379-384.

Sies, H. (1986). Biochemie des oxidativen Stress. *Angew.Chem.* **98**, pp. 1061-1675.

Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur.J.Biochem.* **215**, pp. 213-219.

Sies, H., and Masumoto, H. (1997). Ebselen as a glutathione peroxidase mimic and as a scavenger of peroxynitrite. *Adv.Pharmacol.* **38**, pp. 229-246.

Sies, H., Sharov, V. S., Klotz, L.-O., and Briviba, K. (1997). Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J.Biol.Chem.* **272**, pp. 27812-27817.

Sinha, R., and Medina, D. (1997). Inhibition of cdk2 kinase activity by methylselenocysteine in synchronized mouse mammary epithelial tumor cells. *Carcinogenesis* **18**, pp. 1541-1547.

Skinner, K.A., White, C. R., Patel, R., Tan, S., Barnes, S., Kirk, M., Darley-Usmar, V., and Parks, D. A. (1998). Nitrosation of uric acid by peroxynitrite. Formation of a vasoactive nitric oxide donor. *J.Biol.Chem.* **273**, pp. 24491-24497.

Sliwkowski, M.X., and Stadtman, T. C. (1985). Incorporation and distribution of selenium into thiolase from *Clostridium kluyveri*. *J.Biol.Chem.* **260**, pp. 3140-3144.

Stapleton, S.R., Garlock, G. L., Foellmi-Adams, L., and Kletzien, R. F. (1997). Selenium: potent stimulator of tyrosyl phosphorylation and activator of MAP kinase. *Biochim.Biophys.Acta* **1355**, pp. 259-269.

Stern, M.K., Jensen, M. P., and Kramer, K. (1996). Peroxynitrite decomposition catalysts. *J.Am.Chem.Soc.* **118**, pp. 8735-8736.

Straif, D., Werz, O., Kellner, R., Bahr, U., and Steinhilber, D. (2000). Glutathione peroxidase-1 but not -4 is involved in the regulation of cellular 5-lipoxygenase activity in monocytic cells. *Biochem.J.* **349**, pp. 455-461.

Szabo,C., Zingarelli, B., O'Connor, M., and Salzman, A. L. (1996). DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **93**, pp. 1753-1758.

Takahashi,K., Avissar, N., Whitin, J., and Cohen, H. (1987). Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch.Biochem.Biophys.* **256**, pp. 677-686.

Takakura,K., Beckman, J. S., MacMillan-Crow, L. A., and Crow, J. P. (1999). Rapid and irreversible inactivation of protein tyrosine phosphatases PTP1B, CD45, and LAR by peroxynitrite. *Arch.Biochem.Biophys.* **369**, pp. 197-207.

Tamura,T., and Stadtman, T. C. (1996). A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **93**, pp. 1006-1011.

Thelander,L., and Reichard, P. (1979). Reduction of ribonucleotides. *Annu.Rev.Biochem.* **48**, pp. 133-158.

Ursini,F., Majorino, M., Valente, M., Ferri, L., and Gregolin, C. (1982). Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim.Biophys.Acta* **710**, pp. 197-211.

van der Vliet,A., Hristova, M., Cross, C. E., Eiserich, J. P., and Goldkorn, T. (1998). Peroxynitrite induces covalent dimerization of epidermal growth factor receptors in A431 epidermoid carcinoma cells. *J.Biol.Chem.* **273**, pp. 31860-31866.

Vendeland,S.C., Beistein, M. A., Yeh, J. Y., Ream, W., and Whanger, P. D. (1995). Rat skeletal muscle selenoprotein W: cDNA clone and mRNA modulation by dietary selenium. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **92**, pp. 8749-8753.

Virag,L., Scott, G. S., Cuzzocrea, S., Marmer, D., Salzman, A. L., and Szabo, C. (1998). Peroxynitrite-induced thymocyte apoptosis: the role of caspases and poly (ADP-ribose) synthetase (PARS) activation. *Immunology* **94**, pp. 345-355.

Wang,X., Martindale, J. L., Liu, Y., and Holbrook, N. J. (1998). The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem.J.* **333**, pp. 291-300.

Whiteman,M., and Halliwell, B. (1996). Protection against peroxynitrite-dependent tyrosine nitration and alpha 1-antiproteinase inactivation by ascorbic acid. A comparison with other biological antioxidants. *Free Radic.Res.* **25**, pp. 275-283.

Whitmarsh,A.J., and Davis, R. J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction. *J.Mol.Med.* **74**, pp. 589-607.

Yamaguchi,T., Sano, K., Takakura, K., Saito, I., Shinohara, Y., Asano, T., and Yasuhara, H. (1998). Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. Ebselen Study Group. *Stroke* **29**, pp. 12-17.

Yang,J.G., Morrison-Plummer, J., and Burk, R. F. (1987). Purification and quantitation of a rat plasma selenoprotein distinct from glutathione peroxidase using monoclonal antibodies. *J.Biol.Chem.* **262**, pp. 13372-13375.

Yeh,J.Y., Vendeland, S. C., Gu, Q., Butler, J. A., Ou, B. R., and Whanger, P. D. (1997). Dietary selenium increases selenoprotein W levels in rat tissues. *J.Nutr.* **127**, pp. 2165-2172.

Zhang,P., Wang, Y. Z., Kagan, E., and Bonner, J. C. (2000). Peroxynitrite targets the epidermal growth factor receptor, Raf-1, and MEK independently to activate MAPK. *J.Biol.Chem.* **275**, pp. 22479-22486.

Zhu,L., Gunn, C., and Beckman, J. S. (1992). Bactericidal activity of peroxynitrite. *Arch.Biochem.Biophys.* **298**, pp. 452-457.

Zou,M.-H., and Ullrich, V. (1996). Peroxynitrite formed by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide selectively inhibits bovine aortic prostacyclin synthase. *FEBS Lett.* **382**, pp. 101-104.

7. Anhang

Anhang 1: Lebenslauf Stefan Michael Schieke

- 22.09.73 Geburt in Frankfurt am Main
- 8/80-7/84 Besuch der Maria-Montessori-Grundschule in Düsseldorf-Stockum
- 8/84-6/93 Besuch des Theodor-Fliedner-Gymnasium in Düsseldorf-Kaiserswerth
Abitur: 06.06.93
- 8/93-9/94 Zivildienst in den Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-
Universität (Immunologisches Labor der Blutbank, Prof. Dr. E.M.
Schneider)
- 10/94-6/01 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
- 9/97-7/99 Doktorarbeit im Labor von Prof. Dr. Dr. H. Sies,
Institut für Physiologische Chemie I, Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
Thema: Intrazelluläre Signaltransduktion unter dem Einfluss von
Peroxynitrit
- seit 8/99 Mitarbeit in der Forschungsgruppe Experimentelle Photodermatologie
(Prof. Dr. J. Krutmann) der Hautklinik der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
Thema: Charakterisierung der Infrarotlicht-induzierten
Signaltransduktion in menschlichen Hautfibroblasten
- 9-10/99 Forschungsaufenthalt im Labor von Dr. N. J. Holbrook,
Laboratory of Biological Chemistry, National Institute on Aging, National
Institutes of Health (Baltimore, MD, USA)
Thema: Einfluss von Peroxynitrit auf den PI3K/Akt-
Signaltransduktionsweg

Anhang 2: Veröffentlichungen und Poster / Vorträge

Veröffentlichungen

Schieke, S.M., Briviba, K., Klotz, L.O., and Sies, H. (1999). Activation pattern of mitogen-activated protein kinases elicited by peroxynitrite: attenuation by selenite supplementation. *FEBS Lett* **448**, 301-303.

Klotz, L.O., Schieke, S.M., Sies, H., and Holbrook, N.J. (2000). Peroxynitrite activates the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in human skin primary fibroblasts. *Biochem J* **352**, 219-225.

Schieke, S.M., Stege, H., Kürten, V., Grether-Beck, S., Sies, H., and Krutmann, J. (2001). Infrared A radiation-induced matrixmetalloproteinase-1 expression is mediated through ERK1/2 activation in human dermal fibroblasts. (zur Veröffentlichung eingereicht).

Klotz, L.O., Arteel, G.E., Schieke, S.M., and Sies, H. (2000). Protein tyrosine nitration by peroxynitrite: role of selenium in protection. In *Free Radicals in Chemistry, Biology and Medicine*. Yoshikawa,T., Toyokuni,S., Yamamoto,Y., Naito,Y. (Eds.), OICA International.

Sies, H., Klotz, L.O., Schieke, S.M., Briviba, K., and Arteel, G. (2000). Selenium and the protection against peroxynitrite. In *Trace Elements in Man and Animals 10*. Roussel et al. (Eds.), Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.

Schieke, S.M., Briviba, K., Klotz, L.O., and Sies, H. (1999). Activation pattern of mitogen-activated protein kinases elicited by peroxynitrite: attenuation by selenite supplementation. *Biol Chem* **380**, S192 (Abstract).

Schieke, S.M., Stege, H., Kürten, V., Thiele, J., Sies, H., and Krutmann J. (2000). Analysis of infrared radiation-induced intracellular signaling in human dermal fibroblasts. *Biol Chem* **381**, S212 (Abstract).

Klotz, L.O., Schieke, S.M., Sies, H., and Holbrook, N.J. (2000). Peroxynitrite activates the PI3K/Akt pathway in primary human skin fibroblasts. *Biol Chem* **381**, S241 (Abstract).

Poster / Vorträge

Schieke, S.M., Briviba, K., Klotz, L.O., and Sies, H.: *Activation pattern of MAPKs by peroxynitrite cultured in rat liver epithelial cells: Attenuation by selenite supplementation.* „Gordon Conference on Nitric Oxide“, 7.-12. Februar 1999, Ventura, CA, USA

Schieke, S.M., Briviba, K., Klotz, L.O., and Sies, H.: *Activation pattern of mitogen-activated protein kinases elicited by peroxynitrite: attenuation by selenite supplementation.* „Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie“, 5.-8. September 1999, Hamburg

Schieke, S.M., Stege, H., Kürten, V., Thiele, J., Sies, H., and Krutmann J.: *Analysis of infrared radiation-induced intracellular signaling in human dermal fibroblasts.* „Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie“, 10.-13. Okt 2000, München

Klotz, L.O., Schieke, S.M., Sies, H., and Holbrook, N.J.: *Peroxynitrite activates the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in human skin primary fibroblasts.* „Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie“, 10.-13. Okt 2000, München

Schieke SM: *Effect of selenite supplementation on p38-MAP kinase activation by nitric oxide or peroxynitrite.* "Krickenbeck Meeting I", 2.-3. Juni 1998, Akademie Schloss Krickenbeck

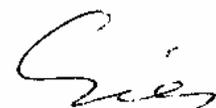
Schieke SM: *Nitrosative Stress and Cellular Signal Transduction.* "Research Meeting Krickenbeck II", 11. Dezember 1999, Düsseldorf

**Abstract: Aktivierung Mitogen-aktivierter Proteinkinasen durch Peroxynitrit:
Abschwächung durch Selensupplementierung**

In der Reaktion der beiden Radikale Superoxid, $O_2^{\cdot-}$, und Stickstoffmonoxid, NO , entsteht Peroxynitrit, welches im Organismus von aktivierten Makrophagen, Endothelzellen etc. gebildet wird. Diese oxidierende und nitrierende Verbindung spielt bei zahlreichen Erkrankungen eine Rolle, z.B. bei neurodegenerativen Erkrankungen oder Entzündungsvorgängen. Als Teil der zellulären Antwort auf äußere Stimuli wie inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren oder UV-Strahlung kommt es zur Aktivierung von MAP Kinase-Signalwegen, die über eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, z.B. AP-1, zu einer Modulation der Genexpression führen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von Peroxynitrit auf MAP Kinasen in Rattenleberepithelzellen (WB-F344) untersucht. Dazu wurde ein Infusionssystem entwickelt, das es ermöglichte, die Zellen einer Fließgleichgewichtskonzentration von Peroxynitrit auszusetzen. Bei einer 3-minütigen Exposition gegenüber $6,5 \mu M$ Peroxynitrit kam es zu einer Aktivierung von p38-MAPK, JNK1/2 und ERK1/2. Die dabei erfolgte Nitrierung von Tyrosinresten zellulärer Proteine ist als Marker für die Wirkung von Peroxynitrit anzusehen. Es zeigt sich somit, dass Peroxynitrit die zellulären Signaltransduktionswege aktivieren kann. Der Organismus hat eine Reihe von Mechanismen entwickelt, um sich gegen die schädlichen Einflüsse reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffspezies zu schützen. Intrazelluläre Selenoproteine stellen einen Teil dieses antioxidativen Schutzsystems dar. Die Glutathionperoxidase kann Peroxynitrit unter Oxidation von Glutathion zu Nitrit reduzieren. In dieser Arbeit wurde der Effekt einer Selensupplementierung des Kulturmediums auf die durch Peroxynitrit induzierte MAP Kinase-Aktivierung und Proteintyrosin-Nitrierung untersucht. Nach Inkubation von WB Zellen in selenithaltigem Medium ($1 \mu M$) für 48h kam es zu einem 13fachen Anstieg der Glutathionperoxidase-Aktivität. Eine Behandlung dieser selensupplementierten Zellen mit Peroxynitrit führte zu einer deutlich abgeschwächten MAP Kinase-Aktivierung und Tyrosin-Nitrierung. Diese Daten unterstreichen somit die protektive Rolle der Selenoproteine beim Schutz vor Peroxynitrit.

Stefan Michael Schieke



Prof. Dr. H. Sies

2.8.5.02