

Aus dem Institut für Molekulare Medizin, Abteilung für Immunbiologie
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Prof. Dr. rer. nat. K. Schulze-Osthoff

**REGULATION DER INTRAZELLULÄREN ZINK-HOMÖOSTASE
DURCH INOS-AKTIVITÄT: TRANSLOKATION VON
METALLOTHIONEIN IN DEN ZELLKERN UND
NACHFOLGENDE NUKLEÄRE ZINK-FREISETZUNG**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Daniela Ursula Spahl

Düsseldorf

2004

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Dekan

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Viktoria Kolb-Bachofen

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Helmut Sies

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Stickstoffmonoxid	1
1.1.1	NO-Synthese	1
1.1.2	Molekulare Wirkmechanismen von NO	2
1.2	Zink	4
1.2.1	Zinkmetabolismus	5
1.2.2	Zinkmangelzustände	5
1.3	Das Zinkspeicherprotein Metallothionein	6
1.3.1	Struktur und Funktion von Metallothionein	7
1.3.2	Die Lokalisation von MT bestimmt seine Funktion	8
1.4	Fragestellung	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Material	11
2.1.1	Chemikalien	11
2.1.2	Geräte	12
2.1.3	Materialien für die Zellkultur	12
2.1.4	Zytokine und biologische Proben	13
2.1.5	Fluoreszenzfarbstoffe	14
2.1.6	Antikörper	14
2.1.7	Zellen	15
2.1.8	Statistische Auswertung	15
2.2	Methoden	15
2.2.1	Isolierung und Kultur von Zellen	15
2.2.2	Immunhistochemische Färbung von Zellen	16
2.2.3	Fluoreszenzfärbung von Zellen	18
2.2.4	Semi quantitative RT-PCR	19
2.2.5	Griess-Test zur Nitritbestimmung	21
3	Ergebnisse	22
3.1	Induktion der induzierbaren NO-Synthase in Maus-Aorten-Endothelzellen	22
3.1.1	Kinetik der iNOS mRNA Expression	22

3.1.2	Proinflammatorische Zytokine bewirken eine iNOS abhängige NO-Synthese ...	23
3.2	Nachweis von intrazellulären Zn²⁺-Ionen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Zinquin	24
3.2.1	Proinflammatorische Zytokine führen zu einer Zn ²⁺ -Freisetzung im Zellkern ...	24
3.2.2	NO-abhängige Zn ²⁺ -Freisetzung.....	27
3.2.3	MT ist essentiell für die Zn ²⁺ -Freisetzung bei Entzündungsreaktionen.....	29
3.3	Immunhistochemische Lokalisation von Metallothionein.....	31
3.4	Regulation der Metallothionein mRNS Expression	34
3.4.1	Induktion von MT durch Schwermetall-Ionen	34
3.4.2	Einfluss von iNOS-synthetisiertem NO auf die MT-Induktion.....	38
3.4.3	Effekt von DETA/NO	39
3.4.4	Rolle von Zn ²⁺ bei der NO-medierten MT-Induktion.....	41
4	Diskussion	45
4.1	Einfluss von NO auf die intrazelluläre Zink-Homöostase.....	45
4.2	Die Rolle von MT bei der nukleären Zn ²⁺ -Freisetzung durch nitrosativen Stress	48
4.3	Die Rolle von NO und Zn ²⁺ bei der Genexpression von MT	53
5	Zusammenfassung	58
6	Literaturverzeichnis.....	59
7	Danksagung	79
8	Lebenslauf	80

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Zerstörung der Zinkfinger-Struktur durch NO.....	3
Abb. 2: Struktur von Metallothionein	7
Abb. 3: Kinetik der Zytokin-induzierten iNOS mRNA Induktion	22
Abb. 4: Nitritkonzentrationen aus Zellüberständen.....	24
Abb. 5: Intranukleäre Zn ²⁺ -Verteilung.....	26
Abb. 6: Zinquin-Färbung von Wildtyp MAEC.....	28
Abb. 7: Zinquin-Färbung von MAEC-MT _{1,2} ^{-/-}	30
Abb. 8: Immunhistochemischer Nachweis von MT-1 und -2.....	32
Abb. 9: Linescan nach immunhistochemischer MT-Färbung	33
Abb. 10: Induktion von MT-1/-2 durch Cd ²⁺ bzw. Zn ²⁺	36
Abb. 11: Kinetik der MT-1 und MT-2 mRNA Induktion durch proinflammatorische Zytokine	37
Abb. 12: Einfluss von NIO auf die MT-1 und MT-2 mRNA Expression nach Aktivierung mit Zytokinen.....	39
Abb. 13: Konzentrationsabhängige MT-1/-2 Induktion durch DETA/NO.....	40
Abb. 14: Zn ²⁺ -Deprivation durch höhere TPEN-Konzentrationen führt zur Apoptose	42
Abb. 15: Hemmung der NO-induzierten Steigerung der MT-1/-2 mRNA Expression durch TPEN.....	43
Abb. 16: Unterschiedliche Einflüsse von exogenem und durch iNOS synthetisiertem NO auf die Zn ²⁺ -Homöostase	47
Abb. 17: Zusammenhang zwischen MT-Translokation und Zn ²⁺ -Freisetzung im Zellkern.....	51
Abb. 18: Superinduktion von MT durch NO	56

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Antikörper
BSA	bovines Serumalbumin
DETA/NO	(Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammoniumethyl)amino]diazan-1-ium-1,2-diolat
DETA/NO _{NO}	denitrosiertes DETA/NO
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
EDTA	Ethylen-dinitrilo-tetraessigsäure
FCS	fötales Kälber Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethylsulfonsäure)
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1 β	Interleukin-1 β
iNOS	induzierbare NO-Synthase
MAEC-MT _{1,2} ^{-/-}	Maus-Aorten-Endothelzellen aus Metallothionein knockout Mäusen
MAEC-WT	Maus-Aorten-Endothelzellen aus Wildtyp Mäusen
MRE	Metall-responsives Element
MT	Metallothionein
MTF-1	Metall-responsiver Transkriptionsfaktor 1
NIO	L-N ⁵ -(1-Iminoethyl)-ornithin
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RT	reverse Transkriptase
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TPEN	N,N,N',N'-Tetrakis(2-Pyridylmethyl)-ethylendiamin
Zytokin-Mix	500 U/ml TNF- α + 500 U/ml IL-1 β + 500 U/ml IFN- γ

1 Einleitung

1.1 Stickstoffmonoxid

1987 entdeckte Louis Ignarro, dass das zuvor nur als Umweltgift angesehene Stickstoffmonoxid (NO) auch in Säugetieren produziert wird und ein wichtiger Mediator für die Regulation von Blutdruck und Plättchenfunktion ist. Es stellte sich heraus, dass der schon 1980 von Furchgott & Zawadzki postulierte „endothelium-derived relaxing factor“ (Furchgott & Zawadzki, 1980) mit NO identisch ist. Dieses führt über die Aktivierung der Guanylat-Zyklase (Gruetter *et al.*, 1979) zu einer Vasodilatation (Palmer *et al.*, 1987; Ignarro *et al.*, 1987). Kurz danach wurde die Bedeutung von NO als Neurotransmitter und als Effektormolekül der Immunabwehr entdeckt. Aktivierte Makrophagen können mittels einer induzierbaren NO-Synthase grosse Mengen an NO synthetisieren (Hibbs, Jr. *et al.*, 1987; Stuehr *et al.*, 1990).

1.1.1 NO-Synthese

NO wird durch Oxidation und Abspaltung eines Stickstoff-Atoms aus L-Arginin synthetisiert, wobei als Nebenprodukt L-Citrullin entsteht. Diese Reaktion wird durch die sogenannten NO-Synthasen (NOS) katalysiert. Es werden zwei konstitutive NO-Synthasen (ncNOS und ecNOS) und eine induzierbare NO-Synthase (iNOS) unterschieden. Die konstitutiven NO-Synthasen produzieren auf geeignete Stimuli (z.B. Ca^{2+}) hin für eine kurze Zeit „physiologische“ Konzentrationen an NO. Im Gegensatz dazu wird die induzierbare NO-Synthase nur bei Bedarf exprimiert (Nathan, 1992; Förstermann *et al.*, 1994). Befähigt sind hierzu praktisch alle kernhaltigen Körperzellen, wie z.B. Monozyten/Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Hepatozyten und Endothelzellen (Kröncke *et al.*, 1995). Die Expression der iNOS wird durch bakterielle Produkte wie etwa LPS (Arizono *et al.*, 1995) sowie proinflammatorische Zytokine, z.B. $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ und $\text{IL-1}\beta$ induziert. Andere Zytokine wie z.B. transforming growth factor- β , IL-4 und -10 führen hingegen zu einer Hemmung der iNOS Bildung. Auch Glukokortikoide hemmen die Expression der iNOS (Kunz *et al.*, 1996; Pfeilschifter *et al.*, 1996). Die iNOS ist in zahlreichen akuten und chronischen Entzündungsreaktionen exprimiert (Kröncke *et al.*, 1998; Zamora *et al.*, 2000). In aktivierten Zellen produziert die iNOS bei Substratsättigung über einen längeren Zeitraum NO in mikromolaren Steady-state-Konzentrationen (Laurent *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu den konstitutiven NO-Synthasen, deren Aktivität streng Ca^{2+} -abhängig ist, erfolgt die

Regulation der iNOS nicht durch direktes An- und Abschalten der Enzymaktivität. Sie wird vom Substratangebot (L-Arginin) und von der Enzym-Neubildung bestimmt (Marletta *et al.*, 1998).

1.1.2 Molekulare Wirkmechanismen von NO

Von Zellen synthetisiertes NO hat in biologischen Flüssigkeiten eine Halbwertszeit von wenigen Sekunden, da es rasch von molekularem Sauerstoff zu den stabilen Endprodukten Nitrit und Nitrat oxidiert wird. Als Zwischenprodukte treten reaktive Stickoxydverbindungen auf (z.B. N_2O_3), welche ihrerseits ein breiteres chemisches Reaktionsspektrum als NO selbst haben (Wink & Mitchell, 1998).

Die geringen physiologischen Mengen an NO, die von den konstitutiven NO-Synthasen produziert werden, führen im kardiovaskulärem System zu einer Aktivierung der Guanylat-Zyklase. Der nachfolgend entstehende intrazelluläre Signalfaktor cGMP wirkt vasodilatierend und antithrombotisch (Lowenstein *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1997). Durch die bei Entzündungsreaktionen exprimierte iNOS kommt über einen längeren Zeitraum es dagegen zur Produktion von grossen Mengen an NO, welche die physiologische NO-Freisetzung durch die konstitutiven Enzyme um etwa das 100-1000fache übersteigen kann. Das gebildete NO kann konzentrationsabhängig toxisch auf Bakterien, Pilze, Protozoen, Helminthen sowie Tumorzellen wirken (Hibbs, Jr. *et al.*, 1988; Stuehr & Nathan, 1989). Hierbei wird die Schädigung von gesundem Gewebe durch die erforderlichen hohen NO-Konzentrationen in Kauf genommen. Anders ist es bei chronisch entzündlichen Erkrankungen, bei denen das von der iNOS produzierte NO als schädigender, proinflammatorischer Mediator wirken kann (Kolb & Kolb-Bachofen, 1992; Kröncke *et al.*, 1998; Zamora *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2001). Bemerkenswert ist jedoch, dass NO auch der entzündlichen Gewebeschädigung entgegenwirken kann. NO supprimiert die T-Zell-Proliferation und -Aktivität (Hoffman *et al.*, 1993). Es inhibiert die Synthese von IL-6, Prostaglandin E_2 und Thromboxan in Makrophagen durch Hemmung der Zyklooxygenase (Salvemini *et al.*, 1995) sowie die Freisetzung von plättchenaktivierendem Faktor und Histamin aus Mastzellen (Cooke & Tsao, 1993; Loscalzo & Welch, 1995). Ausserdem bewirkt NO eine Hemmung der Adhäsion (Peng *et al.*, 1998) und die Migration neutrophiler Granulozyten (Kubes *et al.*, 1991).

NO besitzt ein ungepaartes Elektron, ist somit ein Radikal und kann durch Reaktion mit der Häm-Gruppe Enzyme des Energiestoffwechsels (Henry *et al.*, 1993) hemmen. Ausserdem wird die Reparatur von Nukleinsäuren durch Hemmung des DNS-Reparaturenzyms Formamidpyrimidin-DNS Glykolase beeinträchtigt (Laval & Wink, 1994).

Der Hauptreaktionspartner von NO in Proteinen ist die Aminosäure Cystein, deren SH-Gruppen mit NO in Gegenwart von O₂ zu S-Nitrosothiolen reagieren (Wink *et al.*, 1994; Kröncke, 2001a). SH-Gruppen sind unter anderem durch die Bildung von Fe-S und Zn-S Clustern essentiell für die Tertiärstruktur vieler Proteine. Dabei befinden sich Fe-S Cluster meist innerhalb oder in der Nähe katalytischer Zentren von Enzymen, die durch Nitrosierung inaktiviert werden können (Gopalakrishna *et al.*, 1993; Caselli *et al.*, 1994). Zn-S Cluster bilden relativ stabile „Loops“ in der Aminosäuren-Kette, die unter anderem als sogenannte Zinkfinger in Transkriptionsfaktoren (TF) mit der DNS, RNS oder Proteinen in Interaktion treten können (Klug & Schwabe, 1995). Kröncke *et al.* zeigten, dass NO unter aeroben Bedingungen Zn²⁺ aus Zinkfinger-Strukturen freisetzt, was über eine Strukturänderung zur Hemmung der spezifischen Bindung der Zinkfinger-TF an die DNS führt (Abb. 1) (Kröncke *et al.*, 1994; Kröncke & Carlberg, 2000). NO zerstört Zinkfinger-Proteine nicht irreversibel, da die Zinkfinger über das zelluläre Redoxsystem wieder regeneriert werden können (Kröncke & Carlberg, 2000; Kröncke *et al.*, 2002).

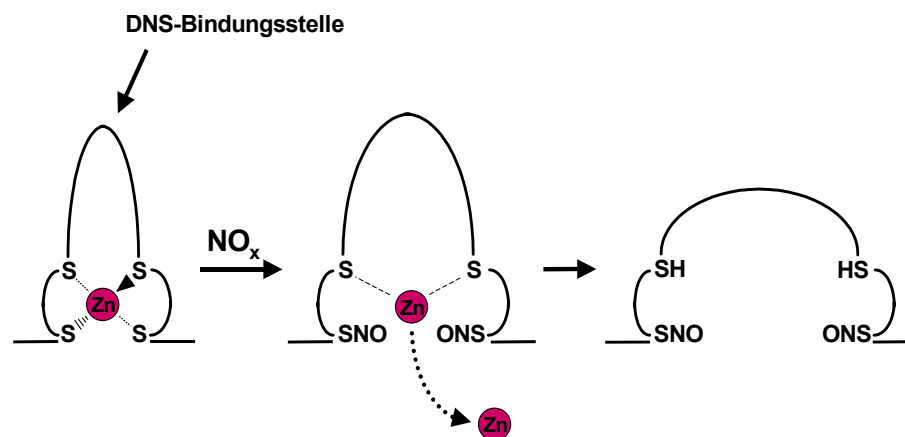


Abb. 1: Zerstörung der Zinkfinger-Struktur durch NO

Über die Komplexierung von Zinkionen in Zn-S Clustern bilden sich in Proteinen die sogenannten Zinkfinger. Diese Strukturen ermöglichen die spezifische Bindung an DNS, RNS oder Proteinen. Unter aeroben Bedingungen führt NO nach einer S-Nitrosierung zum Verlust von Zn²⁺ und zu einer nachfolgenden Konformationsänderung der Proteine, wodurch sie ihre Bindungsaktivität verlieren (Kröncke *et al.*, 1995).

Somit gibt es erste Hinweise, dass NO auch ein Signalmolekül in der Genregulation ist (Kröncke, 2001a). Wenn der TF ein Aktivator ist, kann NO zur Inaktivierung von Genen führen. Ist der TF jedoch ein Repressor, kann die Aufhebung der DNS-Bindung zur Transkription führen, vorausgesetzt, die nun aktiven TF sind nicht redox-sensitiv (Kröncke, 2001a). Ein anderes Beispiel ist der Transkriptionsfaktor OxyR, der ein Sensor für Redoxstress in Bakterien ist und dort die Transkription von protektiven Enzymen wie Katalase und Glutathionreduktase induziert. Die NO-abhängige S-Nitrosierung der Cysteine in OxyR

ermöglicht erst die spezifische DNS-Bindung mit nachfolgender Transkription (Kolb-Bachofen *et al.*, 2000; Marshall *et al.*, 2000). Die NO-abhängige Hemmung der NF- κ B DNS-Bindungsaktivität wird im Gegensatz zu den zuvor genannten TF wahrscheinlich direkt über eine S-Nitrosierung erreicht (Kolb-Bachofen *et al.*, 2000).

Seit mehreren Jahren ist bekannt, dass NO mittels S-Nitrosierung von Cystein-SH-Gruppen und anschließender Bildung von Disulfid-Gruppen Zink-Ionen aus dem Zn^{2+} -Speicherprotein Metallothionein (MT) freisetzt (Kröncke *et al.*, 1994; Misra *et al.*, 1996; Zangger *et al.*, 2001). Pearce *et al.* transfizierten Zellen mit einem Fusionsprotein aus MT und einem grün fluoreszierendem Protein (Pearce *et al.*, 2000b). Eine Aktivierung der eNOS bewirkte eine Konformationsänderung des Proteins, welches auf eine Zn^{2+} -Freisetzung aus MT hinweist (Pearce *et al.*, 2000a). Zusätzlich wurde gefunden, dass auch exogen hinzugefügtes NO eine S-Nitrosierung induziert (Liu *et al.*, 2001). Somit konnte gezeigt werden, dass NO eine Regulation der Zink-Homöostase über Interaktion mit MT bewirkt (St Croix *et al.*, 2002; Gow & Ischiropoulos, 2002).

Hier wurden nur einige Wirkmechanismen von NO beschrieben, die hoffentlich etwas von der Faszination zeigen können, die von diesem kleinem Molekül ausgeht, welches sowohl zytotoxisch als auch zytoprotektiv wirken kann. Es scheint, dass abhängig von der Dauer und Stärke der Aktivierung der iNOS es zu sehr unterschiedlichen Reaktionen kommen kann, welche wir aufgrund unseres bisherigen Wissens noch nicht vorhersagen können. Diese Problematik bekommt eine besondere Bedeutung im Hinblick auf die Therapie von chronisch entzündlichen, autoimmunen oder Tumorerkrankungen, die entweder von der Gabe von NO-Donoren oder von einer selektiven Hemmung der iNOS profitieren könnten (Kröncke *et al.*, 2000).

1.2 Zink

Zink in Form von Zinkionen ist ein essentieller Mikronährstoff, der für die DNS-Synthese, die Zellteilung und die Proteinsynthese benötigt wird. Als strukturelle und/oder funktionelle Komponente in Metalloenzymen und Metalloproteinen (Coleman, 1992) hat es zwei Wirkungen. Auf der einen Seite hält es durch koordinative Bindungen mehrere Aminosäurenketten des Proteins in einer bestimmten Anordnung fest, welche zur Einleitung der enzymatischen Reaktion günstig ist. Auf der anderen Seite kann es durch weitere koordinative Bindungen das Substrat festhalten, polarisieren und zur Reaktion aktivieren. Somit hat Zink Einfluss auf viele Aspekte des Zellmetabolismus. Besonders wichtig ist hierbei

seine Funktion im Immunsystem (Fraker *et al.*, 2000), die Rolle als Antioxidans (Powell, 2000) sowie die Beeinflussung von Wachstum und Entwicklung (MacDonald, 2000).

1.2.1 Zinkmetabolismus

Eine adäquate Zinkaufnahme mit der Nahrung und die Aufrechterhaltung der Zn^{2+} -Homöostase ist von besonderer Bedeutung für die Integrität des Organismus. Ein gesunder Erwachsener hat etwa 2-3 g (30-45 mmol) Zink, wovon sich 99% intrazellulär befindet. Der tägliche Zinkbedarf liegt bei 10-15 mg und wird normalerweise mit der in den Industriestaaten üblichen Ernährung gedeckt. Der primäre Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Zn^{2+} -Homöostase ist die Absorption und Exkretion von Zink im Gastrointestinaltrakt. Zink wird im Jejunum und Ileum resorbiert und im Blut an Plasmaproteine (hauptsächlich Albumin) gebunden. Das an Plasmaproteine gebundene Zink macht 22% des Zinks im Blut aus, der Rest findet sich in den Erythrozyten und Leukozyten. Die Normalkonzentration im Plasma beträgt 15-20 $\mu\text{mol/l}$ (King *et al.*, 2000). Die Zinkkonzentration im Plasma unterliegt einem circadianen Rhythmus. Er wird durch Hormone und Zytokine beeinflusst: Glukokortikoide stimulieren die Zinkaufnahme in die Leber, IL-1 und IL-6 führen im Rahmen der Akutphaseantwort zu einem Abfall des Zinkspiegels durch Aufnahme in verschiedene Gewebe. Die Ausscheidung von Zink aus dem Organismus erfolgt vorwiegend über den Stuhl. Der Plasmazinkspiegel eignet sich aufgrund dieser homöostatischen Regulation nicht zur Beurteilung des Zinkstatus, da dieser sich auch bei Schwankung der Zinkaufnahme nur geringfügig verändert. Bestimmung des Zinkgehaltes aus Haaren, Urin, Schweiß oder Speichel ist auch nicht verlässlich (King, 1990; Van Wouwe, 1995). Auf zellulärer Ebene scheint das Zinkspeicherprotein Metallothionein eine zentrale Rolle in der Regulation des Zinkmetabolismus zu spielen (Richards, 1989; Kagi, 1991). Die Analyse von Leukozyten und Erythrozyten bezüglich ihrer Metallothionein-Expression scheint ein geeigneter Ansatz bei der Beurteilung des Zinkstatus im Organismus zu sein (Sullivan *et al.*, 1998; Cao & Cousins, 2000).

1.2.2 Zinkmangelzustände

Die besondere Bedeutung von Zink wird klar, wenn man sich vergegenwärtigt, welche unterschiedlichen Erkrankungen mit einem Zinkmangel in Zusammenhang gebracht werden. Dabei ist Zinkmangel selbst in den Industrieländern ein relativ häufiges Gesundheitsproblem (Endre *et al.*, 1990; Roth & Kirchgessner, 1999). Eine suboptimale Zinkaufnahme wird vor

allem bei Kindern mit geringem Geburtsgewicht (Sazawal *et al.*, 2001; Salgueiro *et al.*, 2002; Dorea, 2002; Chandra, 2002), Kindern in der Präpubertät (Mahmoodi & Kimiagar, 2001; Salgueiro *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2002) und bei älteren Menschen (Abbasi & Shetty, 1999) beobachtet. Gleichzeitig tritt ein Zinkmangel bei einer Vielzahl von Erkrankungen auf, wie z.B. Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, Nierenerkrankungen, Sichelzellanämie (Zemel *et al.*, 2002; Prasad, 2002), Alkoholismus, AIDS (Kupka & Fawzi, 2002) und Verbrennungen. Ein angeborener Zinkmangel besteht bei der *Acrodermatitis enteropathica* (Sehgal & Jain, 2000), bei der unter anderem Hauteffloreszenzen (Vesikel- und Pustelbildung durch gestörte Basalzellproliferation) sowie gastrointestinale Beschwerden charakteristisch sind. Zugrunde liegt hierbei wahrscheinlich ein genetischer Defekt des Zinktransports (Kury *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2002; Kury *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002) in die Mucosazellen, der zu einem Abfall der Zinkplasmakonzentration führt. Die Zinksubstitution bewirkt eine komplette klinische Remission (Brown *et al.*, 2002; Radja & Charles-Holmes, 2002). Weitere Störungen, die mit Zinkmangel in Zusammenhang gebracht werden, sind unter anderem Wundheilungsstörungen (Agren, 1990; MacDonald, 2000), Störungen des Geschmackssinnes (Tanaka, 2002) sowie des Gedächtnisses (Takeda *et al.*, 2000) und Makulaveränderungen (Grahn *et al.*, 2001; Ugarte & Osborne, 2001).

Zinkmangelzustände sind eng mit einer Beeinträchtigung des Immunsystems verknüpft, da sie zu einem schnellen Verlust der zellulären und antikörpervermittelten Immunantwort führen (Keen & Gershwin, 1990; Fraker *et al.*, 2000). Die bei Zinkmangel zu beobachtende Thymusatrophie und Lymphopenie kann durch den verringerten Anteil von prä-T- und prä-B-Zellen im Knochenmark erklärt werden (Kolenko *et al.*, 2001). Als mögliche Mechanismen für die verringerte Anzahl an lymphozytären Vorläuferzellen wird eine erhöhte Apoptose-Rate sowie eine verstärkte Glukokortikoidsynthese angenommen (Mori *et al.*, 2001; King *et al.*, 2002). Die Identifizierung der Ursachen von Lymphopenie könnte eine neue Therapiemöglichkeit zur Verbesserung des Immunstatus bieten (Fraker & King, 2001; Lastra *et al.*, 2001).

1.3 Das Zinkspeicherprotein Metallothionein

Das intrazelluläre Zinkspeicherprotein Metallothionein (MT) spielt eine wichtige regulierende Rolle bei der Aufnahme, Verteilung, Speicherung und Freisetzung von Zink. Obwohl MT schon seit vielen Jahren Grundlage intensiver Forschung ist, wurde seine Bedeutung noch immer nicht endgültig geklärt (Palmiter, 1998; Coyle *et al.*, 2002).

1.3.1 Struktur und Funktion von Metallothionein

Metallothionein wurde 1957 zum ersten Mal in der Nierenrinde von Pferden nachgewiesen (Margoshes M. & Vallee, 1957). Die Struktur des murinen MT-1 Gens wurde 1981 aufgeklärt (Glanville *et al.*, 1981). In Säugetieren sind bisher vier verschiedene MT-Isoformen bekannt. Alle MT-Isoformen besitzen ein niedriges Molekulargewicht (6000-7000 D) und bestehen aus ca. 60-68 Aminosäuren (Kagi & Kojima, 1987; Kagi & Schaffer, 1988). MT-1 und MT-2 kommen ubiquitär im Gewebe vor, wobei in Leber, Pankreas, Darm und Nieren eine erhöhte Expression gefunden wurde. Die Isoformen MT-3 und MT-4 sind hauptsächlich im Gehirn (Montoliu *et al.*, 2000) und in der Haut vorhanden (Moffatt & DenizEAU, 1997).

Die Analyse der 3-dimensionalen Struktur von MT zeigte, dass es sich um ein monomeres Protein handelt. Es ist zusammengesetzt aus zwei globulären Domänen (Boulanger *et al.*, 1982), von denen die α -Domäne bis zu 3 und die β -Domäne bis zu 4 Metallionen in Metall-Schwefel-Clustern binden kann (Abb. 2) (Riek *et al.*, 1999). Die in den Clustern verwendeten Schwefelatome werden von 20 Cysteinen zur Verfügung gestellt. Zink ist das Metall, welches hauptsächlich von MT gebunden wird, wodurch Zn-MT entsteht. Selbst in evolutionär entfernten MT existieren ähnliche Metall-Schwefel-Cluster, was die besondere Bedeutung dieser Strukturen zeigt (Vasak & Hasler, 2000).

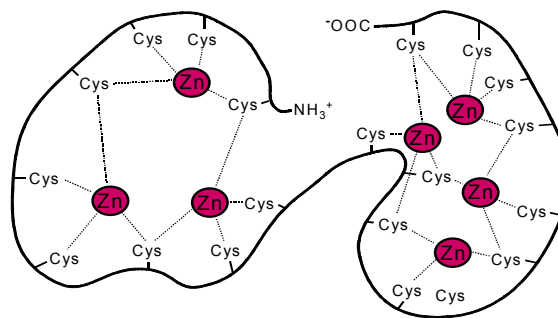


Abb. 2: Struktur von Metallothionein

Metallothionein (MT), ein intrazelluläres Metalloprotein mit dem Molekulargewicht von 6-7 kD besteht zu einem Drittel aus Cysteinen. Über Zn-S Bindungen können bis zu 7 Zinkionen komplexiert werden (Kröncke, 1998).

Die Entwicklung von transgenen Mäusen, bei denen entweder eine Deletion (Michalska & Choo, 1993) oder eine Überexpression (Lohrer & Robson, 1989); (Palmiter *et al.*, 1993) der Gene für MT-1 und MT-2 erzeugt wurde, half die biologische Funktion von MT zu untersuchen. MT knock-out ($MT_{1,2}^{-/-}$) Mäuse haben einen normalen Phänotyp und sind in der Lage, sich zu reproduzieren und den Nachwuchs aufzuziehen (Masters *et al.*, 1994). Sie sind

moderat adipös, was darauf hindeuten könnte, dass MT eine Rolle bei der Regulierung des Metabolismus spielt (Beattie *et al.*, 1998).

Eine Hauptfunktion von Metallothionein scheint die Regulation der Zink-Homöostase zu sein. Die Zinkanreicherung im Gewebe korreliert mit einer *de novo* MT-Synthese (Richards & Cousins, 1975; McCormick *et al.*, 1981). Die Vorform von Metallothionein, Apothionein hat keine Metallionen gebunden und ist sehr anfällig gegenüber Proteolyse. Durch die Bindung von Zn^{2+} oder auch Cd^{2+} entsteht MT, das gegen Proteolyse resistenter ist (Feldman *et al.*, 1978). Unter Zinkdeprivation spielt MT die Rolle eines Zn^{2+} -Scavengers (Suhy *et al.*, 1999). In der Schwangerschaft schützt eine MT-Überexpression in den mütterlichen Organen vor der teratogenen Wirkung einer Zinkmangel-Diät (Andrews & Geiser, 1999). Auf der anderen Seite schützt MT vor der Toxizität einer erhöhten Zink-Konzentration (Kelly *et al.*, 1996), indem es unter anderem Zink aus hemmenden Bindungsstellen von Enzymen entfernt (Maret *et al.*, 1999). MT ist zugleich auch ein Stressprotein, das eine wichtige Funktion bei der Wirkung von Umweltgiften hat. Eine besondere Rolle spielt der Schutz vor einer Cadmium-Vergiftung (Masters *et al.*, 1994) und vor oxidativem Stress. Dies äußert sich in einem Schutz vor z.B. H_2O_2 -induzierten DNS-Einzelstrang-Brüchen in chinesischen Hamsterzellen (Bofill *et al.*, 2001), vor reaktiven Stickoxiden (Schwarz *et al.*, 1995; Cai *et al.*, 2000) und vor tert-Butyl-Hydroperoxid (Schwarz *et al.*, 1994). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass MT vor alkylierenden Reagenzien wie N-methyl-N'-nitro-N'-nitrosoguanidin (MNNG) und Mitomycin C schützt (Lohrer & Robson, 1989). Diese Tatsache ist besonders von Interesse, da MT in verschiedenen Tumoren vermehrt exprimiert wird (Woo *et al.*, 1997). Der Nachweis von MT in Tumorzellen könnte somit ein Marker für eine erfolgreiche alkylierende Chemotherapie sein. In Entzündungsreaktionen kann Metallothionein, welches in den meisten untersuchten Zellen konstitutiv im Zytoplasma vorhanden ist, durch Zytokine vermehrt exprimiert wird (De *et al.*, 1990). Untersuchungen von Cousins *et al.* zeigten zudem eine IL-1 β abhängige Zn^{2+} -Umverteilung, bei der die Serumkonzentration von Zn^{2+} abfiel, die Zn^{2+} -Aufnahme in Hepatozyten gesteigert war und gleichzeitig eine starke Induktion von Metallothionein beobachtet werden konnte (Cousins & Leinart, 1988).

1.3.2 Die Lokalisation von MT bestimmt seine Funktion

Obwohl Metallothionein in den meisten Situationen ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert ist, ist von mehreren Gruppen die Translokation von MT in den Zellkern beschrieben worden. Im Zusammenhang mit Wachstums- und Entwicklungsprozessen wurde gefunden, dass sich MT in 3T3-L1 Zellen in der S-Phase des Zellzyklus im Zellkern befindet. Sobald die

Zellen in die M-Phase übergehen, findet eine Rückverteilung von MT in das Zytoplasma statt (Apostolova & Cherian, 2000). Ebenso konnte MT in der frühen S-Phase von wachstumsstimulierten primären Hepatozyten im Zellkern nachgewiesen werden (Tsujiikawa *et al.*, 1991) sowie im Zellkern von Hepatozyten neugeborener Ratten, hier jedoch nur in den ersten 2 postnatalen Wochen. Danach befand sich das MT wieder ausschließlich im Zytoplasma, wie es auch bei adulten Ratten zu beobachten ist (Panemangalore *et al.*, 1983). Nukleäres MT wird auch bei der Differenzierung von Geweben beobachtet. Murine 3T3-L1 Fibroblasten differenzieren unter dem Einfluss von Wachstumshormonen zu Adipozyten, wobei es zu einer nukleären Translokation von MT kommt. Zusätzlich wurde gefunden, dass während der frühen Phase der Differenzierung von Myoblasten MT und Zink in den Zellkern transportiert werden. Nach der kompletten Differenzierung befindet sich das MT jedoch hauptsächlich wieder im Zytoplasma der Myotuben (Apostolova *et al.*, 2000). Das vom MT transportierte Zn^{2+} ist dabei für den Übergang in die S-Phase essentiell (Chesters *et al.*, 1993). Man geht davon aus, dass Zink erforderlich ist, damit ein oder mehrere Proteine den Übergang in die S-Phase mediiieren (Chesters & Boyne, 1991). Ein weiterer Hinweis für die Wichtigkeit von Zink für das Zellwachstum ist, dass die Proliferation durch den spezifischen Zn-Chelator TPEN unterdrückt wird (Parat *et al.*, 1999; Schmidt & Beyersmann, 1999; Paski S.C., 2001). Durch die Translokation von MT während der Mitose wird der erhöhte Zn^{2+} -Bedarf im Zellkern gedeckt. Mehrere Enzyme wie zum Beispiel RNS- und DNS-Polymerasen, DNS-Reparaturenzyme oder auch Transkriptionsfaktoren benötigen Zn^{2+} , welches vermutlich von MT geliefert wird (Chesters *et al.*, 1989).

Die intrazelluläre Lokalisation von MT ist von grosser Bedeutung, da das üblicherweise zytoplasmatisch lokalisiertes MT intranukleär unterschiedliche Funktionen ausübt. Von Woo *et al.* wurden transfizierte Zellen hergestellt, bei denen ein Fusionsgen in $MT_{1,2}^{-/-}$ -Zellen eingebracht wurde. Um nukleäres MT zu erzeugen, wurden Zellen aus $MT_{1,2}^{-/-}$ Mäusen mit MT mit oder ohne eine nukleäre Lokalisierungssequenz (NLS) transfiziert. Somit erhielten sie Zellen, bei denen die MT-Expression entweder ganz auf das Zytoplasma oder aber ganz auf den Zellkern beschränkt war (Woo & Lazo, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass zytoplasmatisches MT vor dem Schwermetall $CdCl_2$ und den oxidierenden Eigenschaften von tert-Butylhydroperoxid schützt (Schwarz *et al.*, 1994). Dagegen schützt nukleäres MT die DNS vor mutagenen Substanzen wie z.B. MNNG. Zu diesem Ergebnis kamen auch Levadoux-Martin *et al.*, die transfizierte Zellen untersuchten, bei denen die für die mRNS-Lokalisation am perinukleärem Zytoskelett benötigten 3'-UTRs von MT zerstört wurden (Mahon *et al.*, 1997). Diese Änderung führte zu einer Delokalisation der mRNS mit nachfolgendem Verlust der nukleären MT-1 Lokalisation während der frühen S-Phase des

Zellzyklus (Levadoux *et al.*, 1999). Zellen mit einer fehlenden mRNS-Lokalisation waren dadurch signifikant anfälliger gegenüber Stress. Dies äußerte sich in einer signifikant erniedrigten Überlebensrate nach Exposition mit CdCl_2 und dem alkylierendem Agens MNNG sowie einer vermehrten Anzahl von Einzelstrangbrüchen durch MNNG und H_2O_2 . Zusätzlich zeigten sie, dass nukleäres MT zu einer verminderten Apoptose nach UV-C Behandlung führt (Levadoux-Martin *et al.*, 2001). Übereinstimmend hierzu fand Hanada *et al.*, dass eine Steigerung der MT-Synthese durch Cadmium zu einer erhöhten Resistenz von Keratinozyten gegenüber UV-B führte (Hanada *et al.*, 1991). Als das wichtigste intrazelluläre Zinkspeicherprotein könnte MT durch seine nukleäre Lokalisation einen entscheidenden Einfluss auf die Zink-Verfügbarkeit im Zellkern und somit auch auf die Genregulation haben.

1.4 Fragestellung

Da exogen zugefügtes NO eine Zn^{2+} -Freisetzung in Zellen bewirkt (Berendji *et al.*, 1997), sollte untersucht werden, ob eine endogene NO-Produktion mittels iNOS ebenfalls zu einer intrazellulären Zn^{2+} -Freisetzung führt. Da MT das Hauptspeicherprotein von Zn^{2+} ist, wurde die Rolle von MT bei dieser Zn^{2+} -Freisetzung untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Agarose	Sigma, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol	Sigma
Aquatex®	Merck, Darmstadt
DAB (3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochloriddihydrat)	Kem-En-Tec, Kopenhagen, DK
DETA/NO	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Klaus-Dietrich Kröncke
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck
ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement)	Sigma
EDTA (Ethylen-dinitrilo-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat)	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Ficoll 400	Pharmacia, Heidelberg
H ₂ O ₂	Merck
Kationisiertes BSA	Aurion, Wagening, NL
Kollagen Typ III	Sigma
Kollagenase (0,3 U/mg)	Serva, Heidelberg
NIO (L-N ⁵ -(1-Iminoethyl)-ornithin-dihydrochlorid)	Alexis, Grünberg
Sulfanilamid	Sigma
TE-Puffer, Tris-EDTA (100x)	Sigma
TPEN (N,N,N',N'-Tetrakis(2-Pyridylmethyl)-ethylenediamin)	Sigma
TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Merck

Vectastain ABC Kit PK-4000

Vector Laboratories
Burlingame, CA, USA

2.1.2 Geräte

ELISA-Reader:
Titertek Multiscan Plus

Labsystems, Helsinki, Finnland

Fluoreszenzmikroskop:
Axioplan

Zeiss, Oberkochen

Mikroskop-Kamera
RT Color SPOT

Diagnostic Instruments,
Sterling Heights, MI, USA

PCR-Thermo-Cycler:
GeneAmp PCR System 9700

Perkin Elmer, Norwalk, CT,
USA

Spektrometer:
Ultraspec 2000

Pharmacia

Spektrophotometer:
FluoLink

Bachofer Laboratoriumsgeräte,
Reutlingen

TB1 Thermoblock

Biometra, Göttingen

Tischzentrifuge:
Centrifuge 5415D

Eppendorf, Hamburg

Zellzentrifuge:
Allegratm 6KR Centrifuge

Beckman, Palo Alto, CA, USA

2.1.3 Materialien für die Zellkultur

10cm-Gewebekulturplatte
6 well Gewebekulturplatte

Greiner Bio-One GmbH,
Frickenhausen

8-Kammern Permanox Objektträger

Nalge Nunc Int., Naperville,
IL, USA

DMEM (5X)

Gibco, Paiseley, TB, USA

FCS-HQ: Fetal calf serum (Endotoxin-frei)

PAA Laboratories,
Linz, Österreich

FCS-Standard: Fetal calf serum Gold

PAA

Glutamax I: (L-Alanyl-Glutamin) (100X)	PAA
HBSS: Hanks buffered salt solution (10X)	Gibco
HEPES 1M: N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethylsulfonsäure)	PAA
MEM: nicht essentielle Aminosäuren	PAA
Pen-Strep: Penicillin-Streptomycin (100X) (10.000 IU/ml-10.000 IU/ml)	PAA
RPMI 1640 (Kulturmedium)	PAA
TE-Puffer: Tris-EDTA (100X)	Sigma
Trypsin: Viralex Trypsin (1:250) 0,25% in PBS	PAA

2.1.4 Zytokine und biologische Proben

IFN- γ : rekombinantes murines Interferon-Gamma	Strathmann, Hannover
IL-1 β : rekombinantes humanes Interleukin-1 β	Strathmann
TNF- α : rekombinanter humaner Tumor Nekrose Faktor- α	Strathmann
RNSse Inhibitor: RNSseOUT	Gibco
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Taq PCR Core Kit	Qiagen
oligo-dt	Sigma-Genosys, Cambridgeshire, UK
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden
DNS Molekulargewichts Marker XIV	Roche, Mannheim

Primer:		Sigma-Genosys
GAPDH	5'-CAATACATGGTTTACATGTTCC- 3'-GGACTGTGGTCATGAGTCCT-	
iNOS	5'-TCATGGACCAGTATAAAGGCAAGC- 3'-GCTTCTGGTCCATGTCATGAGCAA	
MT1	5'-GCTCCTGCTCCACCGGCGGC- 3'-CAGGCACAGCACGTGCAC-	
MT2	5'-GCTCCTGTGCCTCCGATGGA- 3'-CAGGCACAGCACGTGCAC-	

2.1.5 Fluoreszenzfarbstoffe

HOECHST 33342 ((2'-[4-Ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1H-benzimidazol))	Sigma
Zinquin (2-Methyl-8-p-toluolsulfonamido-6-quinoloxyl)acetat	Alexis

2.1.6 Antikörper

Anti-humaner von Willebrand Faktor (vWF) Ratte	Sigma
Anti-murines CD106 (VCAM-1) Kaninchen	ImmunoKontakt, Frankfurt
Anti-Metallothionein (MT), E9 Maus, monoklonal	DAKO, Hamburg
Biotinyliertes Anti-Ratte IgG (H+L)	Vector
LSAB®2 System, Peroxidase	DAKO
Isotyp-Kontrolle Maus IgG1	DAKO

2.1.7 Zellen

Maus-Aorten-Endothelzellen aus C57BL6 Mäusen

TVA Heinrich Heine
Universität Düsseldorf
Jackson Laboratory, Bar Harbor
MN, USA

MAEC-Wildtyp:
Stamm-Name: 129S3/SvImJ

MAEC MT knock-out:
129S7/SvEvBrd-Mt1^{tm1Bri}Mt2^{tm1Bri}

Jackson Laboratory

2.1.8 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden alle Versuche mindestens dreimal durchgeführt und die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen berechnet. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student-T-Testes (zweiseitig, ungepaart) berechnet. Als signifikant wurden $p < 0,05$ angesehen.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung und Kultur von Zellen

Aus narkotisierten Tieren wurde die Aorta herauspräpariert und von umgebendem Bindegewebe und Fett befreit. Danach wurden die Aortenstücke in HBSS/HEPES gewaschen und in ca. 2 mm breite Streifen geschnitten. Jeweils 3 Ringe wurden in eine mit Kollagengel beschichtete Vertiefung einer 24-well Kulturplatte aufgebracht. Die Gele wurden anschließend mit jeweils 1 ml RPMI 1640/20% FCS-Gold + 100 µg/ml ECGS überschichtet und zum Auswachsen in den Brutschrank gestellt.

Nach 6-8 Tagen wurden die Aortenringe nach mikroskopischer Kontrolle entfernt, die Gele mit 0,25% Kollagenase lysiert und die Zellen isoliert. Danach wurden die Zellen auf 10 cm-Kulturplatten mit 10 ml RPMI 1640/20% FCS-Gold + 100 µg ECGS subkultiviert. Nach der ersten Trypsinierung wurden die Zellen gespreitet und in RPMI 1640/20% FCS-Gold ohne ECGS kultiviert.

Zur Ablösung und Passage der adhärenenten Zellen wurden diese zunächst zweimal mit PBS (bestehend aus 0,27 g KH_2PO_4 , 1,43 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 9 g NaCl ad 1000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$) + 0,02% EDTA gewaschen und danach mit 0,5 ml Trypsinlösung/4ml PBS/EDTA für 2 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach mikroskopisch gesicherter Ablösung wurden die Zellen von der Kulturplatte gespült. Die Trypsinaktivität wurde mit 5 ml RPMI/10% FCS inhibiert und die Zellen 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt,

das Zentrifugat mit Medium resuspendiert und die Zellen in der angegebenen Zellzahl wieder neu auf die Kulturgefäße verteilt. Ab der 3. Passage wurden die Zellen mit RPMI 1640/10% FCS-Gold kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde in RPMI 1640/10% FCS /10% Dimethylsulfoxid bei -80 °C tiefgefroren.

RPMI 1640 Kulturmedium wurde mit 6×10^4 U/l Penicillin, 60 mg/l Streptomycin, 1 mM Na-Pyruvat, 2 mM Glutamin; 10 mM nicht essentielle Aminosäuren; 23,8 mM NaHCO_3 und 10 mM HEPES supplementiert. Alle Zellen wurden auf 10 cm Plastik-Kulturplatten mit 10 ml dieses Mediums kultiviert, das alle 2-3 Tage gewechselt wurde. Die Aorten-Endothelzellen wachsen adhärent und wurden spätestens bei Erreichen der Konfluenz trypsiniert und neu gespreitet. Alle Zellen wurden mit RPMI 1640/10% FCS (endotoxinfrei) kultiviert. Von den Aorten-Endothelzellen wurden für die Versuche nur die Passagen 6-12 eingesetzt. Bei Beginn der Versuche befanden sich die Zellen jeweils in einem subkonfluenten Wachstumsstadium.

2.2.2 Immunhistochemische Färbung von Zellen

2.2.2.1 Allgemeine Methode der Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die aufgetauten Objektträger (siehe 2.2.2.2) zunächst 10 min lang in Aceton fixiert und anschließend zweimal für jeweils 5 min in PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen zur Inaktivierung endogener Peroxidase für 10 min in 0,3% H_2O_2 inkubiert und mit H_2O gespült. Nach dem erneuten Waschen der Zellen in PBS wurden sie in einer feuchten Kammer bei 4 °C für 20 min mit bovinem Serumalbumin (0,5% BSA in PBS) inkubiert, um unspezifische Antikörper-Bindungen zu minimieren.

Nach dem Waschen in PBS wurde als nächster Schritt der primäre Antikörper aufgetragen, der zuvor mit PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt worden war. Die Isotyp-Kontrolle wurde mit Maus-IgG1-Antikörpern durchgeführt, die jeweils in derselben Konzentration wie der Primärantikörper eingesetzt wurden. Alle verwendeten Antikörper wurden für ca. 12 h bei 4 °C in der feuchten Kammer auf der Probe belassen. Anschließend wurde wieder mit PBS gewaschen.

Die nächsten Färbeschritte unterscheiden sich je nach verwendetem primären Antikörper und wurden mit zwei verschiedenen Kits durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen mit einem speziellen biotinylierten sekundären Antikörper inkubiert und nachfolgend gewaschen. Dann wurden sie mit dem spezifischen Avidin/Peroxidase-Reagenz behandelt und wiederum gewaschen. Im letzten Schritt wurden alle Objektträger mit Diaminobenzidin Hydrochlorid (DAB) + 20 mM H_2O_2 für 5 min bedeckt. Nach einem abschließendem Waschschrift in PBS

wurden die Objektträger mit dem wässrigen Eindeckelmedium Aquatex® beschichtet und eingedeckelt. Nach etwa 6 h konnten die Zellen unter dem Mikroskop mit Hilfe eines DAB-Filters ausgewertet werden. Mit einer SPOT Color Kamera wurden digitale Aufnahmen zur Dokumentation der Ergebnisse angefertigt.

2.2.2.2 Charakterisierung der isolierten murinen Endothelzellen

Zur Charakterisierung wurden die Aorten-Endothelzellen auf 8-Kammer Permanox Objektträgern mit ca. 2×10^4 Zellen/Vertiefung/300 μ l RPMI-Medium kultiviert. Nach 1-2 Tagen waren die Zellen subkonfluent und wurden 24 h lang mit einem Zytokin-Mix (500 U/ml IFN- γ + 500 U/ml IL-1 β + 500 U/ml TNF- α) aktiviert. Danach wurde das Medium abgesaugt, die Kammerwände entfernt und die Objektträger mit kalter Luft getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger entweder direkt zur Färbung eingesetzt oder bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C tiefgefroren. Die Vorbereitung der Zellen bis zum Auftragen des primären Antikörpers erfolgte wie oben beschrieben. Folgende Antikörper wurden zur Charakterisierung eingesetzt:

1. Antikörper	vWF	CD106
Verdünnung	1:300	1:25
Inkubation	12 h	12 h
Kit	LSAB®2, Peroxidase	Vectastain ABC
2. Antikörper	Reagent 1 (Biotin-gebundener-AK)	biotinyliertes Anti-Ratte IgG
Dauer	15 min	30 min
	Reagent 2 (Streptavidin-Avidin Komplex)	ABC Reagent
Dauer	15 min	30 min

Es zeigte sich, dass die Kulturen zu 100% einheitlich gefärbt waren.

2.2.2.3 Nachweis von Metallothionein

Zum Nachweis von Metallothionein und dessen intrazellulären Lokalisation wurden Aorten-Endothelzellen wie oben beschrieben auf 8-Kammer Permanox Objektträgern kultiviert und

nach 1-2 Tagen für die unterschiedlichen Versuche verwendet. Die Proben wurden nach der oben dargestellten Methode vorbereitet, mit Anti-Metallothionein-Antikörpern (1:50) für 12 h bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend mit dem LSAB®2 Kit weitergefärbt.

Als Isotyp-Kontrolle wurde statt des MT-Antikörpers ein Maus-IgG1-Antikörper gegen *Aspergillus niger* Glucoseoxidase, einem Enzym, welches in Säugetierzellen weder konstitutiv noch induzierbar exprimiert wird, als primärer Antikörper eingesetzt. Hiermit sollte eine evtl. unspezifische Bindung des primären AK ausgeschlossen werden. Eine weitere Negativ-Kontrolle war die Färbung von MT_{1,2}^{-/-}-MAEC.

2.2.3 Fluoreszenzfärbung von Zellen

2.2.3.1 Quantifizierung des Zelltodes durch Apoptose nach Gabe von NO oder TPEN

Zur Quantifizierung der Apoptose-induzierenden Wirkung des NO-Donors DETA/NO und des spezifischen Zn²⁺-Chelators TPEN wurden die Zellen mit dem an die DNS-bindenden Fluoreszenzfarbstoff HOECHST 33342 gefärbt.

Zuerst wurden ca. 10⁵ Zellen in 6 well Kulturplatten bis zur Subkonfluenz kultiviert. Danach wurden sie mit unterschiedlichen Konzentrationen und über unterschiedliche Intervalle mit den Reagenzien behandelt. Nach Mediumwechsel wurden sie mit 15 µM HOECHST 33342 in 1 ml Kulturmedium für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop mit dem Zeiss Filter Set 02 (Anregung 365 nm, Emission LP 420 nm) untersucht. Es wurden mindestens 100 Zellen aus jeweils hintereinander liegenden Gesichtsfeldern ausgezählt.

2.2.3.2 Nachweis intrazellulärer Zn²⁺-Ionen

Jeweils 10⁵ Aorten-Endothelzellen wurden in 6 well Kulturplatten kultiviert. Vor Erreichen der Konfluenz wurde das Kulturmedium gewechselt und die Zellen mit 25 µM Zinquin in 1 ml Kulturmedium für 45 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop mit dem Filter Set 02 untersucht.

Zur Dokumentation wurden Aufnahmen mit einer konstanten Belichtungszeit von 7 sec mit einer Digitalkamera gemacht. Parallel wurden Phasenkontrast-Bilder zur Darstellung der Zellen angefertigt.

2.2.4 Semi quantitative RT-PCR

2.2.4.1 RNS-Isolierung

Zur RNS-Isolierung wurde zuerst das Kulturmedium entfernt und teilweise für eine spätere Nitritbestimmung (2.2.5) bei -20 °C tiefgefroren. Die Isolierung der RNS wurde mit dem RNeasy Mini Kit nach dem Protokoll des Herstellers (Qiagen) durchgeführt.

Zuerst wurden die Zellen mit einem Lyse-Puffer (Buffer RLT) + 1% Mercaptoethanol lysiert und das Lysat mit den QIAshreddern 2 min bei max. Drehzahl homogenisiert. Danach wurde zu dem Lysat 70%-tiger Ethanol hinzugegeben, welches das selektive Binden der RNS an die RNeasy Membran fördert. Im nächsten Schritt wurde die Probe in die RNeasy Zentrifugationsröhrchen gegeben, in der die RNS von der Membran absorbiert wurde. Verunreinigungen wurden in mehreren Reinigungsschritten mit dem RW1 und RPE Puffer herausgewaschen. Im letzten Schritt wurde die RNS mit RNSae-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNS wurde durch Messung der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm in einem Spektrophotometer bestimmt. Die fertige RNS wurde entweder auf Eis gekühlt und sofort für die cDNS-Synthese eingesetzt oder bei -80 °C tiefgefroren.

2.2.4.2 Reverse Transkription (RT)

Die cDNS Synthese wurde mit dem Omniscript RT Kit nach dem Protokoll des Herstellers (Qiagen) durchgeführt. Dabei wurde 1 µg RNS/20 µl RT-Ansatz eingesetzt. Der RT-Ansatz besteht aus RT-Puffer, dNTP-Mix (jedes dNTP 0,5 mM), 10 µM Oligo-dT, 10 Units/20 µl RNSseOUT, 1 Unit/20 µl Omniscript Reverse Transkriptase. Der fertige Reaktionsansatz wurde 60 min bei 37 °C in einem Thermoblock inkubiert. Die cDNS wurde entweder auf Eis gestellt und direkt für die PCR eingesetzt oder bis zum späterem Gebrauch bei -20 °C tiefgefroren.

2.2.4.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Das Reaktionsgemisch für die PCR wurde mit den Reagenzien des Taq Core PCR Kits nach Empfehlung des Herstellers zubereitet: PCR-Puffer (enthält 1,5 mM MgCl₂), dNTP-Mix (jeweils 200 µM pro dNTP), 1,25 U Taq DNS Polymerase/ 50 µl Ansatz.

Bei der Auswahl der Primer wurde darauf geachtet, dass ein Strang die Exon-Intron Grenze der DNS überspringt, um eine Amplifikation genomischer DNS zu vermeiden. Trotzdem wurde zur Kontrolle pro Primerpaar eine Probe mituntersucht, in der die cDNS noch nicht durch die reverse Transkriptase synthetisiert worden war. Hierdurch soll sichergestellt werden, dass bei der PCR nur die cDNA amplifiziert wird. Die 5'- und 3'-Primer wurden in TE-Puffer aufgelöst und in einer Endkonzentration von 0,4 µM eingesetzt. Im letzten Schritt wurde 5 µl cDNS/50 µl Reaktionsgemisch hinzugegeben. Um Kontaminationen des Reaktionsgemisches auszuschließen, wurde bei jeder PCR zusätzlich eine Probe mitgeführt, in der sich statt cDNS reines Wasser befand.

Primersequenzen:

GAPDH 5'-CAATACATGGTTTACATGTTC-
3'-GGACTGTGGTCATGAGTCCT-

iNOS 5'-TCATGGACCAGTATAAGGCAAGC-
3'-GCTTCTGGTCCATGTCATGAGCAA

MT1 5'-GCTCCTGCTCCACCGGCGGC-
3'-CAGGCACAGCACGTGCAC-

MT2 5'-GCTCCTGTGCCTCCGATGGA-
3'-CAGGCACAGCACGTGCAC-

Thermocycler-Bedingungen:

	initiale Denaturierung		3-Schritt-Zyklus:						abschließende Extension	
			Denaturierung	Annealing	Extension					
GAPDH	94 °C	3 min	17x	94 °C 30 s	58 °C 45 s	72 °C 45 s			72 °C 5 min	
MT-1	94 °C	3 min	17x	94 °C 30 s	55 °C 30 s	72 °C 30 s			72 °C 5 min	
MT-2	94 °C	3 min	17x	94 °C 30 s	60 °C 30 s	72 °C 30 s			72 °C 5 min	
iNOS	94 °C	3 min	29x	94 °C 30 s	58 °C 20 s	72 °C 30 s			72 °C 5 min	

Nach der Amplifikation wurden 10 µl der DNS-Proben + 2,5 µl 5X Probenpuffer (0,25% Bromphenolblau + 0,25% Xylencyanol + 15% Ficoll 400 + 15% Glycerin) auf ein 1,8%

Agarose-Gel (900 mg Agarose + 1 ml 5X TAE-Puffer (40 mM Tris + 20 mM Eisessig + 50 mM EDTA) ad 49 ml H₂O) aufgetragen, das 1% Ethidiumbromid enthält. Die Auftrennzeit betrug 30 min bei 180 V. Die mit Ethidiumbromid gefärbten Banden wurden mit UV-C Licht sichtbar gemacht und mit einer Kodak DC40 Kamera fotografiert, die einen Ethidiumbromid-Filter besitzt. Die Bandenintensitäten wurden danach densitometrisch ausgewertet und die MT-1/GAPDH, MT-2/GAPDH oder iNOS/GAPDH Quotienten gebildet.

2.2.5 Griess-Test zur Nitritbestimmung

Die Nitrit-Konzentration in den Zellkulturüberständen wurden mittels Griess-Test (Diazotierungsreaktion) (Wood *et al.*, 1990) am Ende der jeweiligen Versuche bestimmt. Dazu wurden 100 µl Zellkultur-Überstand mit 50 µl Sulfanilamid-Lösung (1% in 2,5% H₃PO₄) gemischt. Nach 5 min wurden 50 µl Naphthylethylendiamin-Lösung (0,3% in 2,5% H₃PO₄) hinzugegeben sowie noch 20 µl Methanol zur Beseitigung störender Luftblasen. Bei 540 nm wurde die Absorption der Proben gegenüber Kulturmedium, welches ohne Zellen kultiviert wurde, bestimmt. Als Standard wurden verschiedene NaNO₂-Konzentrationen benutzt. Mittels der aus dem Standard ermittelten Eichkurve wurden aus den Absorptionen der Proben die jeweiligen Nitritmengen berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Induktion der induzierbaren NO-Synthase in Maus-Aorten-Endothelzellen

3.1.1 Kinetik der iNOS mRNA Expression

Zuerst wurde der Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen auf die Expression der iNOS in MAEC untersucht. Die mRNA der iNOS wurde mittels semi-quantitativer RT-PCR nachgewiesen. Die MAEC wurden für jeweils 1, 2, 4, 6, 8, 10 oder 24 h mit einem Zytokin-Mix bestehend aus 500 U/ml IFN- γ + 500 U/ml IL-1 β + 500 U/ml TNF- α inkubiert. Zur Kontrolle wurden nicht-aktivierte Zellen für 24 h kultiviert. Anschließend wurde die zelluläre mRNA isoliert und für das housekeeping Enzym GAPDH und die iNOS jeweils eine spezifische RT-PCR durchgeführt. Danach wurde aus den densitometrischen Daten der Quotient iNOS/GAPDH gebildet. Die für die 6 h-Werte ermittelten Quotienten wurden auf 100% normiert und davon ausgehend die prozentuale Expression der mRNA bei den verschiedenen Zeitpunkten ermittelt. Die 6 h-Werte wurden als Referenzwert auserwählt, da nach diesem Zeitintervall ein Plateau der mRNA-Expression bei allen Versuchen erreicht wurde.

iNOS mRNA ist bei unbehandelten Zellen nicht nachzuweisen. Jedoch schon 1 h nach Aktivierung mit dem Zytokin-Mix kann man eine Induktion auf $53\pm 9\%$ beobachten, die nach 4 h ihr Maximum ($109\pm 7\%$) erreicht. Nach 10 h ist die Expression wieder auf $65\pm 14\%$ gesunken (Abb. 3).

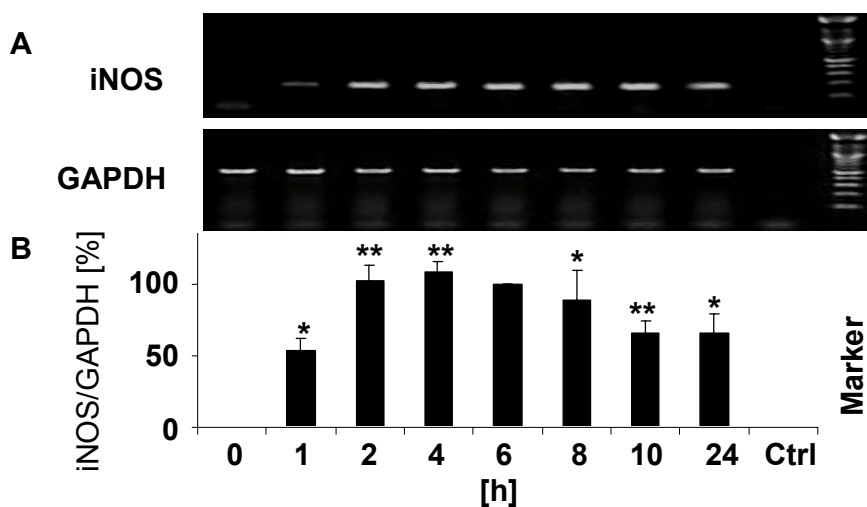


Abb. 3: Kinetik der Zytokin-induzierten iNOS mRNA Induktion

Die relative Expression der iNOS und GAPDH mRNA in MAEC wurde nach Inkubation mit 500 U/ml IL-1 β + 500 U/ml IFN- γ + 500 U/ml TNF- α bestimmt. Dazu wurden die Zellen 1-24 h lang aktiviert. Anschließend wurde die mRNA isoliert und eine iNOS und GAPDH spezifische RT-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass unbehandelte MAEC keine iNOS mRNA exprimieren. Nach einer Inkubation von 1 h wird die iNOS mRNA induziert, welche nach etwa 4 h ihr Maximum erreicht.

- (A) Elektrophoretische Auftrennung einer repräsentativen iNOS und GAPDH spezifischen RT-PCR Probe.
- (B) Balkendiagramm, welches die relative iNOS mRNA Expression im Vergleich zu GAPDH mRNA Expression darstellt. Die für 6 h ermittelten Quotienten wurden auf 100% normiert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus 3 unabhängigen Experimenten bestimmt.

* p<0,05; ** p<0,005

3.1.2 Proinflammatorische Zytokine bewirken eine iNOS abhängige NO-Synthese

Nachdem zuerst die Induktion der iNOS durch proinflammatorische Zytokine mit der RT-PCR nachgewiesen wurde, sollte nun die Zunahme der iNOS-Aktivität untersucht werden. Die iNOS katalysiert die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) aus L-Arginin, wobei L-Citrullin als Nebenprodukt entsteht. Das hierbei entstandene NO wird zu Nitrit und Nitrat oxidiert, welche stabil sind. Nitrit kann mittels Griess-Test in einer Diazotierungs-Reaktion nachgewiesen werden. MAEC der Wildtyp-Stämme C57BL6 und 129S3/SvImJ sowie MAEC des Stammes 129S7/SvEvBrd-Mt1^{tm1Bri}Mt2^{tm1Bri} (MAEC-MT_{1,2}^{-/-}) wurden in 6 well-Kulturplatten in jeweils 1 ml Medium kultiviert. In der subkonfluenten Wachstumsphase wurden die Zellen mit dem Zytokin-Mix 24 h lang aktiviert. Anschließend wurde mit Hilfe des Griess-Tests die Nitrit-Konzentrationen in den Zellkultur-Überständen bestimmt.

Die Nitritmenge, die unbehandelte MAEC des Wildtyps synthetisieren (0,84 \pm 0,29 nmol/10⁵ Zellen/24 h), wurde durch die Aktivierung mit proinflammatorischen Zytokinen um etwa das 15fache gesteigert (13,01 \pm 2,03 nmol/10⁵ Zellen/24 h) (Abb. 4). Parallel wurden die Zellen mit dem Zytokin-Mix sowie mit 0,25 mM NIO, welches die iNOS-Aktivität irreversibel und spezifisch hemmt (Rees *et al.*, 1990; Knowles *et al.*, 1990; McCall *et al.*, 1991) behandelt. Dies führte im Gegensatz zu den aktivierten Zellen zu einer signifikant erniedrigten Nitritproduktion (2,33 \pm 0,25 nmol/10⁵ Zellen/24 h). Zur Kontrolle wurden die Zellen nur mit NIO behandelt, was zu keiner Erhöhung der Nitritmenge im Zellüberstand führte. Zwischen den MAEC des Wildtyps und den MAEC-MT_{1,2}^{-/-} bestand kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Zytokin induzierten NO-Produktion.

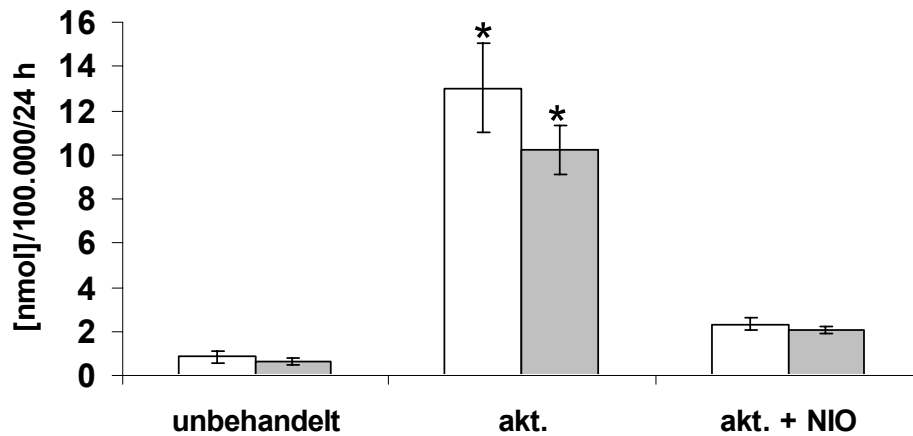


Abb. 4: Nitritkonzentrationen aus Zellüberständen

Wildtyp C57BL6 (weiss) und MT^{-/-} 129S7/SvEvBrd-Mt1tm1BriMt2tm1Bri (grau) MAEC wurden in der subkonfluenten Wachstumsphase für 24 h entweder mit einem Mix aus proinflammatorischen Zytokinen oder mit einer Kombination aus proinflammatorischen Zytokinen und 0,25 mM NIO inkubiert. Zur Kontrolle wurden parallel unbehandelte Zellen kultiviert. Mittels Griess-Test wurde die Nitritkonzentration in den Zellüberständen bestimmt. Nur bei aktivierten Zellen können erhöhte Mengen an Nitrit detektiert werden. Eine gleichzeitige Behandlung mit NIO führt zu keiner signifikanten Erhöhung der Nitritkonzentration im Überstand. Die Werte stellen Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten dar. * $p < 0,05$

Dieser Versuch bestätigt, dass proinflammatorische Zytokine zu einer iNOS-Induktion sowie einer iNOS-Aktivität in MAEC führen. MAEC vom Wildtyp und MAEC-MT_{1,2}^{-/-} reagierten nach Zytokin-Aktivierung mit einer vergleichbaren NO-Synthese.

3.2 Nachweis von intrazellulären Zn²⁺-Ionen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Zinquin

3.2.1 Proinflammatorische Zytokine führen zu einer Zn²⁺-Freisetzung im Zellkern

In einer ersten Versuchsreihe wurde der Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die intrazelluläre Verteilung von Zink-Ionen untersucht. MAEC der Wildtyp-Stämme C57BL6 und 129S3/SvImJ wurden dazu mit proinflammatorischen Zytokinen 24 h lang aktiviert. Hierdurch wurde die iNOS induziert, was zu einer NO-Synthese führt. Exogen in Form von NO-Donoren zugeführtes NO führt zu einer Zn²⁺-Freisetzung vorwiegend im Zytoplasma (Berendji *et al.*, 1997). Diese Zink-Ionen könnten aus MT (Kröncke *et al.*, 1994) oder aus Zink-Finger Transkriptionsfaktoren stammen (Kröncke & Carlberg, 2000), da gezeigt werden konnte, dass NO mittels S-Nitrosierung Zn²⁺ aus dem Zink-komplexierenden Protein Metallothionein freisetzt (Kröncke *et al.*, 1994). Ein wesentliches Werkzeug für diese Studien

war das Zink-spezifische Fluorochrom Zinquin. Bei Zinquin handelt es sich um ein nicht fluoreszierendes membran-permeables Fluorophor, das intrazellulär durch Esterasen in die membran-impermeable Zinquin-Säure umgewandelt wird, so dass es in der Zelle akkumuliert und dort freies Zink hochspezifisch bindet (Zalewski *et al.*, 1993). Aus der Gruppe der Schwermetalle werden mit ähnlich hoher Bindungskonstante nur Cadmium und Silber gebunden, welche aber in Zellen und Geweben nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommen. Die Affinität von Zinquin zu Zn^{2+} reicht jedoch nicht aus, um Zn^{2+} aus MT oder Zinkfingern-Strukturen von Proteinen herauszulösen. Nach spezifischer Bindung von Zn^{2+} und Anregung mit UV-Licht wird Zinquin stark fluoreszenzaktiv und kann deshalb gut eingesetzt werden, um eine NO-mediierte Änderung der freien intrazellulären Zn^{2+} -Konzentrationen zu detektieren.

Zuerst wurden die Wildtyp-MAEC mit proinflammatorischen Zytokinen für 6, 12, 18 oder 24 h aktiviert. Zum Nachweis des intrazellulären freien Zink-Ionen wurden die Zellen danach für 45 min bei 37 °C mit Zinquin (25 μ M) inkubiert. Bei der anschließenden Untersuchung mittels Fluoreszenz-Mikroskopie sah man bei den unbehandelten Zellen eine diffuse, schwache Färbung des gesamten Zytoplasmas. Nach 6, 12 und 18 h zeigte sich kein Unterschied zu den unbehandelten Zellen. Erst 24 h nach Aktivierung zeigte sich bei den MAEC eine starke nukleäre Färbung, was auf eine hohe Konzentration von Zn^{2+} im Kern schließen lässt (Abb. 5). Innerhalb des Zellkern gab es Bezirke erhöhter Fluoreszenzintensität. Diese Bezirke stimmten mit Verdichtungen („Speckles“) überein, die mittels Phasenkontrastmikroskopie sichtbar waren.

Bei einigen aktivierten Zellen zeigten sich auf den Phasenkontrast-Aufnahmen kondensierte Chromosome, wie man sie bei der Zellteilung beobachten kann (Abb. 5). Die Strukturen zeigten eine sehr intensive Zinquin-Färbung, was auf eine hohe intranukleäre freie Zn^{2+} Konzentration schließen lässt. Diese Beobachtungen zeigen, dass unter dem Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen die Zellteilung nicht gehemmt wird und dass dabei eine Zn^{2+} -Anreicherung innerhalb der Chromosomen erfolgt.

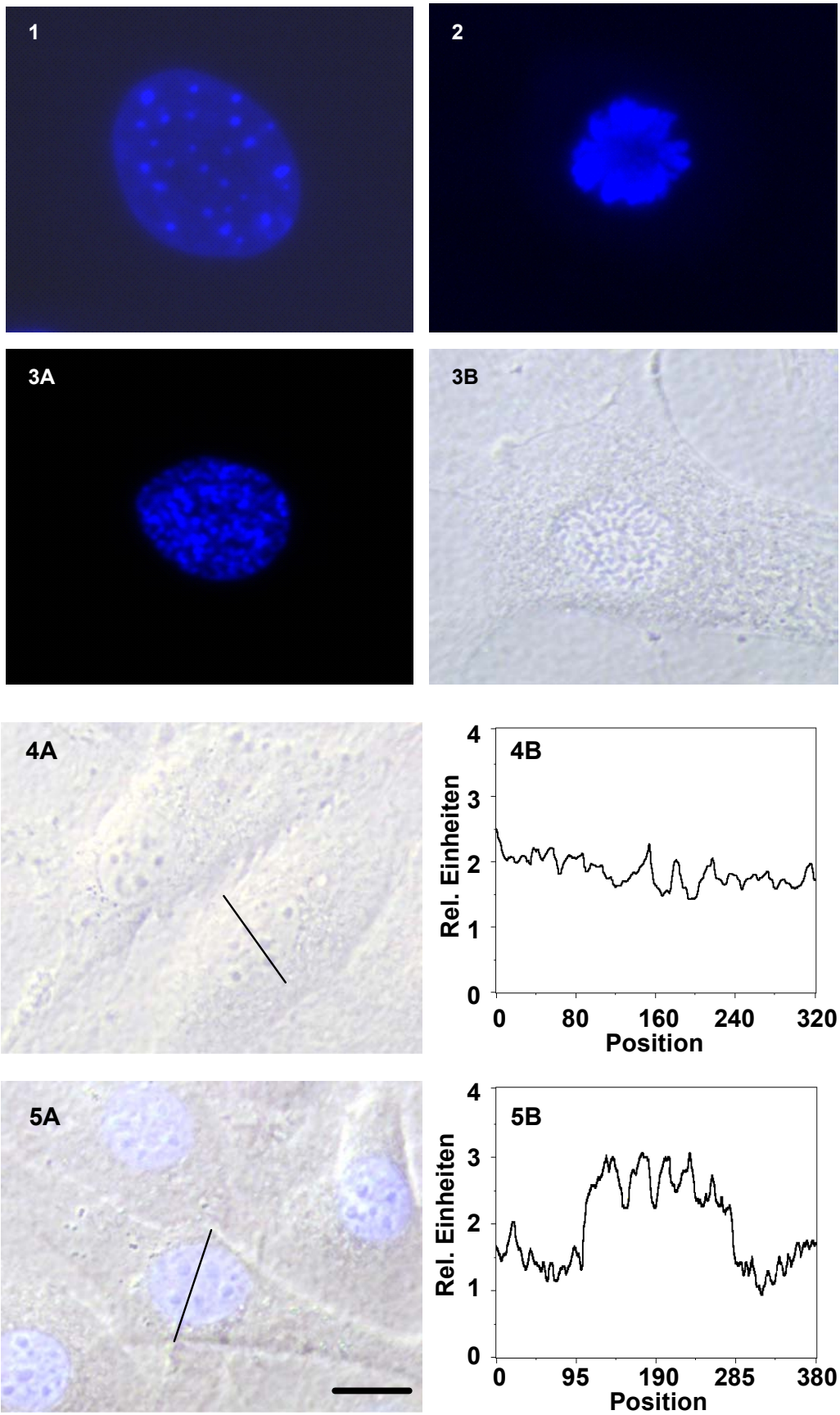


Abb. 5: Intranukleäre Zn²⁺-Verteilung

Subkonfluent gewachsene MAEC wurden 24 h lang mit proinflammatorischen Zytokinen kultiviert. Danach wurde das Medium gewechselt und das intrazelluläre freie Zn^{2+} mit dem Fluoreszenzfarbstoff Zinquin sichtbar gemacht. $n=5$

- (1) Zinquin gefärbter Zellkern einer aktivierten Zelle, bei dem mehrere über den gesamten Kern verteilte Speckles zu erkennen sind.
- (2) Zelle mit erhöhter Fluoreszenzaktivität, die an verdichteten und zentrifugal ausgerichteten Strukturen zu beobachten ist.
- (3) Phasenkontrastaufnahme einer MAEC mit kondensierten, fadenförmigen Kernstrukturen (A) sowie die dazugehörige mit Zinquin gefärbte Fluoreszenzaufnahme (B).

Phasenkontrastaufnahme mit gleichzeitiger Anregung bei 365 nm einer nicht aktivierten (4A) bzw. aktivierten Zellen (5A). Danach wurde die Fluoreszenz-Aktivität entlang einer durch den Zellkörper der MAEC gezogenen Linie gemessen (4+5B). Der Balken entspricht 5 μm .

- (4) In der unbehandelten Zelle lässt sich keine Zn^{2+} -spezifische Fluoreszenz im Zellkern nachweisen.
- (5) Die aktivierten Zellen zeigen eine intensive Zn^{2+} -spezifische Fluoreszenz im Zellkern, welche auf eine nukleäre Zn^{2+} -Anreicherung hindeutet. Zusätzlich erkennt man intranukleär Stellen mit erhöhter Fluoreszenz-Intensität.

3.2.2 NO-abhängige Zn^{2+} -Freisetzung

Um zu untersuchen, ob die Zytokin-induzierte intranukleäre Zn^{2+} -Freisetzung NO-mediiert ist, wurden die Zellen im nächsten Schritt mit proinflammatorischen Zytokinen plus 0,25 mM NIO behandelt. NIO hemmt spezifisch und irreversibel die iNOS Aktivität. Unter diesen Versuchsbedingungen zeigte sich bei den aktivierten Zellen keinerlei Zn^{2+} -Freisetzung im Zellkern. Parallel wurden die Zellen mit bis zu 200 μM des NO-Donors DETA/NO (Keefer *et al.*, 1996) behandelt. Als Negativkontrolle wurden 200 μM denitrosiertes DETA/ NO_{NO} eingesetzt, welches kein NO mehr freisetzen kann. Hierbei zeigte sich, dass die Gabe von exogenem NO alleine zu keiner Zn^{2+} -Freisetzung im Zellkern führt. Als weitere Kontrolle wurde der Einfluss von exogen zugeführten Zink-Ionen auf die intrazelluläre Zink-Ionen-Verteilung untersucht. Die Zellen wurden hierzu mit 50 μM ZnSO_4 24 h lang inkubiert und anschließend mit Zinquin gefärbt. Unter diesen Bedingungen zeigte sich eine insgesamt etwas stärkere Fluoreszenz des Zytoplasmas, was auf einen erhöhten Zn^{2+} -Gehalt der Zellen hindeutet. Eine Zn^{2+} -Anreicherung im Zellkern wurde jedoch nicht beobachtet ().

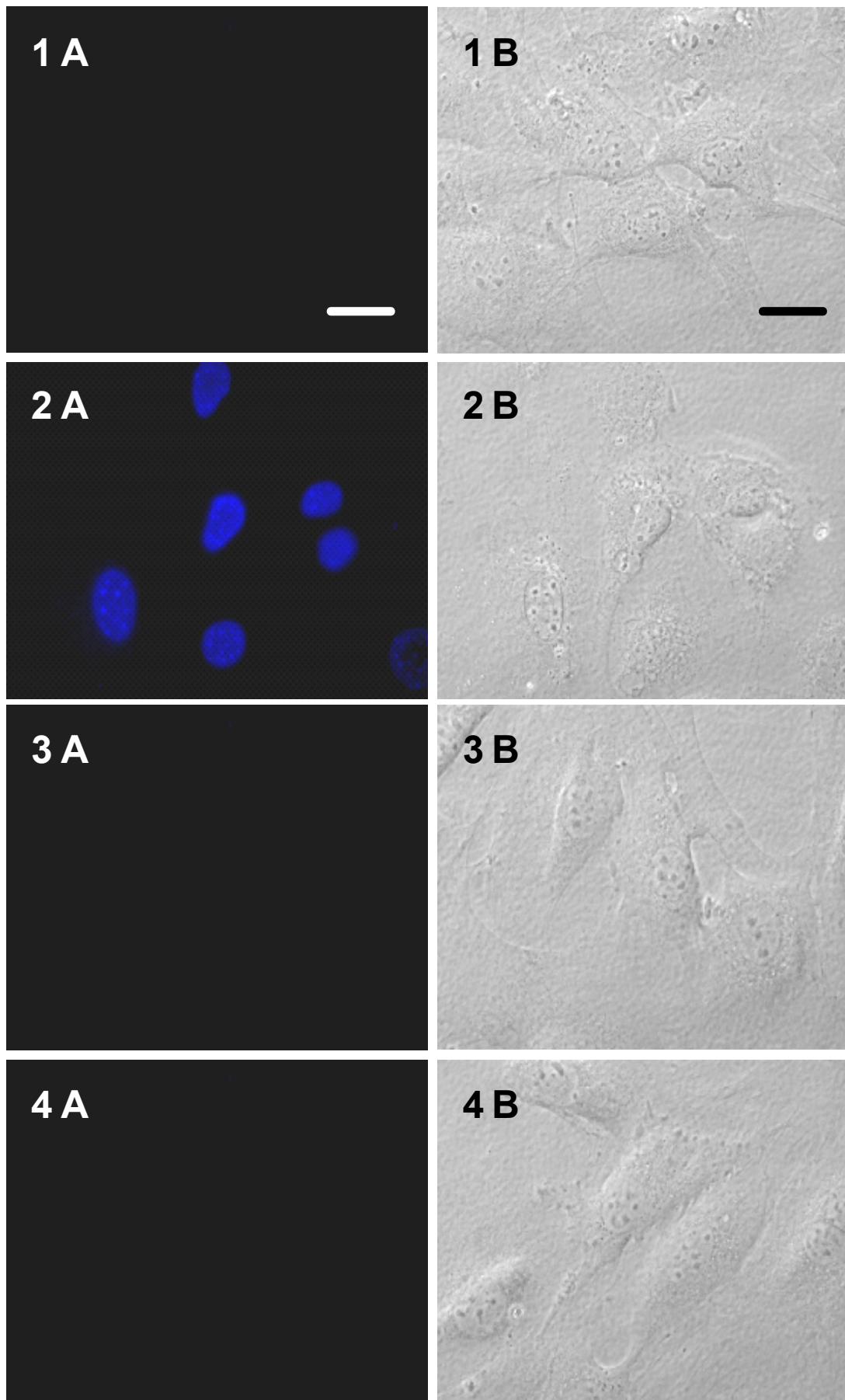


Abb. 6: Zinquin-Färbung von Wildtyp MAEC

- (A) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen nach Zinquin-Färbung zur Darstellung von intrazellulären freien Zinkionen
 (B) Phasenkontrastmikroskopie des gleichen Ausschnitts

MAEC vom Wildtyp wurden kultiviert bis eine subkonfluente Wachstumsphase erreicht war. Danach wurden sie für 12 bzw. 24 h mit proinflammatorischen Zytokinen **(2)** bzw. mit einer Kombination aus proinflammatorischen Zytokinen plus 0,25 mM NIO **(3)** inkubiert. Parallel wurden die Zellen ohne **(1)** oder mit 200 μ M DETA/NO **(4)** behandelt. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C mit 25 μ M Zinquin für 45 min inkubiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Freies intrazelluläres Zn^{2+} konnte nur 24 h nach Aktivierung mit proinflammatorischen Zytokinen beobachtet werden. In diesem Fall befand sich die gesamte Färbung im Zellkern. Der Balken in Bild 1A entspricht 5 μ m. n=5

Mit diesen Versuchen wurde gezeigt, dass die Aktivierung von MAEC mit proinflammatorischen Zytokinen zu einer gezielten Freisetzung von Zink-Ionen im Zellkern führt. Dieser Vorgang ist NO-abhängig, da die Hemmung der iNOS durch NIO und die dadurch fehlende NO-Synthese trotz Anwesenheit von proinflammatorischen Zytokinen zu keiner sichtbaren Zn^{2+} -Freisetzung im Zellkern führt. Die Zytokine sind für diesen Effekt essentiell, da exogen zugefügtes NO in Form von DETA/NO zu keiner intranukleären Zn^{2+} -Anreicherung führt. Somit wurde gezeigt, dass für die nukleäre Freisetzung von Zn^{2+} sowohl proinflammatorische Zytokine als auch NO nötig sind.

3.2.3 MT ist essentiell für die Zn^{2+} -Freisetzung bei Entzündungsreaktionen

Als nächstes sollte der Mechanismus untersucht werden, der nach Gabe von proinflammatorischen Zytokinen für die Anreicherung der Zinkionen im Zellkern verantwortlich ist. Unter physiologischen Bedingungen gibt es kaum freies Zn^{2+} in Zellen. Wie einleitend bereits erwähnt spielt das Zinkspeicherprotein Metallothionein eine wichtige Rolle bei der Zn^{2+} -Homöostase. Da schon gezeigt wurde, dass MT unter dem oxidierenden Einfluss von NO Zink-Ionen freisetzt (Kröncke *et al.*, 1994), stellten wir die Hypothese auf, dass MT die Zink-Anreicherung im Zellkern mediiert. Metallothionein könnte in der Entzündungsreaktion die Rolle eines Zinkspeichers, -transporters und -donors spielen.

Um diese Frage zu klären, wurden die oben beschriebenen Versuche auch mit MAEC aus Mäusen durchgeführt, denen die Gene für die Metallothionein Isoformen 1+2 fehlen (219S7/SvEvBrd-Mt1^{tm1Bri}Mt2^{tm1Bri}). MAEC-MT_{1,2}^{-/-} wurden genauso wie die Wildtyp-Zellen für 24 h mit proinflammatorischen Zytokinen aktiviert. Bei der anschließenden Zinquin-Färbung zeigte sich jedoch keinerlei Zn^{2+} -Freisetzung, weder im Zellkern, noch im Zytoplasma. In Kontrollversuchen, bei denen die MAEC-MT_{1,2}^{-/-} mit NIO, ZnSO₄ oder DETA/NO behandelt wurden, war ebenfalls keine Zn^{2+} -Freisetzung zu sehen (Abb. 7).

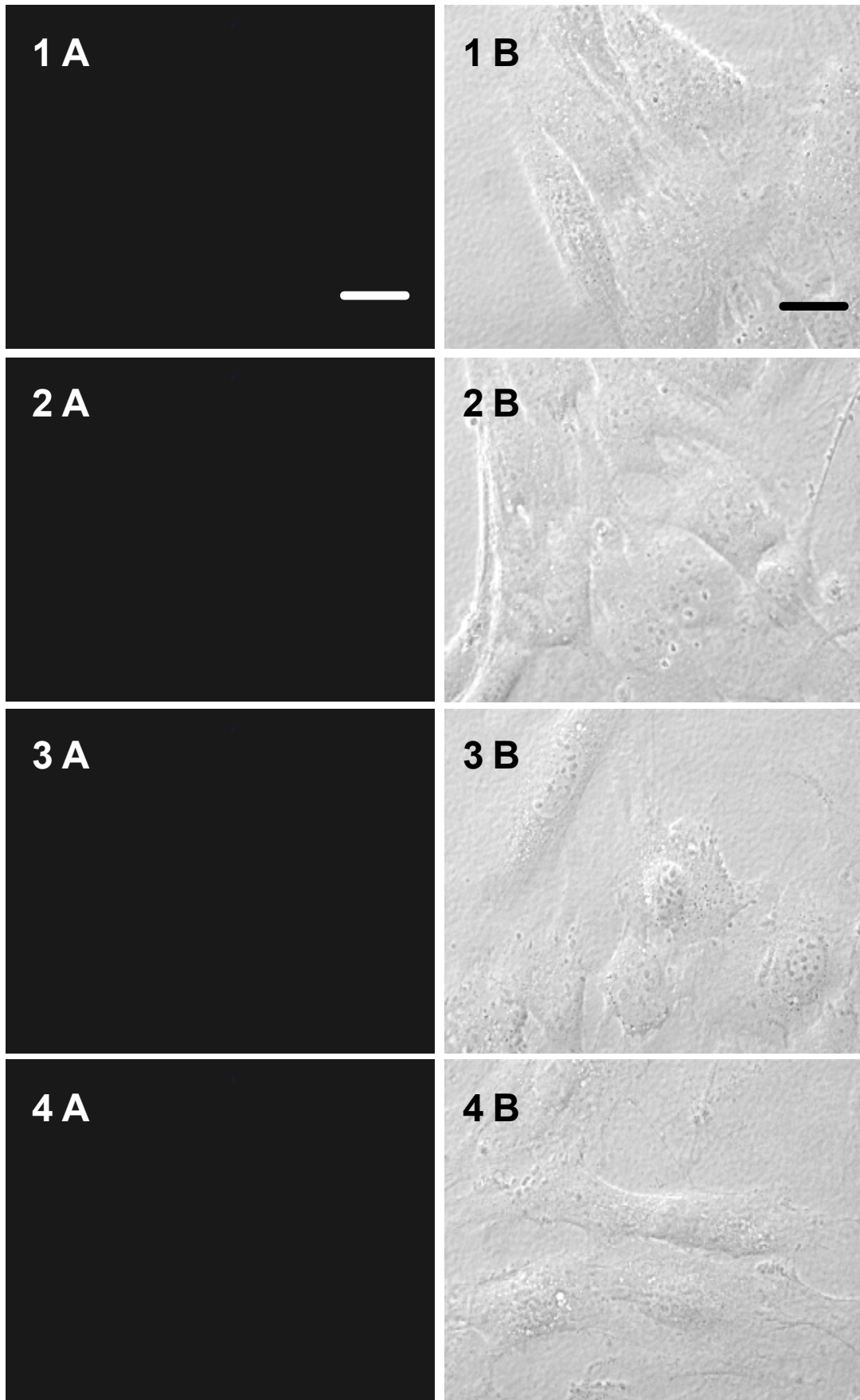


Abb. 7: Zinquin-Färbung von MAEC-MT_{1,2}^{-/-}

- (A) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung nach Zinquin-Färbung zur Darstellung von intrazellulären freien Zinkionen
 (B) Phasenkontrastmikroskopie des gleichen Ausschnitts

Der Versuch erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie in beschrieben, jedoch diesmal mit MAEC-MT_{1,2}^{-/-}. In diesen knock-out Zellen konnte zu keinem Zeitpunkt eine Zn²⁺-spezifische Färbung beobachtet werden. Der Balken entspricht 5 µm. n=5

Somit konnte gezeigt werden, dass nach Aktivierung mit proinflammatorischen Zytokinen sowohl NO als auch MT essentiell für die Zn²⁺-Freisetzung im Zellkern ist. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht dieser Ergebnisse

		WT		MT _{1,2} ^{-/-}	
		Zytoplasma	Kern	Zytoplasma	Kern
unbehandelt	24 h	-	-	-	-
Zytokin-Mix	12 h	-	-	-	-
	24 h	-	+++	-	-
+NIO [0,25 mM]	24 h	-	-	-	-
DETA/NO [200 µM]	12 h	-	-	-	-
	24 h	-	-	-	-
ZnSO ₄ [200 µM]	24 h	+	+	-	-

Tab. 1: Übersicht der Versuche zur intrazellulären Zn²⁺-Lokalisation

Die einzige Situation, bei der es zu einer sichtbaren Zn²⁺-Freisetzung kam, ist nach 24 stündiger Behandlung mit proinflammatorischen Zytokinen bei Wildtyp-MAEC (+++), wobei das Zn²⁺ im Zellkern lokalisiert wurde. Bei den nur mit ZnSO₄ inkubierten Zellen konnte man als Ausdruck einer erhöhten intrazellulären Zn²⁺ Konzentration eine im Vergleich zu den unbehandelten Zellen leicht erhöhte Fluoreszenzaktivität feststellen. Diese erstreckte sich jedoch über den gesamten Zellkörper und war unter den standardisierten Belichtungsbedingungen nicht darstellbar.

3.3 Immunhistochemische Lokalisation von Metallothionein

In den vorherigen Versuchen wurde anhand der MAEC-MT_{1,2}^{-/-} die essentielle Rolle von Metallothionein bei der durch Zytokine induzierten intranukleären Zn²⁺-Freisetzung gezeigt. Es sollte nun untersucht werden, ob MT durch proinflammatorische Zytokine in den Zellkern der MAEC transloziert wird. Wildtyp MAEC sowie MAEC-MT_{1,2}^{-/-} wurden auf 8-Kammer Permanox Objektträgern kultiviert. Zur Darstellung des Metallothioneins wurden dieselben Versuchsbedingungen gewählt, wie schon bei den zuvor durchgeführten Versuchen zur Zn²⁺-Freisetzung (siehe 3.2.1). Zur Aktivierung wurden die Zellen für 6, 12, 18 oder 24 h mit den

3. Ergebnisse

proinflammatorischen Zytokinen aktiviert. Anschließend wurde MT immunhistochemisch nachgewiesen. Als primäre Antikörper wurden spezifische monoklonale Anti-Metallothionein-AK (E9) benutzt, welche die Metallothionein Isoformen 1+2 erkennen. Ihre Spezifität wurde anhand der fehlenden Färbung von MAEC-MT_{1,2}^{-/-} und der Isotyp-Kontrolle nachgewiesen (Abb. 8).

Bei den unbehandelten MAEC zeigte sich eine einheitliche MT-Färbung des Zytoplasmas mit Aussparung des Zellkerns. Nach 6, 12 oder 18 h Aktivierung mit proinflammatorischen Zytokinen war ebenfalls nur das Zytoplasma gefärbt und keine MT-Färbung im Zellkern nachweisbar. Nach 24 h zeigte sich in fast allen aktivierten Zellen eine starke zusätzliche Färbung des Zellkerns, die in der Nähe der Kernmembran besonders intensiv war (Abb. 9). Dies zeigt, dass MT nach Aktivierung mit proinflammatorischen Zytokinen in den Zellkern transloziert wird.

Um die Bedeutung von NO für die MT-Translokation zu untersuchen, wurde im nächsten Schritt die Aktivität der durch die Zytokine induzierten NO-Synthase durch NIO gehemmt. Hierzu wurden die Zellen 24 h lang mit dem proinflammatorischem Zytokin-Mix plus 0,25 mM NIO kultiviert und anschließend immunhistochemisch mit Anti-MT-Antikörper gefärbt. Unter diesen Bedingungen war MT nur im Zytoplasma, jedoch zu keinem Zeitpunkt im Zellkern nachweisbar. Zusätzlich wurden in einem weiteren Versuch die Zellen in Abwesenheit von Zytokinen mit dem NO-Donor DETA/NO (200 µM) behandelt, was jedoch wiederum zu keiner immunhistochemischer Färbung des Zellkerns führte. Zur Kontrolle wurden die Zellen 24 h lang mit 50 µM ZnSO₄ kultiviert, wodurch die zytoplasmatische Färbung etwas intensiver wurde, aber ebenfalls kein MT im Zellkern nachweisbar war.

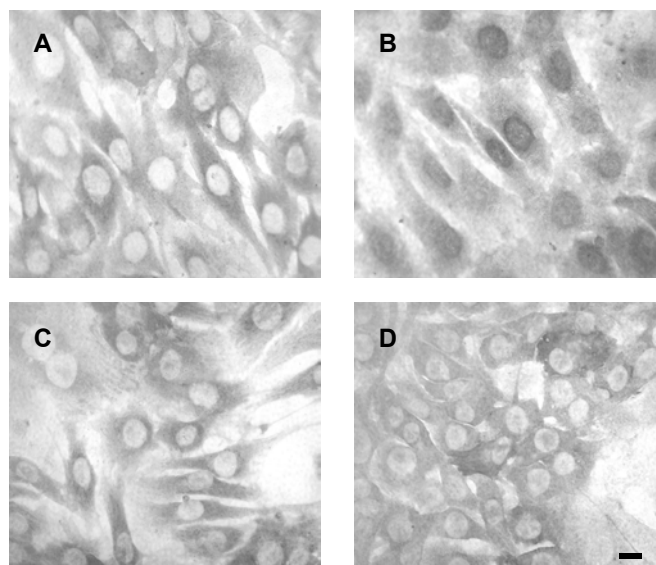


Abb. 8: Immunhistochemischer Nachweis von MT-1 und -2

Wildtyp-MAEC wurden auf 8-Kammer Permanox Objektträgern bis zur Subkonfluenz kultiviert. Anschließend wurden sie entweder ohne **(A)** oder mit proinflammatorischen Zytokinen 24 h lang behandelt **(B)**. Zusätzlich wurden Zellen mit dem Zytokin-Mix plus 0,25 μM NIO **(C)** bzw. mit 200 μM DETA/NO **(D)** inkubiert. Gezeigt werden repräsentative mikroskopische Aufnahmen. Der Balken entspricht 5 μm . n=5

Bei den unbehandelten Zellen **(A)** erkennt man in jeder MAEC eine homogene Färbung des gesamten Zytoplasmas. Die Zellkerne sind fast vollkommen von der Färbung ausgespart. Das gleiche Bild ergibt sich auch für MAEC, die mit proinflammatorischen Zytokinen plus NIO **(C)** oder nur mit DETA/NO **(D)** behandelt wurden. Nur bei mit proinflammatorischen Zytokinen aktivierten MAEC **(B)** erkennt man eine zusätzliche intensive Färbung des Zellkerns.

Dies zeigt, dass die MT-Translokation NO-abhängig ist, da sie mit NIO gehemmt werden kann. Zusätzlich ist die Anwesenheit von Zytokinen notwendig, da die alleinige Behandlung der Zellen mit exogen mittels DETA/NO zugeführtem NO zu keiner MT-Translokation führte. Also sind für die Translokation von MT in den Zellkern sowohl proinflammatorische Zytokine als auch NO essentiell. Auch gibt es eine zeitliche Korrelation zwischen nukleärer MT-Translokation und der Zn^{2+} -Freisetzung. Der MT-Transport in den Zellkern sowie die Zn^{2+} -Freisetzung sind erst etwa 24 h nach Aktivierung der Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen zu beobachten. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Zytokine zu einer Induktion der iNOS führen, und dass anschließend das von der iNOS synthetisierte NO zu einer Translokation von MT in den Zellkern mit folgender intranukleären Zn^{2+} -Freisetzung führt. In Tabelle 2 sind die einzelnen Versuchsergebnisse zusammengestellt.

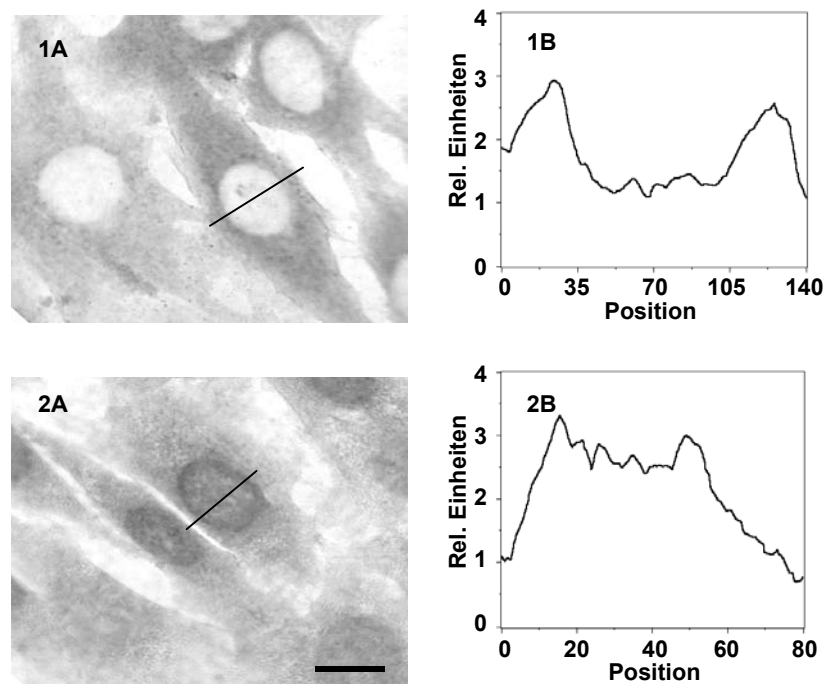


Abb. 9: Linescan nach immunhistochemischer MT-Färbung

3. Ergebnisse

Mit proinflammatorischen Zytokinen für 24 h inkubierte **(2)** sowie unbehandelte MAEC **(1)** wurden mittels Immunhistochemie auf MT angefärbt **(A)**. Anschließend wurde die Intensität der DAB-Färbung entlang einer Linie ermittelt, die durch die Zelle gelegt wurde **(B)**. Der Balken entspricht 5 μm . n=5

Bei den unbehandelten sowie bei den aktivierten MAEC zeigte sich eine granuläre Färbung des Zytoplasmas, jedoch konnte nur bei den aktivierten Zellen eine zusätzliche starke Färbung des Zellkerns beobachtet werden, welche besonders ausgeprägt in der Nähe der Kernmembran war.

		WT		MT _{1,2} ^{-/-}	
		Zytoplasma	Kern	Zytoplasma	Kern
unbehandelt	24 h	+	-	-	-
Zytokin-Mix	6 h	+	-	-	-
	12 h	+	-	-	-
	24 h	+	+++	-	-
+NIO [0,25 mM]	24 h	+	-	-	-
DETA/NO [200 μM]	12 h	+	-	-	-
	24 h	+	-	-	-
ZnSO ₄ [100 μM]	12 h	++	-	-	-
	24 h	++	-	-	-

Tab. 2: Übersicht der Versuche zur intrazellulären MT-Lokalisation

MAEC-WT und MAEC-MT_{1,2}^{-/-} wurden unter den oben beschriebenen Bedingungen kultiviert. Anschließend wurde MT immunhistochemisch angefärbt. Bei MAEC-MT_{1,2}^{-/-} wurde erwartungsgemäß unter allen Versuchsbedingungen kein MT (-) nachgewiesen. In MAEC-WT zeigte sich unter allen Versuchsbedingungen eine basale (+) MT-Färbung im Zytoplasma sowie eine gesteigerte zytoplasmatische Anfärbung (++) bei den mit ZnSO₄ behandelten Zellen. Nur bei den für 24 h mit dem Zytokin-Mix aktivierten MAEC-WT zeigte sich eine zusätzliche sehr starke nukleäre MT Färbung (+++). Aus den unterschiedlichen Versuchen wird erkennbar, dass die intrazelluläre MT-Lokalisation erst nach 24 stündiger Aktivierung auftritt und von durch die iNOS synthetisiertem NO abhängig ist.

3.4 Regulation der Metallothionein mRNS Expression

3.4.1 Induktion von MT durch Schwermetall-Ionen

Im ersten Schritt dieser Untersuchungsreihe wurde der Effekt der Schwermetall-Ionen Zn²⁺ bzw. Cd²⁺ auf die Expression von Metallothionein in MAEC untersucht. Von Metallothionein existieren mehrere Isoformen, von denen in Endothelien den Isoformen 1 und 2 die größte Bedeutung zukommt. Diese beiden Isoformen unterscheiden sich nur in einer Aminosäure,

besitzen jedoch verschieden aufgebaute Promotoren, was eine unterschiedliche Genregulation ermöglicht.

Zn^{2+} bzw. Cd^{2+} können MT-1 und MT-2 sehr stark induzieren (Richards *et al.*, 1984; Yagle & Palmiter, 1985). Im Gegensatz zu Zn^{2+} ist Cd^{2+} sehr toxisch und kommt daher unter physiologischen Bedingungen in Zellen nicht vor. Um die Empfindlichkeit der MAEC zu testen, wurden die Zellen in einem Vorversuch mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cd^{2+} bzw. Zn^{2+} behandelt und anschließend mit Trypan-Blau bzw. mit dem Fluorochrom Hoechst 33342 gefärbt, um einen Zelltod durch Nekrose bzw. durch Apoptose zu erkennen. Hierbei zeigte sich nach einer Inkubation von 6 h mit bis zu 10 μM Cd^{2+} bzw. mit bis zu 100 μM Zn^{2+} keine signifikant erhöhte Apoptose-Rate im Vergleich zu unbehandelten Zellen. In allen weiteren Versuchen wurden deswegen höchstens 10 μM Cd^{2+} bzw. 100 μM Zn^{2+} eingesetzt. MAEC wurden mit 5 und 10 μM $CdCl_2$ bzw. mit 25, 50 oder 100 μM $ZnSO_4$ für 6 h kultiviert (Yagle & Palmiter, 1985), da nach dieser Zeitspanne die maximale Induktion von MT-1 bzw. MT-2 mittels einer Kinetik ermittelt worden war. Bei der Auswertung der anschließenden RT-PCR wurden die Quotienten aus MT-1 bzw. MT-2/GAPDH der unbehandelten Zellen auf 100% normiert. Die Behandlung der MAEC mit 5 μM $CdCl_2$ führte zu einer Verstärkung der MT-1 mRNA Expression auf $173 \pm 7\%$ und der MT-2 mRNA Expression auf $166 \pm 6\%$ (Abb. 10). Mit 10 μM $CdCl_2$ ließ sich die mRNA Expression von MT-1 und -2 sogar beinahe verdoppeln (MT-1: $197 \pm 29\%$; MT-2: $186 \pm 14\%$). Die Kultivierung mit 25 μM $ZnSO_4$ führt zu einer Induktion der MT-1 mRNA auf $170 \pm 7\%$ (MT-2: $161 \pm 6\%$). Mit 100 μM Zn^{2+} -Konzentration konnte noch eine weitere Steigerung der mRNA Expression erreicht werden (MT-1: $210 \pm 33\%$; MT-2: $207 \pm 35\%$). Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl Zn^{2+} als auch Cd^{2+} in MAEC des Wildtyps MT-1 und MT-2 superinduzieren. Hierbei gibt es keinen signifikanten Unterschied in der Expression von MT-1 und MT-2.

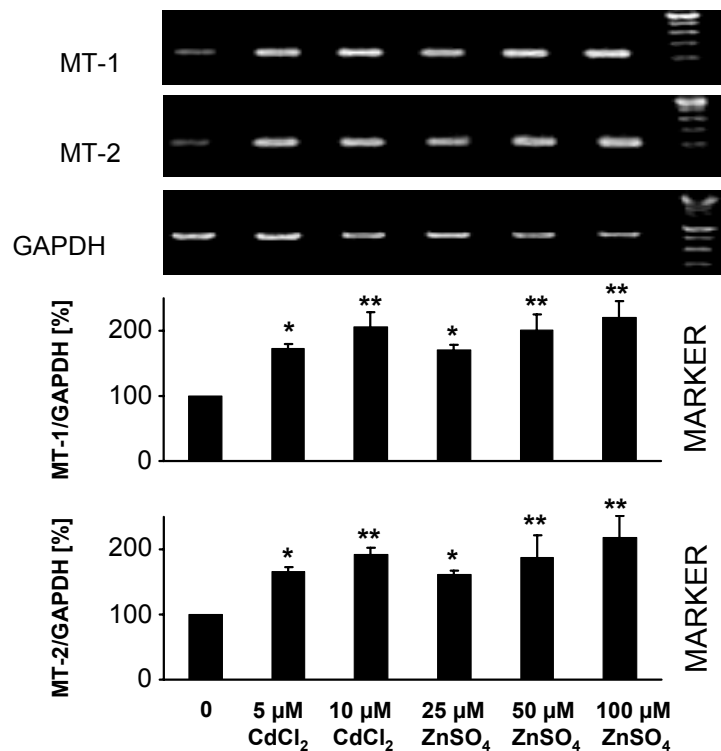


Abb. 10: Induktion von MT-1/-2 durch Cd²⁺ bzw. Zn²⁺

MAEC wurden bis zur Subkonfluenz kultiviert und anschließend mit unterschiedlichen nichttoxischen Konzentrationen der Schwermetalle Cd²⁺ bzw. Zn²⁺ behandelt. Nach 6 h wurden die Zellen lysiert, die mRNA isoliert und daraus mittels reverser Transkription die cDNA synthetisiert. Damit wurde eine für GAPDH, MT-1 und MT-2 mRNA spezifische PCR durchgeführt.

(A) Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Banden mittels UV-Transillumination sichtbar gemacht.

(B) Der Quotient aus der MT-1 bzw. MT-2 und der GAPDH Expression wurde bei den unbehandelten Zellen auf 100% normiert.

Sowohl bei den mit CdCl₂ als auch bei den mit ZnSO₄ behandelten Zellen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Steigerung der MT-1 bzw. MT-2 Expression, wobei die Induktion durch Cd²⁺ deutlich stärker war. n=3 * p<0,05; ** p<0,005

Mit einer weiteren Versuchsreihe sollte der Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen auf die Metallothionein Expression gezeigt werden. MT-1 und -2 sind konstitutiv in MAEC exprimiert. Durch die Einwirkung von IL-1 β + TNF- α + IFN- γ wird ihre Expression jedoch gesteigert. Die mRNA von MT-1 erreicht nach 6-8 h ihre maximale Induktion. Die MT/GAPDH-Quotienten für die 6 h-Werte wurden immer auf 100% normiert. Zu diesem Zeitpunkt ist die MT-1 mRNA-Expression auf ca. 134 \pm 6% im Vergleich zu den unbehandelten Zellen gesteigert. MT-2 mRNA wird ebenfalls durch proinflammatorische Zytokine superinduziert. Das Maximum wird bei diesem Gen schon nach 4 h erreicht und liegt bei etwa 149% verglichen mit der konstitutiven Expression. Nach 24 h erreichen die mRNA-Expression von MT-1 und MT-2 wieder ihren Ausgangswert (Abb. 11).

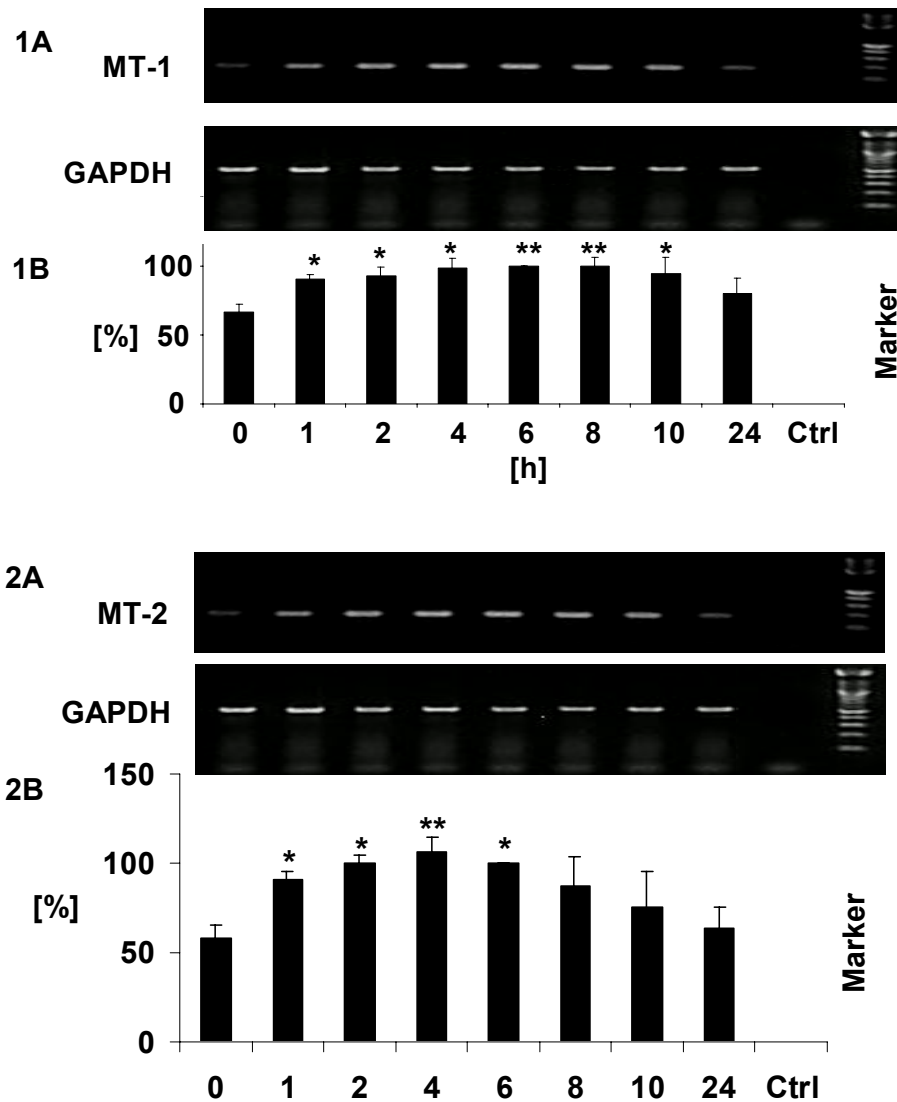


Abb. 11: Kinetik der MT-1 und MT-2 mRNA Induktion durch proinflammatorische Zytokine

Die relative Expression der MT-1, MT-2 und GAPDH mRNA in Wildtyp-MAEC wurde 1-24 h nach Aktivierung bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit 500 U/ml IL-1 β + 500 U/ml IFN- γ + 500 U/ml TNF- α aktiviert. Nach Isolierung der mRNA wurde eine MT-1, MT-2 und GAPDH spezifische RT-PCR durchgeführt.

(A) Elektrophoretische Auftrennung einer repräsentativen MT-1 (1A) bzw. MT-2 (2A) und GAPDH spezifischen RT-PCR Probe, die durch UV-Transillumination sichtbar gemacht wurde.

(B) Balkendiagramm, welches die relative MT-1 (1B) bzw. MT-2 mRNA Expression (2B) im Vergleich zur GAPDH mRNA Expression darstellt. Die für 6 h ermittelten Quotienten wurden auf 100% normiert. Es wurden die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten bestimmt.

Ctrl. = Kontrolle, * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$

Diese Ergebnisse zeigen, dass unter dem Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen sowohl die iNOS induziert wird (Abb. 3) als auch die Expression von MT-1 und MT-2 verstärkt wird. Die etwas früher einsetzende Induktion der iNOS im Vergleich zu

Metallothionein legt die Vermutung nahe, dass das von der NO-Synthase produzierte NO die Induktion von MT vermitteln könnte.

3.4.2 Einfluss von iNOS-synthetisiertem NO auf die MT-Induktion

Als nächstes wurde die Rolle der iNOS-Aktivität bei der Induktion von Metallothionein untersucht. Da gezeigt wurde, dass NO Zink-Ionen aus Zinkfingern und Metallothionein freisetzen kann (Kröncke *et al.*, 1994; Pearce *et al.*, 2000b), lag die Vermutung nahe, dass dieses Zn^{2+} über Metall-responsive Elemente (MRE) die Induktion von MT bewirken könnte (Andrews *et al.*, 2001). Hierfür wurde NIO eingesetzt, welches die Aktivität der iNOS spezifisch und irreversibel hemmt. Die MAEC wurden 6 h lang mit proinflammatorischen Zytokinen bzw. mit Zytokinen plus 0,25 mM NIO kultiviert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen sowie Zellen, die nur mit NIO behandelt wurden (Abb. 12). Die RT-PCR zeigte eine signifikante Induktion der MT-1 mRNA auf $160 \pm 28\%$ und der MT-2 mRNA auf $165 \pm 31\%$ im Vergleich zu den auf 100% normierten unbehandelten Zellen. Der Zusatz von NIO unterdrückt die Steigerung der MT-1 mRNA-Expression beinahe vollständig. Bei MT-2 erniedrigte NIO die mRNA Expression signifikant auf $125 \pm 8\%$. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die aus einer Aktivierung mit Zytokinen resultierende Induktion von Metallothionein durch NO vermittelt wird, welches durch die Zytokin-induzierte iNOS synthetisiert wird.

Eine Stunde nach Aktivierung der MAEC kann man die mRNA der iNOS nachweisen (Abb. 3). Daran schließt sich die Synthese der iNOS mit nachfolgender NO-Produktion an. Nach 4-6 h erkennt man die maximale Steigerung der MT 1+2 mRNA Expression (Abb. 11) und erst nach 24 h kann man nukleäres MT (Abb. 8) und eine nukleäre Zn^{2+} -Freisetzung beobachten (Abb. 5).

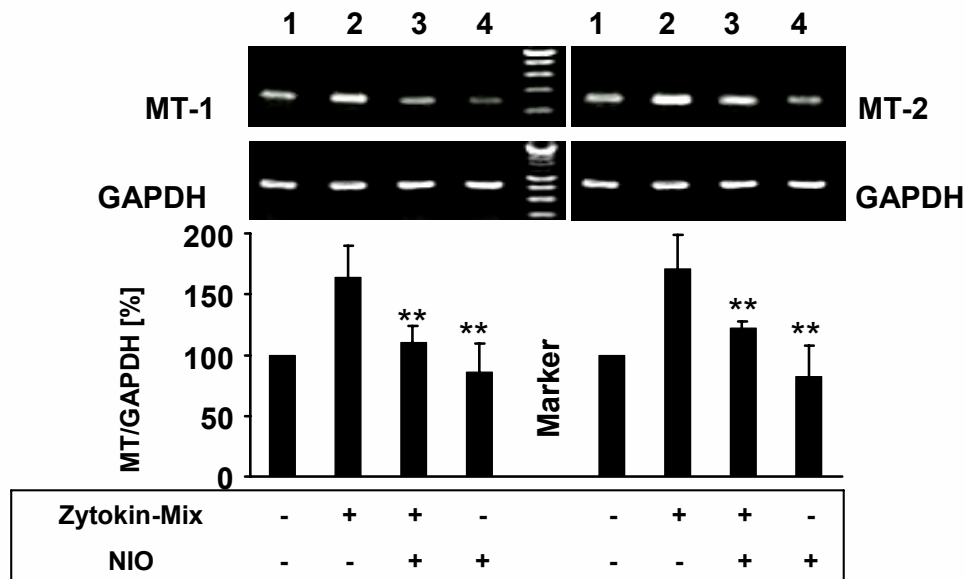


Abb. 12: Einfluss von NIO auf die MT-1 und MT-2 mRNA Expression nach Aktivierung mit Zytokinen

Wildtyp-MAEC wurden für 6 h ohne (1) oder mit dem Zytokin-Mix aus 500 U/ml IL-1 β + 500 U/ml IFN- γ + 500 U/ml TNF- α in Abwesenheit (2) bzw. Anwesenheit von NIO (3) kultiviert. Zur Kontrolle werden die Zellen nur mit NIO kultiviert (4). Nachdem die mRNA isoliert worden war, wurde eine für MT-1 und GAPDH spezifische RT-PCR durchgeführt.

(A) Elektrophoretische Auftrennung eines repräsentativen MT-1 bzw. MT-2 und GAPDH spezifischen RT-PCR Probe, die durch UV-Transillumination sichtbar gemacht wurde.

(B) Balkendiagramm, welches die relative MT-1 bzw. MT-2 mRNA Expression im Vergleich zu GAPDH mRNA Expression darstellt. Die ermittelten Quotienten der mit Zytokinen aktivierten Zellen wurden auf 100% normiert.

n=3; ** p < 0,005 im Vergleich mit den aktivierten MAEC.

3.4.3 Effekt von DETA/NO

Nachdem in den vorausgegangenen Experimenten die NO-Abhängigkeit der MT-Induktion gezeigt worden ist, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob exogen in Form eines NO-Donors zugegebenes NO ebenfalls zu einer gesteigerten Expression von Metallothionein führt. DETA/NO generiert spontan NO mit einer Halbwertszeit von $7,7 \pm 0,8$ h (37 °C, pH 7,4) und ermöglicht so eine über mehrere Stunden anhaltende höhere NO-Konzentration. MAEC wurden in Kulturgefäßen bis zur Subkonfluenz kultiviert und anschließend 6 h lang mit unterschiedlichen Konzentrationen von DETA/NO kultiviert. Mit Hilfe der RT-PCR wurde die mRNA-Expression von MT-1 und MT-2 untersucht. Zur statistischen Auswertung wurden die MT/GAPDH-Ratios von unbehandelten Zellen auf 100% normiert.

Konzentrationen von 0-100 μ M DETA/NO führten zu keiner signifikanten Induktion von MT-1 oder MT-2. Ab einer Konzentration von 200 μ M DETA/NO konnte jedoch eine

3. Ergebnisse

signifikant vermehrte Expression von MT-1 auf $157 \pm 24\%$ und von MT-2 auf $153 \pm 5\%$ beobachtet werden. Zur Kontrolle wurden die Zellen zusätzlich mit denitrosiertem DETA/ NO_{NO} behandelt, wobei sich kein Unterschied in der MT-1 oder MT-2 mRNA Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen ergab (Abb. 13). Somit konnte durch dieses Experiment gezeigt werden, daß die mRNA der Metallothionein Isoformen-1 und -2 nicht nur durch endogen mittels iNOS synthetisiertem NO, sondern auch durch exogen hinzugefügtes NO induziert werden kann. Dabei ist die Größenordnung der Induktion vergleichbar mit der Induktion von MT durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β + IFN- γ + TNF- α , jedoch deutlich kleiner als nach einer Behandlung mit subtoxischen Konzentrationen von Zink oder Cadmium. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass die nach Aktivierung mit Zytokinen beobachtete Metallothionein-Induktion durch NO mediiert wird.

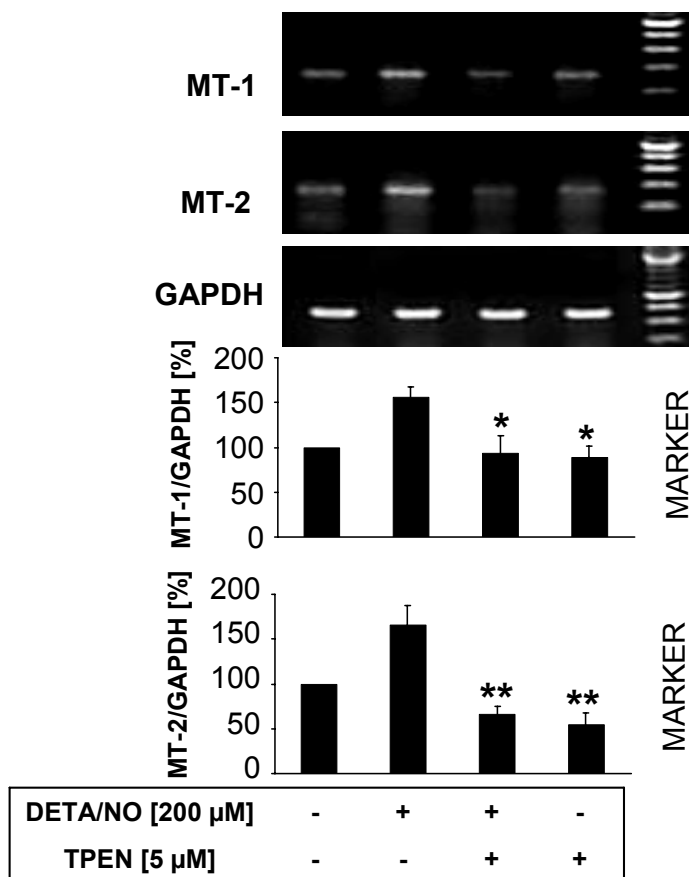


Abb. 13: Konzentrationsabhängige MT-1/-2 Induktion durch DETA/NO
 Die relative Expression der MT-1, MT-2 und GAPDH mRNA Expression in Wildtyp MAEC wurde für unterschiedliche Konzentrationen von DETA/NO bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit 0-200 μM DETA/NO sowie mit 200 μM denitrosiertem DETA/NO 6 h lang inkubiert. Anschließend wurde die mRNA isoliert und eine MT-1 bzw. MT-2 und GAPDH spezifische RT-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen eine konzentrationsabhängige Steigerung der MT-1 bzw. MT-2 mRNA Expression durch DETA/NO. 200 μM DETA/NO_{NO} zeigen keinen Einfluss auf die MT-1 bzw. MT-2 mRNA Expression.

- (A) Elektrophoretische Auftrennung einer repräsentativen MT-1 bzw. MT-2 und GAPDH spezifischen RT-PCR Probe, die durch UV-Transillumination sichtbar gemacht wurde.
- (B) Balkendiagramm, welches die relative MT-1 und MT-2 mRNA Expression im Vergleich zur GAPDH mRNA Expression darstellt. Die für unbehandelte Zellen ermittelten Quotienten wurden auf 100% normiert.

n=3; *p<0,02 in Vergleich zu 200 μ M DETA/NO.

3.4.4 Rolle von Zn^{2+} bei der NO-mediierter MT-Induktion

Da bekannt ist, dass Zink über die Bindung des metall-responsiven Transkriptionsfaktor-1 (MTF-1) an das Metall-responsive Element (MRE) im MT-Promotor die Transkription des MT-1 Gens induziert (Bittel *et al.*, 1998; Smirnova *et al.*, 2000), lag es nahe, die Hypothese aufzustellen, dass die in der Zelle durch NO freigesetzten Zinkionen für die beobachtete NO-abhängige Steigerung der MT-Expression verantwortlich sind. Deshalb wurden die MAEC mit 200 μ M DETA/NO sowie unterschiedlichen Konzentrationen an TPEN behandelt. TPEN ist ein diffusionsfähiger spezifischer Zinkchelator, der eine intrazelluläre Zinkdeprivation bewirkt. Da von anderen Autoren bereits eine wachstumshemmende (Parat *et al.*, 1999) und durch DNS-Strangbrüche Apoptose-fördernde Wirkung (Parat *et al.*, 1997) von TPEN beschrieben worden ist, wurden zuerst die Konzentrationen und Behandlungszeiten ermittelt, unter denen es zu keiner Apoptose bei der MAEC kommt. Hierzu wurden die Zellen mit 0-100 μ M TPEN 6 h lang kultiviert und anschließend mit dem DNS-Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 gefärbt. Die durch eine Apoptose bedingte Kernkondensation und -fragmentation wurde mittels DNS-Färbung sichtbar gemacht (Abb. 14).

Die Ergebnisse zeigen, dass eine 6 stündige Behandlung mit TPEN-Konzentrationen bis zu 5 μ M zu keiner signifikanten Zunahme von apoptotischen Zellen führte. Bei einer Konzentration von 10 μ M TPEN wurde eine leichte Zunahme apoptotischer Zellen von $3,6 \pm 0,9\%$ bei den unbehandelten Zellen auf $8,1 \pm 1,3\%$ beobachtet. Bei einer Konzentration von 25 μ M TPEN zeigten $16,8 \pm 3,4\%$ der Zellen Zeichen einer beginnenden Apoptose. Bei höheren TPEN-Konzentrationen wurde eine starke Induktion der Apoptose beobachtet. Daher wurde in den weiteren Versuchen 25 μ M TPEN als höchste Konzentration verwandt.

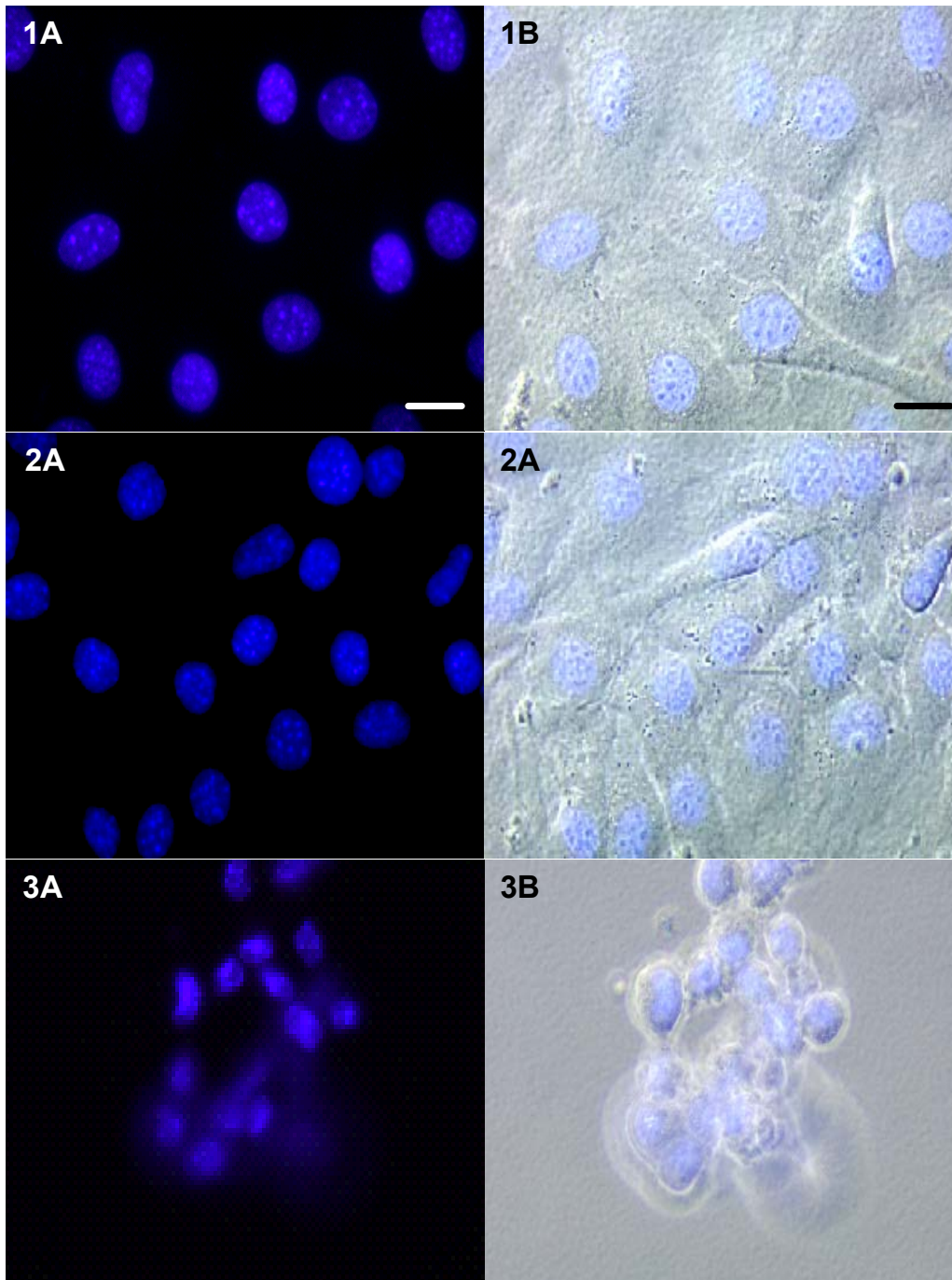


Abb. 14: Zn^{2+} -Deprivation durch höhere TPEN-Konzentrationen führt zur Apoptose

MAEC wurden 6 h lang entweder ohne **(1)** oder mit 25 **(2)** bzw. 50 μM TPEN **(3)** inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 15 μM HOECHST 33342 für 5 min bei 37 °C behandelt.

(A) Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Zellkerne

(B) gleichzeitige Darstellung der MAEC mit Fluoreszenz und Phasenkontrast

Deutlich ist zu erkennen, dass die mit 50 μM TPEN behandelten Zellen sich von der Kulturplatte ablösen, abrunden und zu Gruppen zusammenlagern. Die Zellkerne kondensieren, was an der Abnahme ihres Durchmessers und der vermehrten Fluoreszenzaktivität zu erkennen ist. Dieses morphologische Bild ist typisch für eine Apoptose. Der Balken entspricht 5 μm . n=3

Um die Rolle von Zn^{2+} bei der NO-abhängigen MT-Induktion zu untersuchen, wurden MAEC-WT mit 200 μ M DETA/NO in der An- bzw. Abwesenheit von 10 μ M TPEN kultiviert. Nach 6 h wurde mittels RT-PCR die MT-1 bzw. MT-2 mRNA Expression untersucht. Die MT-1 und MT-2 mRNA Expression unbehandelter Zellen wurde auf 100% normiert (Abb. 15). Die alleinige Behandlung mit 200 μ M DETA/NO führte zu einer signifikanten Steigerung der MT-1 mRNA Expression auf $156 \pm 12\%$ und von MT-2 auf $166 \pm 22\%$. Bei zusätzlicher Behandlung mit 5 μ M TPEN entsprach die mRNA Expression von MT-1 $93 \pm 19\%$ und von MT-2 $66 \pm 9\%$ des Ausgangswertes. Die durch 5 μ M TPEN erreichte Hemmung der durch NO induzierten Steigerung der MT-1 und -2 Expression konnte auch durch höhere Konzentrationen an TPEN (bis 25 μ M) dosisabhängig nicht weiter erniedrigt werden. Zur Kontrolle wurden die MAEC-WT ausschließlich mit 5 μ M TPEN behandelt. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu den Proben, die zusätzlich mit DETA/NO behandelt worden waren. Diese Versuche zeigen, dass die nach NO-Exposition beobachtete Steigerung der MT mRNA Expression durch Zn^{2+} -Freisetzung vermittelt wird.

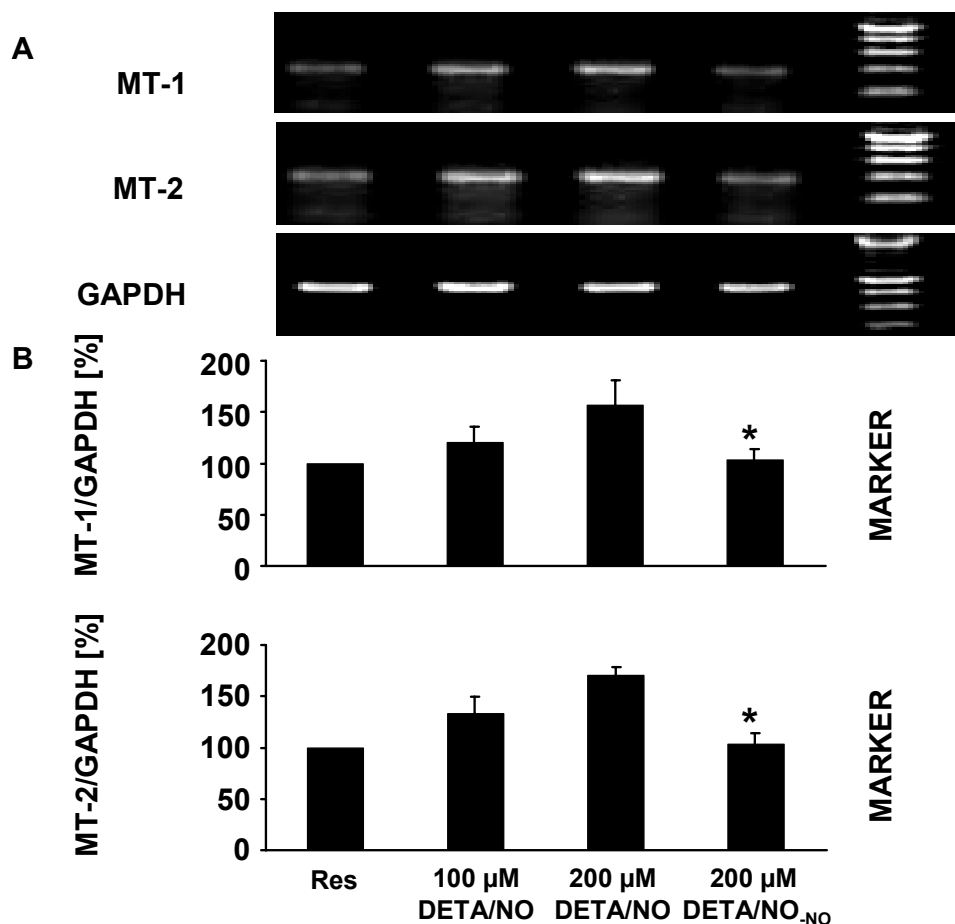


Abb. 15: Hemmung der NO-induzierten Steigerung der MT-1/-2 mRNA Expression durch TPEN

Wildtyp MAEC wurden in der Abwesenheit oder Abwesenheit von 200 μ M DETA/NO 6 h lang kultiviert. Zusätzliche wurden sie mit einer Kombination von 200 μ M DETA/NO und 5 μ M des Zinkchelators TPEN sowie mit TPEN alleine behandelt. Nach Isolierung der mRNA

3. Ergebnisse

wurde eine für MT-1, MT-2 und GAPDH spezifische RT-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen eine NO-abhängige Steigerung der MT-1 bzw. MT-2 mRNA Expression, die mit 5 μ M TPEN vollständig unterdrückt werden kann. TPEN alleine bewirkt keine signifikante Änderung der basalen MT-1 mRNA Expression. Bei MT-2 bewirken 5 μ M TPEN eine signifikante Erniedrigung der mRNA Expression.

(A) Elektrophoretische Auftrennung einer repräsentativen MT-1 bzw MT-2 und GAPDH spezifischen RT-PCR Probe, die mit UV-Transillumination sichtbar gemacht wurde.

(B) Balkendiagramm, welches die relative MT-1 und MT-2 mRNA Expression im Vergleich zur GAPDH mRNA Expression darstellt. Die für die unbehandelten Zellen ermittelten Quotienten sind auf 100% normiert worden.

n=3; * p<0,01; ** p<0,005 im Vergleich zu den nur mit DETA/NO behandelten MAEC.

4 Diskussion

4.1 Einfluss von NO auf die intrazelluläre Zink-Homöostase

Die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) ist zuerst in Makrophagen charakterisiert worden, die mit Lipopolysaccharid (LPS) und Makrophagen IFN- γ aktiviert wurden (Hibbs, Jr. *et al.*, 1987; Stuehr *et al.*, 1990). Jedoch fand man sehr schnell heraus, dass sich die iNOS in einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen induzieren lässt (Kröncke *et al.*, 1995). Eine Kombination der proinflammatorischen Zytokinen TNF- α , IL-1 β und IFN- γ induziert die iNOS sehr wirksam in murinen Aorten-Endothelzellen (MAEC) (Suschek *et al.*, 1993). In unbehandelten MAEC konnte ich ebenfalls keine iNOS-spezifische mRNA finden, jedoch 1 h nach Aktivierung mit proinflammatorischen Zytokinen war diese bereits nachweisbar und erreichte ihren maximalen Wert nach ca. 4 h. Schon 8 h nach Stimulation ist die maximale Expression wieder um ca. 25% abgesunken. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit anderen Zellen wie z.B. Hepatozyten (Geller *et al.*, 1993) oder glatten Muskelzellen (Evans *et al.*, 1994) gefunden.

Die iNOS katalysiert eine 5 Elektronen-Oxidation von L-Arginin zu äquimolaren Konzentrationen an NO und L-Citrullin. Unter streng anaeroben Bedingungen ist NO stabil, in Gegenwart von Sauerstoff wird es jedoch zu reaktiven Stickoxid-Zwischenprodukten wie z. B. N₂O₃ oxidiert. Diese besitzen einen elektrophilen Charakter und haben auch ein wesentlich breiteres Reaktionsspektrum als NO. Zum Schluss entstehen die stabilen Endprodukte Nitrit und Nitrat (Butler & Williams, 1993). In den Überständen unbehandelter MAEC war eine basale Nitrit-Konzentration nachweisbar, welche durch die Aktivität der konstitutiv exprimierten Ca²⁺-abhängigen ecNOS erklärt werden kann. Diese basale Nitritkonzentration wurde durch Aktivierung mit proinflammatorischen Zytokinen innerhalb von 24 h um das ca. 15-fache gesteigert. Die iNOS-Spezifität dieser Reaktion konnte durch eine erfolgreiche Hemmung mittels N^ω-Iminoethyl-L-Ornithin (NIO) gesichert werden (Rees *et al.*, 1990; McCall *et al.*, 1991). Diese Ergebnisse zeigen, dass unter Entzündungsbedingungen die NO-Synthese mittels iNOS stark erhöht ist, was mit dem Begriff „Nitrosativer Stress“ bezeichnet wird.

Die Rolle von NO während Entzündungsreaktionen ist Gegenstand intensiver Forschung. Ein bekannter Wirkungsmechanismus ist die S-Nitrosierung von SH-Gruppen in Proteinen. Unter aeroben Bedingungen, d.h. wahrscheinlich nach Reaktion zu N₂O₃, bewirkt NO eine S-Nitrosierung von Cysteinen im Zinkspeicherprotein MT mit nachfolgender Zn²⁺-Freisetzung (Kröncke *et al.*, 1994; Misra *et al.*, 1996; Aravindakumar *et al.*, 1999). Diese Zn-S Cluster

4. Diskussion

kommen in vielen Proteinen vor und fungieren u.a. zur Aufrechterhaltung ihrer Tertiärstruktur und Funktion. So ermöglichen sie die Bildung von Zinkfingern in Transkriptionsfaktoren (Klug & Schwabe, 1995), die für eine spezifische Bindung an DNS oder RNS essentiell bzw. für Protein-Protein Interaktionen verantwortlich sind. Reduzierte Cysteine befinden sich auch in katalytischen Zentren verschiedener Enzyme, deren Aktivität durch S-Nitrosierung gehemmt werden kann (Gergel & Cederbaum, 1996; Kröncke & Carlberg, 2000; Kröncke, 2001a; Kröncke, 2001b).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den durch „Nitrosativem Stress“ hervorgerufenen Änderungen der Zn^{2+} -Homöostase. Zur Darstellung von intrazellulärem labilem Zn^{2+} eignet sich das Fluorochrom Zinquin, welches nicht-fluoreszierend und membranpermeabel ist. Nach Bindung von Zn^{2+} wird es stark fluoreszierend und ermöglicht somit die Detektion von intrazellulärem Zn^{2+} . Zinquin formt Zinquin-Zink-Komplexe im Verhältnis 1:1 bzw. 2:1 mit einer Bindungskonstante von 3×10^6 bzw. $12 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Da die Bindungskonstante von Zn^{2+} in MT im Bereich von $2 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ liegt, ist eine Komplexierung von MT-gebundenen Zn^{2+} durch Zinquin unwahrscheinlich (Zalewski *et al.*, 1993). Da Zinquin Zn^{2+} nicht aus Zinkfinger-ähnlichen Strukturen von Proteinen herauslösen kann, sind relative Veränderungen in den Fluoreszenzintensitäten somit ein Maß der Veränderungen der intrazellulären freien Zn^{2+} -Konzentration.

Um die relative Zn^{2+} -Verteilung über den Zellkörper zu ermitteln, wurde eine Linie durch die Zelle gelegt und die Lichtintensität entlang dieser Linie gemessen (Linescan siehe Abb. 5). Die Abnahme der Fluoreszenz nach Behandlung der Zellen mit dem spezifischen Zn^{2+} -Chelator TPEN und die Zunahme nach exogener Applikation von Zn^{2+} zeigt die Spezifität der Zinquin-Färbung (Berendji *et al.*, 1997; St Croix *et al.*, 2002). Außerdem ist mittels digitaler Dekonvolutionsmikroskopie gezeigt worden, dass sich die Zn^{2+} spezifische Zinquin-Fluoreszenz nicht auf der Zelloberfläche, sondern im Zellinneren befindet (Nasir *et al.*, 1999). Weiterhin war es sehr wichtig, durch eine möglichst kurz gewählte Belichtungszeit störende Hintergrundfärbungen, die durch das Medium hervorgerufen werden, zu eliminieren. Deshalb ist es nicht möglich in unbehandelten Zellen die schwache Zinquin-Färbung zu erkennen, obwohl natürlich auch hier intrazellulär Zn^{2+} nachweisbar ist, welches sich hauptsächlich in Vesikeln befindet.

Nach Behandlung von unterschiedlichen Zelltypen mit NO-Donoren konnte eine Zunahme der freien intrazellulären Zn^{2+} -Konzentration vor allem im Zytoplasma beobachtet werden (Berendji *et al.*, 1997; Haase & Beyersmann, 1999; St Croix *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse konnte ich mit meiner Arbeit bestätigen. Um herauszufinden, ob auch eine iNOS-Aktivität mit nachfolgender Synthese von endogenem NO zu einer Veränderung der intrazellulären

Zink-Verteilung führt, wurden MAEC mit $\text{IL-1}\beta + \text{TNF-}\alpha + \text{IFN-}\gamma$ aktiviert. Das durch die iNOS gebildete NO führt in aktivierten MAEC nach 24 h zu einer einheitlichen starken intranukleären Zn^{2+} -Freisetzung. Die unterschiedliche intrazelluläre Verteilung des freien Zn^{2+} in Zellen, die mit DETA/NO bzw. proinflammatorischen Zytokinen behandelt wurden, deutet daraufhin, dass für die gezielte Anreicherung von freien Zn^{2+} im Zellkern sowohl NO als auch proinflammatorische Zytokine benötigt werden (Abb. 16). Eine irreversible Hemmung der iNOS-Aktivität durch NIO sowie die Kultivierung von MAEC mit dem NO-Donor DETA/NO in Abwesenheit des Zytokin-Mixes führten zu keiner Zn^{2+} -Anreicherung im Zellkern.

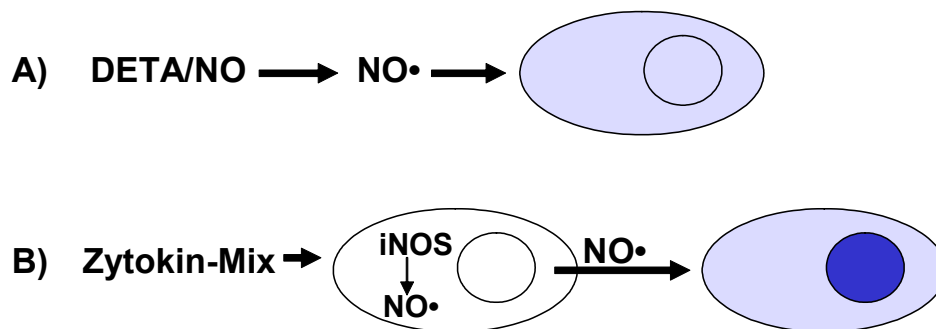


Abb. 16: Unterschiedliche Einflüsse von exogenem und durch iNOS synthetisiertem NO auf die Zn^{2+} -Homöostase

- (A) Das aus DETA/NO freigesetzte NO führt zu einer Zn^{2+} -Freisetzung vor allem im Zytoplasma von MAEC, die mit dem Fluorochrom Zinquin sichtbar gemacht werden kann.
- (B) In MAEC, die für 24 h mit proinflammatorischen Zytokinen aktiviert wurden, führt das durch die induzierte iNOS synthetisierte NO zu einer starken Zn^{2+} -Anreicherung im Zellkern. In beiden Situationen wirkt das NO von aussen auf die Zelle ein, jedoch kommt es nur unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine und einer aktiven iNOS zu einer gezielten Zn^{2+} -Freisetzung im Zellkern.

Die hierbei zu beobachtende Diskrepanz zwischen der Wirkung von exogen hinzugefügtem NO und von NO, welches nach Aktivierung der iNOS synthetisiert wird, ist umso erstaunlicher, da auch das endogen durch die iNOS gebildete NO zuerst die Zelle verlassen muss, um seine Wirkung zu entfalten. Dies wurde dadurch gezeigt, dass aktivierte MAEC 24 h lang in Gegenwart syngener muriner Erythrozyten, die als natürliche NO-Scavenger fungieren, kokultiviert wurden (Berendji-Grün, 1999). Das Häm der Erythrozyten fängt das extrazelluläre NO ab und oxidiert es mit O_2 zu Nitrat. Abhängig von der Anzahl der Erythrozyten kam es zu einer Abnahme der Zn^{2+} -abhängigen Fluoreszenz-Aktivität innerhalb der MAEC. Somit ist zu vermuten, dass das nach Aktivierung endogen gebildete NO zuerst aus der Zelle heraus diffundieren muss, um in Nachbarzellen eine Zn^{2+} -Freisetzung zu bewirken. Aufgrund der beobachteten zeitlichen Latenz der nukleären Zn^{2+} -Freisetzung (24 h nach Aktivierung der

Zellen) lässt sich eine Abhängigkeit von der Aktivität der iNOS vermuten. In dieser Latenzzeit wird die iNOS mRNA-Synthese induziert, dann das Protein exprimiert und schließlich eine ausreichende Menge an NO synthetisiert. Die Zn^{2+} -Freisetzung konnte durch den spezifischen iNOS Inhibitor NIO unterbunden werden. Zusätzlich konnte eine fehlende Zn^{2+} -Freisetzung nach Aktivierung von iNOS^{-/-}-MAEC gezeigt werden (Berendji-Grün, 1999). Dies zeigt, dass NO essentiell für die Zytokin-induzierte Zn^{2+} -Freisetzung ist.

In aktivierten MAEC sind im Gegensatz zum restlichen Nukleus Spots mit stark erhöhter Zn^{2+} -Freisetzung zu erkennen (Abb. 5-1). Vermutlich sind diese Spots Stellen, an denen besonders viel Zn^{2+} benötigt wird. Von mehreren Autoren wurde bis jetzt eine Ansammlung nukleärer Faktoren in bestimmten subnukleären Kompartimenten beschrieben. Beispiele für diese supramolekularen Komplexe sind coiled bodies, promyelotic leukemia (PML) nuclear bodies, BRCA1 nuclear dots, splicing speckles, usw. (Lamond & Earnshaw, 1998). Es ist zur Zeit noch unbekannt, ob diese Strukturen nur inaktive Ansammlungen oder Speicherplätze sind, oder ob sie eine essentielle Rolle in nukleären Prozessen wie der Transkription oder dem Splicing spielen. Eine mögliche Quelle der Zn^{2+} -Freisetzung in diesen Speckles könnten RING Proteine sein, die in mehreren Speckles bereits nachgewiesen (Kentsis *et al.*, 2002). Proteine mit einer RING Domäne können über Cysteine Zn^{2+} binden (Borden, 2000). Da Cystein- Zn^{2+} -Komplexe molekulare Angriffspunkte für NO sind, könnten auch die RING Domänen unter „Nitrosativem Stress“ Zn^{2+} freisetzen. Die Anreicherung von Zn^{2+} im Zellkern unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine erfolgt gegen ein Konzentrationsgefälle und lässt daher vermuten, dass es einen Zn^{2+} -Transporter gibt, der aktiv diese intrazelluläre Umverteilung herbeiführt. Als Transporter kommt das Zink-Speicherprotein Metallothionein in Frage.

4.2 Die Rolle von MT bei der nukleären Zn^{2+} -Freisetzung durch nitrosativen Stress

Wie bereits zu Beginn eingeführt ist Metallothionein ein kleines, Cystein-reiches und ubiquitär vorkommendes Protein, das mittels Zink-Schwefel-Cluster bis zu 7 Zn^{2+} binden kann. Eine aktive Translokation von zytoplasmatischem MT in den Zellkern könnte ein Mechanismus sein, um eine Zn^{2+} -Anreicherung im Zellkern zu erreichen. Diese Vermutung stützt sich auf die Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen, die unter bestimmten Bedingungen eine Translokation des hauptsächlich im Zytoplasma befindlichen MTs in den Zellkern zeigten (Cherian & Apostolova, 2000; Pearce *et al.*, 2000a).

Obwohl MT eine hohe Bindungskonstante zu Zn^{2+} hat (ca. $2 \times 10^{12} M^{-1}$), kann es Zn^{2+} an metallfreie Apoformen von Zinkenzymen abgeben. Dieser Transfer wird möglicherweise unter anderem von Glutathion mediiert (Jacob *et al.*, 1998; Maret & Vallee, 1998). Die Translokation von MT in den Zellkern wurde auch bei der Regeneration und Wundheilung beobachtet. So konnte nach einer teilweisen Hepatektomie bei der Ratte eine Umverteilung von MT in den Zellkern gezeigt werden (Tsujikawa *et al.*, 1994). Zusätzlich erfolgt eine Translokation von MT in den Zellkern unter UV-B Behandlung bei mit Cadmium vorbehandelten Zellen (Hanada *et al.*, 1998). Insgesamt gesehen scheint MT als Zn^{2+} Speicher- und Transportprotein eine wichtige Funktion bei vielen zellulären Prozessen zu spielen.

MT kann aufgrund seiner geringen Molekularmasse (<7 kD) passiv durch Kernporen diffundieren. Der molekulare Mechanismus der aktiven Translokation von MT ist jedoch bisher unbekannt. Karyophile Proteine besitzen oft bestimmte nukleäre Translokationssignale (NLS) (Dingwall & Laskey, 1991; Robbins *et al.*, 1991), diese konnten jedoch bei MT nicht nachgewiesen werden. In H9C2 und L6 Myoblasten wurde gefunden, dass die bei der Proliferation auftretende MT-Translokation in den Zellkern vom Ras-Raf-1-MAP-Kinase Signalweg abhängig ist. Dies ergab sich durch eine Hemmung der Proliferation und Translokation nach Zugabe von PD 98059, einem spezifischen Inhibitor des MAP-Kinase Signalweges. Somit scheint für die Translokation von MT in den Zellkern eine Phosphorylierung von Proteinen mittels Kinasen notwendig zu sein (Apostolova *et al.*, 2000). In humanen SCC25 Tumorzellen zeigten Woo *et al.*, dass der Transport von MT in den Zellkern energieabhängig, sättigbar und von der Anwesenheit von ein oder zwei Glykoproteinen abhängig ist (Woo *et al.*, 2000). Eine Diffusion von MT in den Zellkern mit anschließendem selektivem und aktivem Zurückhalten durch nukleäre Bindungsstellen wurde postuliert, jedoch konnten bisher noch keine nukleäre Bindungsstellen für MT identifiziert werden. Alternativ könnte die Translokation von MT auch über die Lokalisation ihrer mRNA vermittelt werden (Hesketh, 1996). Die MT mRNA ist über die 3'UTR-Region mit dem perinukleären Zytoskelett verbunden (Levadoux *et al.*, 1999). Dies erlaubt eine Synthese des Proteins an einem Ort, von dem es nach Bedarf schnell in den Nukleus importiert werden kann. Diese Hypothese könnte auch erklären, warum sich in aktivierten MAEC gerade in der Nähe der Kernmembran eine besonders hohe MT-Konzentration fand (siehe Abb. 9). Möglich ist auch, dass Chaperone existieren, die nach Aktivierung durch Zytokine an MT binden und den Transport von MT in den Zellkern bewirken (Ogra & Suzuki, 2000).

Mittels Immunhistochemie konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Aktivierung der Wildtyp MAEC mit einem Mix aus $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ und $IFN-\gamma$ nach 24 h zu einer Translokation von MT aus dem Zytoplasma in den Zellkern führt. Um zu untersuchen, ob diese

4. Diskussion

Translokation NO abhängig ist, wurden die MAEC zusätzlich mit dem NOS spezifischen Hemmstoff NIO behandelt. Unter diesen Bedingungen fand keine Translokation von MT in den Zellkern statt. Dies zeigt, dass die MT-Translokation NO-abhängig ist. Jedoch genügte es nicht, exogenes NO in Form des NO-Donors DETA/NO zu den Zellen hinzuzufügen, um eine MT-Translokation zu bewirken. Genau wie bei der gezielten Zn^{2+} -Freisetzung im Zellkern ist auch die MT-Translokation abhängig von zwei Signalen: von Zytokinen und von NO. Um einen vermuteten Zusammenhang zwischen der beobachteten Zn^{2+} -Anreicherung im Zellkern und der MT-Translokation in den Zellkern nach Aktivierung mit proinflammatorischen Zytokinen zu zeigen, wurden MAEC aus MT-1 und MT-2 knock-out Mäusen isoliert. Diese wurden ebenso wie die Wildtyp MAEC mit proinflammatorischen Zytokinen für 24 h aktiviert und anschließend mit Zinquin gefärbt. In den MAEC $MT_{1,2}^{-/-}$ konnte keine Zn^{2+} -Freisetzung nach Aktivierung mit proinflammatorischen Zytokinen gemessen werden, was zeigt, dass MT essentiell für die intranukleäre Zn^{2+} -Freisetzung in Wildtyp-Zellen ist.

Aufgrund der gezeigten Abhängigkeit der Zn^{2+} -Freisetzung von MT liegt es nahe zu vermuten, dass NO Zn^{2+} aus MT löst. Kröncke *et al.* zeigten *in vitro*, dass NO unter aeroben Bedingungen nach S-Nitrosierung Zn^{2+} aus MT freisetzt (Kröncke *et al.*, 1994). Zur Untersuchung des Einflusses von NO auf die Konformation von MT *in vivo* und damit auf eine Zn^{2+} -Freisetzung wurde von Pearce *et al.* Pulmonalarterien-Endothelzellen des Schafes mit einem Konstrukt transfiziert. Hierdurch entstand ein Fusionsprotein, das aus MT besteht, welches auf der eine Seiten von einem cyan-grünen Fluoreszenzprotein und auf der anderen Seite von einem gelb-grünem Fluoreszenzprotein eingerahmt ist (Pearce *et al.*, 2000a). Anhand der Änderung des Fluoreszenzresonanz-Energietransfers (FRET) können Änderungen der intramolekularen Entfernung und damit die relative Orientierung von Fluoreszenz-markierten Proteine voneinander beobachtet werden (dos Remedios & Moens, 1995; Gordon *et al.*, 1998). Die Freisetzung von gebundenen Zn^{2+} führt zu einer Auffaltung von MT (Winge & Miklossy, 1982). Diese Konformationsänderung lässt sich im obigen Fall durch eine Abnahme der Fluoreszenz-Emission quantifizieren. Pearce *et al.* behandelten Pulmonalarterien-Endothelzellen mit NO-Gas bzw. dem NO-Donor S-Nitrosoglutathion und konnten mittels FRET eine Konformationsänderung von MT messen, was vermutlich zu einer intrazellulären Zn^{2+} -Freisetzung führt (Pearce *et al.*, 2000a). Als weitere Quelle für die nukleäre Zn^{2+} -Freisetzung unter „Nitrosativem Stress“ kommen Zinkfinger-TF in Frage (Berendji *et al.*, 1999; Kröncke & Carlberg, 2000; Berendji-Grün *et al.*, 2001). Jedoch reicht das von ihnen gebundene Zn^{2+} vermutlich nicht aus, um die starke Zinquin-Färbung im Zellkern erklären zu können, da in aktivierten MAEC $MT_{1,2}^{-/-}$ keine Zellkernfärbung beobachtet werden konnte.

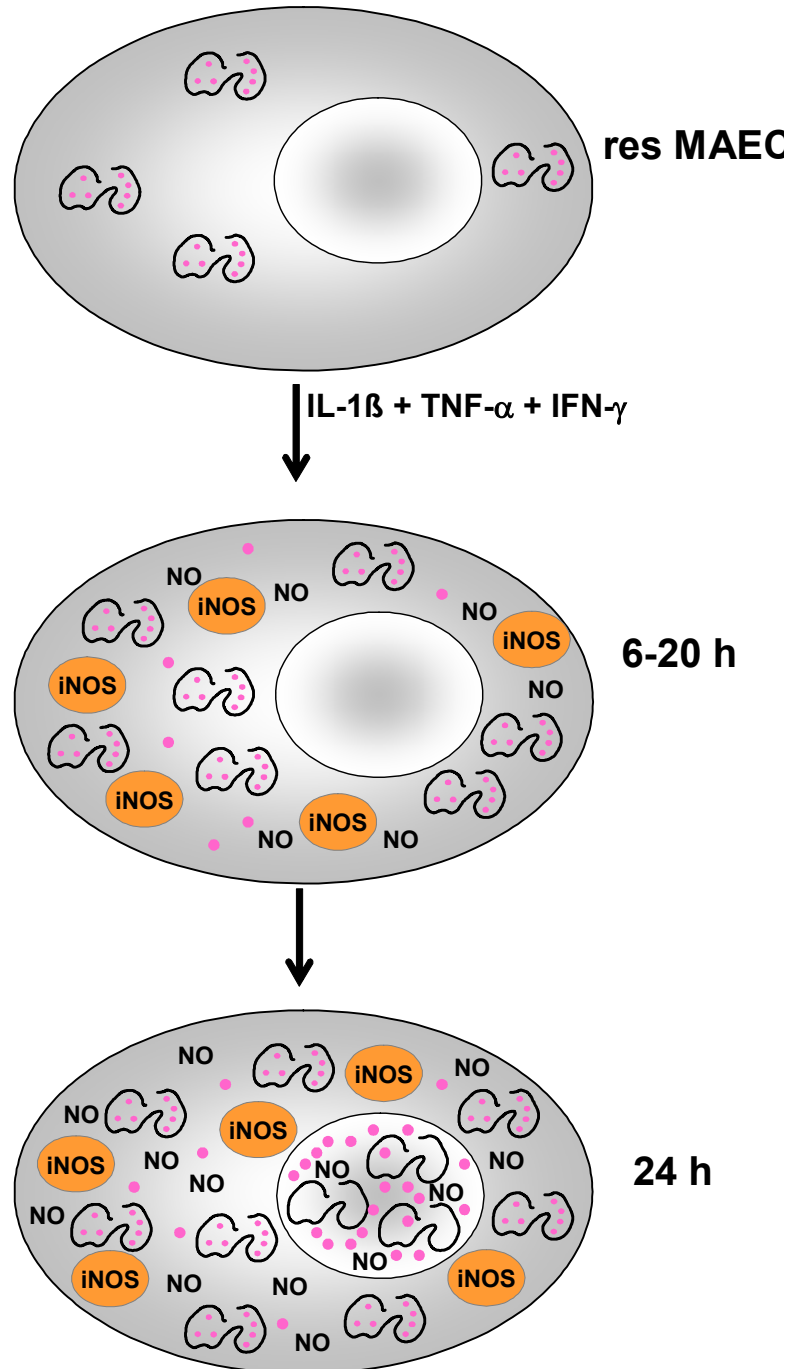


Abb. 17: Zusammenhang zwischen MT-Translokation und Zn²⁺-Freisetzung im Zellkern

Bei unbehandelten MAEC befindet sich MT im Zytoplasma. Es existieren nur sehr geringe Mengen an freien Zink-Ionen im Zytoplasma bzw. im Zellkern. Werden die MAEC jedoch mit einem Mix aus proinflammatorischen Zytokinen aktiviert, zeigt sich sowohl eine MT- als auch eine Zn²⁺-Anreicherung im Zellkern.

Im Zellkern wurde Zn²⁺ im Nucleolus sowie an den Chromosomen lokalisiert und stabilisiert dort die Struktur von DNS, RNS und Ribosomen (Wu & Wu, 1987). In der vorliegenden Arbeit war bei der Färbung unbehandelter wie aktivierter MAEC mit Zinquin bei einigen

4. Diskussion

Zellen eine deutliche Färbung intranukleärer Verdichtungen zu erkennen, die am ehesten Chromosomen während der Mitose entsprechen könnten (Abb. 5-2 und 5-3). Diese Beobachtung deutet auf eine von proinflammatorischen Zytokinen unabhängige Translokation von Zn^{2+} und MT in den Zellkern während des Zellzyklus hin. Bei Versuchen mit konfluent gewachsenen MAEC führte eine Aktivierung mit dem proinflammatorischen Zytokin-Mix nach 24 h zu keiner Translokation von Zn^{2+} und MT in den Zellkern (Daten nicht gezeigt). Daher wurden alle Versuche mit sich noch in der Proliferationsphase befindlichen subkonfluent gewachsenen MAEC durchgeführt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Anreicherung von MT und Zn^{2+} in den Zellkern von der Anwesenheit mitogen wirkender Wachstumssignalen abhängig ist.

Apostolova und Cherian untersuchten den Einfluss des Zellzyklus auf die intrazelluläre Verteilung von Zn^{2+} und MT an 3T3-L1 Fibroblasten (Apostolova *et al.*, 2000; Apostolova & Cherian, 2000). Sie zeigten eine Translokation von Zn^{2+} und MT während der späten G_1 /frühen S-Phase sowie eine anschließende postmitotische Rückverteilung ins Zytoplasma. Alle proliferierenden Zellen durchlaufen ständig einen Generationszyklus, der aus Interphase und anschließender Mitose besteht. Die Interphase, die sich nach jeder erfolgten Zellteilung anschließt, kann man in 3 Abschnitte unterteilen. In der G_1 -Phase steht die RNS- und Proteinsynthese im Vordergrund (Pardee, 1989). Fehlen der Zelle Wachstumsfaktoren oder besteht ein Substratmangel, so hören sie auf zu proliferieren und treten in die G_0 -Phase ein (Cross *et al.*, 1989; Murray, 1992). In der S-Phase proliferierender Zellen erfolgt die Synthese und Verdopplung der DNS im Zellkern. Danach folgt die relativ kurze G_2 -Phase, in der es wieder zur RNS- und Proteinsynthese kommt und die in die Mitosephase (M) mündet. Hier kommt es zu einer starken Spiralisierung der Chromosomenfäden, so dass sie auch lichtmikroskopisch erkennbar werden. Die beobachteten Zellkernverdichtungen entsprechen sehr wahrscheinlich dem Chromosomenknäuel (*Spirem*), welches am Anfang der M-Phase entsteht. Interessant ist, dass die beobachtete Zn^{2+} -Freisetzung entlang der Chromosomen auch bei nicht aktivierten Zellen beobachtet werden konnte, was auf eine iNOS- und Zytokin-unabhängige Zn^{2+} -und MT-Translokation während des Zellzyklus hindeutet, wie sie auch bei 3T3-L1 Fibroblasten beobachtet wurde. Während des aktiven Zellwachstums und der Proliferation besteht ein gesteigerter Bedarf an Zn^{2+} . MT ist u.a. dafür verantwortlich, die Verfügbarkeit des intrazellulären Zn^{2+} zu kontrollieren (Ohtake *et al.*, 1978; Nagel & Vallee, 1995; Willi A & Hunziker, 1999). Zusätzlich ist bekannt, dass die MT-Synthese während der Zellproliferation gesteigert ist, was möglicherweise durch Wachstumsfaktoren und Aktivatoren der Proteinkinase C kontrolliert wird (Imbra & Karin, 1987).

Mehrere Enzyme, die mit der DNS- und RNS-Synthese im Zusammenhang stehen, sind Zink-Metalloproteine, wie zum Beispiel die RNS-Polymerase (Wu *et al.*, 1992). Chester *et al.* zeigten, dass die DNS-Synthese bei Zinkmangel durch eine verminderte Tymidinkinase-Aktivität beeinträchtigt ist. Dieses Enzym gehört nicht in die Gruppe der Zink-Metalloproteine, doch ist seine Transkription Zn^{2+} -abhängig (Chesters *et al.*, 1990). Das von MT unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine in den Zellkern transportierte Zn^{2+} spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Genregulation. Zinkionen beeinflussen zahlreiche zelluläre Prozesse (Beyersmann & Haase, 2001), sie sind Kofaktoren für viele Enzyme (Berg & Godwin, 1997) und auch essentiell für die Genexpression mittels Zinkfinger-TF und Metall-responsiven Elementen. Zn^{2+} ist in Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren (TF) durch Cystein- und/oder Histidin-komplexiert und formt auf diese Weise Zinkfinger (Klug & Schwabe, 1995). Diese sind für die Funktion der TF entscheidend, da sie eine Minidomäne bilden, die für die Bindung an die DNS essentiell ist. Zinkfinger-TF sind z.B. Sp1, EGR-1 (Skerka *et al.*, 1995) und nukleäre Rezeptoren wie z.B. der Glukokortikoid-Rezeptor (Umesono & Evans, 1989) oder der Vitamin D Rezeptor (Kröncke & Carlberg, 2000). Für die DNS-Bindungsaktivität von Zinkfinger-TF spielt der Transfer von Zink aus Cystein-Clustern ein wichtige Rolle (Cano-Gauci & Sarkar, 1996; Maret *et al.*, 1997; Roesijadi *et al.*, 1998). Noch komplexer wird das Zusammenspiel von Zn^{2+} und der Aktivität von Transkriptionsfaktoren, wenn durch Änderung der Redox-Situation, z.B. durch „Nitrosativen Stress“, Zn^{2+} aus den Zinkfingern freigesetzt wird (Kröncke, 2001a). Dies kann sowohl zu einer Hemmung z.B. der IL-2 oder ICAM-1 Genexpression über eine Hemmung der DNS-Bindung von Sp1 (Berendji *et al.*, 1999), aber auch zu einer Aktivierung der Transkription wie z.B. von TNF- α (Wang *et al.*, 1999) führen. Diese entgegengesetzten Wirkungen von NO auf die Transkription lassen sich dadurch erklären, dass TF sowohl als Aktivatoren als auch Repressoren wirken können (Kröncke, 2001b). Durch diese Beispiele wird deutlich, dass die Regulation der Zink-Verteilung und der Zink-Verfügbarkeit einen wichtigen Mechanismus für die Genregulation darstellt. Hierbei spielt das Zinkspeicherprotein MT eine wichtige Schlüsselrolle.

4.3 Die Rolle von NO und Zn^{2+} bei der Genexpression von MT

Der Einfluss der Schwermetalle Zink, Cadmium und Kupfer auf die *de novo* Synthese von Metallothionein wurde bereits eingehend untersucht (Piotrowski & Szymanska, 1976; Hidalgo *et al.*, 1978; Eaton *et al.*, 1980), wobei Yagle *et al.* die Regulation der murinen MT-1 und MT-2 Gene in Hepa1A Zellen untersuchte (Yagle & Palmiter, 1985). Er ermittelte eine maximale Akkumulation von MT-1 und MT-2 mRNS 6 h nach Behandlung mit Zn^{2+} und Cd^{2+} , sowie

4. Diskussion

eine Halbwertszeit der mRNA beider Gene von ca. 2,5 h. In dieser Arbeit zeigte sich bei MAEC eine ähnliche konzentrationsabhängige Induktion von MT-1 und MT-2 durch Zn^{2+} und Cd^{2+} . Cadmiumionen sind deutlich potentere Induktoren von MT als Zn^{2+} , da schon 1/5 der Konzentration genügt, um die gleiche Transkriptionssteigerung zu erreichen.

Die durch Zink verursachte Aktivierung der MT Transkription ist von der Anwesenheit eines sogenannten Metall-responsiven Elementes (MRE) abhängig. Hiervon existieren fünf nicht-identische Kopien am 5'-Ende des MT-1 Gens (Carter *et al.*, 1984; Stuart *et al.*, 1984). Zusätzlich ist die MT Transkription von einem Transkriptionsfaktor (MTF-1) abhängig, der in der Anwesenheit von Zn^{2+} an das MRE bindet (Radtke *et al.*, 1993; Bittel *et al.*, 1998; Larochelle *et al.*, 2001). MTF-1 ist ein 72,5 kDa grosses Protein, welches unter anderem aus 6 Zinkfingern besteht (Radtke *et al.*, 1995). Durch die selektive Deletion einzelner Zinkfinger zeigten sich ihre unterschiedlichen Funktionen (Bittel *et al.*, 2000). Die Zinkfinger 2-4 stellen die wesentliche DNS-Bindungsdomäne dar, wohingegen die Zinkfinger 4-6 *in vitro* nicht für die DNS-Bindung benötigt werden. Dennoch sind auch diese Zinkfinger in der Evolution stark konserviert worden, was auf eine wichtige Funktion schließen lässt (Auf der Maur *et al.*, 1999). Es wird vermutet, dass die Zinkfinger 5 und 6 für Interaktionen zwischen MTF-1 und Koaktivatoren verantwortlich sind. Der Zinkfinger 1 scheint mit seiner niedrigen Zinkbindungsaffinität als Zinksensor zu fungieren, der in Abwesenheit von Zink die konstitutive DNS-Bindungsaktivität der übrigen Zinkfinger maskiert (Muller *et al.*, 1995).

Im Gegensatz zu den MT-1 und MT-2 Genen ist das MTF-1 Gen essentiell, da Mäuse, denen das MTF-1 Gen fehlt, schon um den 14. Gestationstag *in utero* versterben, was auf ein Leberversagen mit generalisierten Ödemen zurückzuführen ist. MTF-1^{-/-} Embryos sind nicht in der Lage, die Gene von MT-1 und MT-2 zu transkribieren, da es keine weiteren Transkriptionsfaktoren gibt, die an die MRE binden können (Heuchel *et al.*, 1994; Palmiter, 1994). MTF-1^{-/-} Mäuse-Embryonen zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber der zytotoxischen Wirkung von Cd^{2+} bzw. H_2O_2 . Zusätzlich zeigte sich eine verminderte Menge von mRNA für die γ -Glutamylcysteinsynthase, einem essentiellen Enzym der Glutathion-Synthese (Gunes *et al.*, 1998). Bisherige Experimente deuten auch darauf hin, dass MTF-1 die Expression der ubiquitären Zink-Exportpumpe ZnT-1 reguliert, da sich im Promotor dieses Transportproteines MTF-1 Bindungsstellen befinden (Palmiter & Findley, 1995). Somit scheint MTF-1 bei der Regulation der Metallhomöostase (Andrews, 2001), des zellulären Redox-Status und besonders bei der Leberentwicklung eine wichtige Rolle zu spielen.

Untersuchungen zur subzellulären Verteilung von MTF-1 zeigten, dass sich bei unbehandelten murinen Hepa Zellen ca. 83% dieses Transkriptionsfaktors im Zytoplasma befinden. Im Gegensatz hierzu wurde jedoch nach Behandlung mit 100 μ M Zn^{2+} eine Translokation von

MTF-1 in den Zellkern und eine spezifische DNA-Bindung beobachtet (Smirnova *et al.*, 2000). MTF-1 besitzt ein nukleäres Lokalisationssignal, welches zum Transport beiträgt, jedoch nicht essentiell ist. Zusätzlich gibt es ein Exportsignal, welches für die zytoplasmatische Lokalisation unter Ruhebedingungen verantwortlich ist. Interessant ist, dass auch Stresssignale wie zum Beispiel Hitzeschock, H_2O_2 oder ein niedriger extrazellulärer pH (pH 6,0) zu einer Umverteilung von MTF-1 in den Nukleus führen. Anders als die Schwermetalle Zink und Cadmium sind diese Stresssignale jedoch nicht in der Lage, eine gesteigerte Transkription zu bewirken (Saydam *et al.*, 2001). Die Funktion der nukleären Translokation von MTF-1 durch nicht Metall-bedingten Stress ist noch unklar. Eine mögliche Erklärung wäre, dass vielleicht andere Zielgene für MTF-1 existieren, die noch nicht identifiziert sind.

Der Signalweg, über den die Zytokine IL-1 β , IFN- γ und TNF- α zu einer Induktion von MT führen ist noch nicht bekannt. Eine Hypothese ist, dass IL-1 β zu einer gesteigerten IL-6 Expression führen könnte, welches dann direkt über den Transkriptionsfaktor STAT die Transkription von MT bewirken könnte (Hernandez *et al.*, 2000). Da MAEC auch in der Lage sind, IL-6 zu produzieren, könnte dies ein möglicher Mechanismus der IL-1 β medierten MT-Induktion sein. Bisher sind keine Transkriptionsfaktoren bekannt, die durch die Zytokine IL-1 β , IFN- γ oder TNF- α aktiviert werden und an responsive Elemente des MT-Promotors binden könnten (Hernandez *et al.*, 2000). Zytokine sind sehr potente Effektoren in vielen physiologischen und pathologischen Situationen. Sie spielen eine essentielle Rolle bei Entzündungsreaktionen, zellulärer Differenzierung sowie Proliferation und Reifung. Jedoch ist die Aktivität der einzelnen Zytokine abhängig vom Typ der jeweiligen Zielzelle (Karin *et al.*, 1985). So kann z.B. IL-1 β wachstumsfördernd, wachstumshemmend oder auch neutral wirken (Kilian *et al.*, 1991). In mehreren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 oder IFN- γ zu einer Erhöhung der MT-Expression führen (De *et al.*, 1990; Schroeder & Cousins, 1990; Kondo *et al.*, 1994; Sciavolino & Vilcek, 1995). Durch die unterschiedliche Induktion von MT in den einzelnen Organen kann es zu einer Umverteilung von Zink im Gewebe kommen.

Ich konzentrierte meine Untersuchungen auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Zytokin-induzierten iNOS-Aktivität und der MT-Genexpression. Hierbei zeigte sich, dass eine Hemmung der durch den Zytokin-Mix induzierten iNOS-Aktivität mittels NIO zu einer deutlich reduzierten MT-1 und MT-2 Expression führte. Auch die Applikation des NO-Donors DETA/NO bewirkte eine konzentrationsabhängige Steigerung der MT-1 und MT-2 Genexpression. Dies zeigt, dass NO die Genexpression von MT-1 und MT-2 induziert.

Die bisherigen Untersuchungen des Einflusses von NO auf die Zn^{2+} -Homöostase legen die Vermutung nahe, dass NO über eine Steigerung der freien intrazellulären Zn^{2+} -Konzentration

4. Diskussion

zu einer Induktion von MT führen könnte. Um dies zu zeigen wurden die MAEC mit DETA/NO in Gegenwart des intrazellulären Zn^{2+} -Chelators TPEN kultiviert. Unter diesen Bedingungen wurde die MT-1 und MT-2 Expression unter den Ausgangswert un behandelter Zellen gesenkt. Dies zeigt, dass die durch NO bedingte Induktion von MT durch Zn^{2+} mediiert wird. Diese Untersuchungen zeigen zum ersten Mal, dass NO, welches endogen durch die iNOS synthetisiert wird, mittels intrazellulären Zn^{2+} -Freisetzung die Expression von Genen regulieren kann.

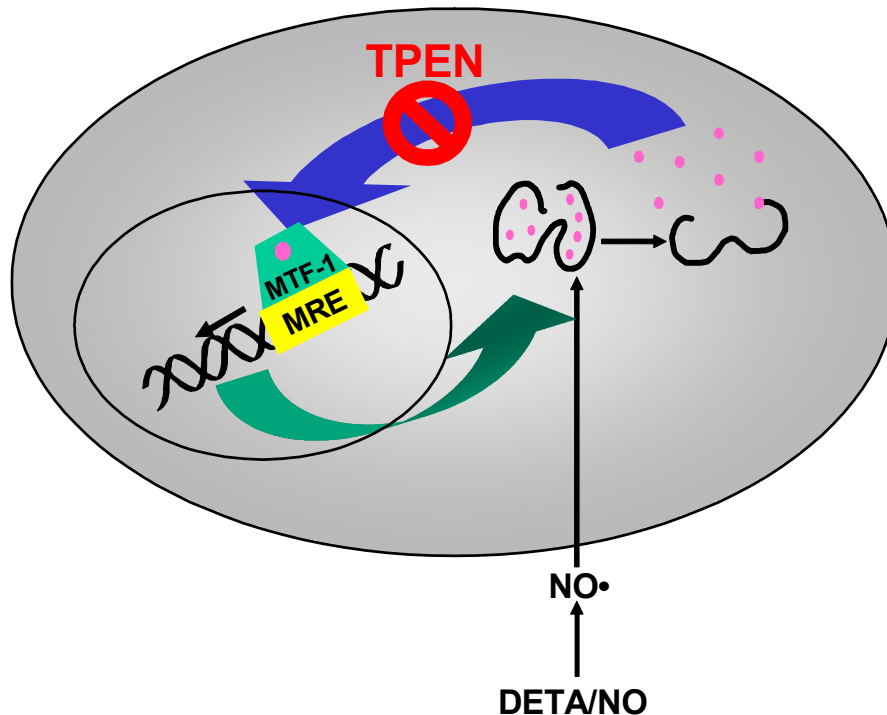


Abb. 18: Superinduktion von MT durch NO

Die Behandlung von MAEC mit dem NO-Donor DETA/NO über 6 h führt zu einer Steigerung der MT-1/-2 Expression. Diese Superinduktion von MT durch nitrosativen Stress wird durch Zn^{2+} -Freisetzung vermittelt. Die durch Nitrosierung von MT freigesetzten Zn^{2+} -Ionen aktivieren den Transkriptionsfaktor MTF-1, der durch Interaktion mit MRE zu einer gesteigerten MT-Transkription führt. Der Zinkchelator TPEN hemmt diese durch NO-bedingte Superinduktion von MT.

Zink könnte ein Signalmolekül sein, dass schon bei geringer Konzentration unterschiedliche biochemische Prozesse koordiniert (Fischer & Davie, 1998). Die Zn^{2+} -Freisetzung aus den Zink-Clustern von MT unter „Nitrosativem Stress“ könnte ein Mechanismus sein um die Konzentration des intrazellulären freien Zn^{2+} zu erhöhen und hierdurch eine Signalwirkung zu erreichen. Die in dieser Arbeit gezeigte Zn^{2+} -abhängige Steigerung der MT Genexpression unter „Nitrosativem Stress“ ist ein Beispiel für die Signalfunktion von NO und freiem Zn^{2+} (siehe Abb. 18). Ähnliche Ergebnisse konnten mit LPS erzielt werden, dass zu einer 2,5-fachen Steigerung der MT-1 mRNA Expression in Ratten-Hepatozyten innerhalb von 6 h

fürte. Diese Steigerung der MT-1 Expression konnte durch eine spezifische Hemmung der NOS und dem NO Scavenger PTIO unterdrückt werden, was die wichtige Rolle von NO bei der LPS-medierte MT-Induktion zeigt (Arizono *et al.*, 1995). In Arbeiten von Yamaoka *et al.* führten Zn^{2+} -Konzentrationen von 10 μ M zu einer Hemmung der iNOS-Induktion durch proinflammatorische Zytokine (Yamaoka *et al.*, 2000). Etwas höhere Zn^{2+} -Konzentrationen sind in der Lage die iNOS Aktivität zu hemmen (Abou-Mohamed *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse zeigen, dass NO mediierte Zn^{2+} -Freisetzung über negative feed-back-Regulation eine weitere iNOS Expression oder sogar die iNOS-abhängige NO Produktion in Entzündungsreaktionen hemmt. Dieses Phänomen könnte zum Teil die antiinflammatorischen Eigenschaften von Zink erklären.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Regulation der intrazellulären Zn^{2+} -Verteilung eine Signalfunktion von NO ist, welches in Entzündungsreaktionen durch die iNOS produziert wird.

5 Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit wurde die Wirkung von in Entzündungsreaktionen in grossen Mengen gebildeten NO auf Endothelien untersucht, wobei ein besonderer Schwerpunkt auf der Untersuchung der intrazellulären Zn^{2+} -Homöostase und dem Zinkspeicherprotein Metallothionein lag.

Die Aktivierung von Wildtyp MAEC mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β , IFN- γ und TNF- α führt zu einer iNOS-Induktion und nachfolgender NO-Synthese. Nach 24 h wird MT in den Zellkern transloziert, wo es zu einer Zn^{2+} -Freisetzung kommt. Sowohl die nukleäre Zn^{2+} -Freisetzung wie auch die MT-Translokation sind von der Gegenwart proinflammatorischer Zytokine als auch von endogen durch die iNOS gebildetem NO abhängig.

Untersuchungen an MT-defizienten MAEC zeigten, dass die nach Aktivierung zu beobachtende Freisetzung von nukleären Zn^{2+} -Ionen von der Anwesenheit des Zinkspeicherproteins Metallothionein abhängig ist. Unter dem Einfluss von NO wird MT S-nitrosiert und setzt Zn^{2+} frei. Metallothionein hat somit nicht nur die Aufgabe, durch Bindung und Abgabe von Zn^{2+} die Zn^{2+} -Homöostase aufrechtzuerhalten, sondern es ermöglicht auch unter dem Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen die gezielte Anreicherung von freien Zn^{2+} im Zellkern.

Die Expression von MT wird durch proinflammatorische Zytokine gesteigert. Die Zytokin-induzierte Steigerung der Genexpression ist ebenfalls von der iNOS-Aktivität abhängig und lässt sich ebenfalls nach alleiniger Behandlung mit dem NO-Donor DETA/NO nachweisen. Die gleichzeitige Behandlung mit DETA/NO und dem Zn^{2+} -Chelator TPEN führt zu keiner gesteigerten MT-Expression. Zn^{2+} mediiert somit die in Entzündungsreaktionen durch NO hervorgerufenen Änderungen der MT-Genregulation.

Proinflammatorische Zytokine können daher über das Zusammenwirken von durch iNOS synthetisiertem NO und der nukleären Translokation von MT zu einer vorübergehenden Steigerung der nukleären Zn^{2+} -Konzentration führen. Am Ende dieses Signalweges kann Zn^{2+} die Genregulation bei Entzündungsreaktionen beeinflussen.

6 Literaturverzeichnis

- Abbasi, A. & Shetty, K. (1999)** [Zinc: pathophysiological effects, deficiency status and effects of supplementation in elderly persons--an overview of the research]. *Z.Gerontol.Geriatr.*, **32 Suppl 1**, I75-I79.
- Abou-Mohamed, G., Papapetropoulos, A., Catravas, J. D. & Caldwell, R. W. (1998)** Zn²⁺ inhibits nitric oxide formation in response to lipopolysaccharides: implication in its anti-inflammatory activity. *Eur.J Pharmacol.*, **341**, 265-272.
- Agren, M. S. (1990)** Studies on zinc in wound healing. *Acta Derm.Venereol.Suppl (Stockh)*, **154**, 1-36.
- Andrews, G. K. (2001)** Cellular zinc sensors: MTF-1 regulation of gene expression. *Biometals*, **14**, 223-237.
- Andrews, G. K. & Geiser, J. (1999)** Expression of the mouse metallothionein-I and -II genes provides a reproductive advantage during maternal dietary zinc deficiency. *J.Nutr.*, **129**, 1643-1648.
- Andrews, G. K., Lee, D. K., Ravindra, R., Lichtlen, P., Sirito, M., Sawadogo, M. & Schaffner, W. (2001)** The transcription factors MTF-1 and USF1 cooperate to regulate mouse metallothionein-I expression in response to the essential metal zinc in visceral endoderm cells during early development. *EMBO J.*, **20**, 1114-1122.
- Apostolova, M. D. & Cherian, M. G. (2000)** Delay of M-phase onset by aphidicolin can retain the nuclear localization of zinc and metallothionein in 3T3-L1 fibroblasts. *J.Cell Physiol*, **183**, 247-253.
- Apostolova, M. D., Ivanova, I. A. & Cherian, M. G. (2000)** Signal transduction pathways, and nuclear translocation of zinc and metallothionein during differentiation of myoblasts. *Biochem.Cell Biol.*, **78**, 27-37.
- Aravindakumar, C. T., Ceulemans, J. & De Ley, M. (1999)** Nitric oxide induces Zn²⁺ release from metallothionein by destroying zinc-sulphur clusters without concomitant formation of S-nitrosothiol. *Biochem.J.*, **344 Pt 1**, 253-258.

- Arizono, K., Kagawa, S., Hamada, H. & Ariyoshi, T. (1995)** Nitric oxide mediated metallothionein induction by lipopolysaccharide. **Res.Commun.Mol.Pathol.Pharmacol.**, **90**, 49-58.
- Auf der Maur, A., Belser, T., Elgar, G., Georgiev, O. & Schaffner, W. (1999)** Characterization of the transcription factor MTF-1 from the Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*) reveals evolutionary conservation of heavy metal stress response. **Biol.Chem.**, **380**, 175-185.
- Beattie, J. H., Wood, A. M., Newman, A. M., Bremner, I., Choo, K. H., Michalska, A. E., Duncan, J. S. & Trayhurn, P. (1998)** Obesity and hyperleptinemia in metallothionein (-I and -II) null mice. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, **95**, 358-363.
- Berendji-Grün, D. (1999)** Zur Wirkung von NO auf Säugetierzellen: molekulare Grundlagen der Immunsuppression.
- Berendji, D., Kolb-Bachofen, V., Meyer, K. L., Grapenthin, O., Weber, H., Wahn, V. & Kröncke, K. D. (1997)** Nitric oxide mediates intracytoplasmic and intranuclear zinc release. **FEBS Lett.**, **405**, 37-41.
- Berendji, D., Kolb-Bachofen, V., Zipfel, P. F., Skerka, C., Carlberg, C. & Kröncke, K. D. (1999)** Zinc finger transcription factors as molecular targets for nitric oxide-mediated immunosuppression: inhibition of IL-2 gene expression in murine lymphocytes. **Mol.Med.**, **5**, 721-730.
- Berg, J. M. & Godwin, H. A. (1997)** Lessons from zinc-binding peptides. **Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.**, **26**, 357-371.
- Beyersmann, D. & Haase, H. (2001)** Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. **Biometals**, **14**, 331-341.
- Bittel, D., Dalton, T., Samson, S. L., Gedamu, L. & Andrews, G. K. (1998)** The DNA binding activity of metal response element-binding transcription factor-1 is activated in vivo and in vitro by zinc, but not by other transition metals. **J.Biol.Chem.**, **273**, 7127-7133.
- Bittel, D. C., Smirnova, I. V. & Andrews, G. K. (2000)** Functional heterogeneity in the zinc fingers of metalloregulatory protein metal response element-binding transcription factor-1. **J.Biol.Chem.**, **275**, 37194-37201.

-
- Bofill, R., Capdevila, M., Cols, N., Atrian, S. & Gonzalez-Duarte, P. (2001)** Zinc(II) is required for the in vivo and in vitro folding of mouse copper metallothionein in two domains. *J.Biol.Inorg.Chem.*, **6**, 405-417.
- Borden, K. L. (2000)** RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J Mol.Biol.*, **295**, 1103-1112.
- Boulanger, Y., Armitage, I. M., Miklossy, K. A. & Winge, D. R. (1982)** ¹¹³Cd NMR study of a metallothionein fragment. Evidence for a two- domain structure. *J.Biol.Chem.*, **257**, 13717-13719.
- Brown, K. H., Peerson, J. M., Rivera, J. & Allen, L. H. (2002)** Effect of supplemental zinc on the growth and serum zinc concentrations of prepubertal children: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am.J.Clin.Nutr.*, **75**, 1062-1071.
- Cai, L., Klein, J. B. & Kang, Y. J. (2000)** Metallothionein inhibits peroxynitrite-induced DNA and lipoprotein damage. *J.Biol.Chem.*, **275**, 38957-38960.
- Cano-Gauci, D. F. & Sarkar, B. (1996)** Reversible zinc exchange between metallothionein and the estrogen receptor zinc finger. *FEBS Lett.*, **386**, 1-4.
- Cao, J. & Cousins, R. J. (2000)** Metallothionein mRNA in monocytes and peripheral blood mononuclear cells and in cells from dried blood spots increases after zinc supplementation of men. *J.Nutr.*, **130**, 2180-2187.
- Carter, A. D., Felber, B. K., Walling, M. J., Jubier, M. F., Schmidt, C. J. & Hamer, D. H. (1984)** Duplicated heavy metal control sequences of the mouse metallothionein-I gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **81**, 7392-7396.
- Caselli, A., Camici, G., Manao, G., Moneti, G., Pazzagli, L., Cappugi, G. & Ramponi, G. (1994)** Nitric oxide causes inactivation of the low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase. *J.Biol.Chem.*, **269**, 24878-24882.
- Chandra, R. K. (2002)** Nutrition and the immune system from birth to old age. *Eur.J.Clin.Nutr.*, **56 Suppl 3**, S73-S76.
- Cherian, M. G. & Apostolova, M. D. (2000)** Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)*, **46**, 347-356.

- Chesters, J. K. & Boyne, R. (1991)** Nature of the Zn²⁺ requirement for DNA synthesis by 3T3 cells. *Exp.Cell Res.*, **192**, 631-634.
- Chesters, J. K., Petrie, L. & Lipson, K. E. (1993)** Two zinc-dependent steps during G1 to S phase transition. *J.Cell Physiol*, **155**, 445-451.
- Chesters, J. K., Petrie, L. & Travis, A. J. (1990)** A requirement for Zn²⁺ for the induction of thymidine kinase but not ornithine decarboxylase in 3T3 cells stimulated from quiescence. *Biochem.J.*, **272**, 525-527.
- Chesters, J. K., Petrie, L. & Vint, H. (1989)** Specificity and timing of the Zn²⁺ requirement for DNA synthesis by 3T3 cells. *Exp.Cell Res.*, **184**, 499-508.
- Coleman, J. E. (1992)** Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annu.Rev.Biochem.*, **61**, 897-946.
- Cooke, J. P. & Tsao, P. S. (1993)** Cytoprotective effects of nitric oxide. *Circulation*, **88**, 2451-2454.
- Cousins, R. J. & Leinart, A. S. (1988)** Tissue-specific regulation of zinc metabolism and metallothionein genes by interleukin 1. *FASEB J.*, **2**, 2884-2890.
- Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C. & Rofe, A. M. (2002)** Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol.Life Sci.*, **59**, 627-647.
- Cross, F., Roberts, J. & Weintraub, H. (1989)** Simple and complex cell cycles. *Annu.Rev.Cell Biol.*, **5**, 341-396.
- De, S. K., McMaster, M. T. & Andrews, G. K. (1990)** Endotoxin induction of murine metallothionein gene expression. *J.Biol.Chem.*, **265**, 15267-15274.
- Dingwall, C. & Laskey, R. A. (1991)** Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem.Sci.*, **16**, 478-481.
- Dorea, J. G. (2002)** Zinc deficiency in nursing infants. *J.Am.Coll.Nutr.*, **21**, 84-87.
- dos Remedios, C. G. & Moens, P. D. (1995)** Fluorescence resonance energy transfer spectroscopy is a reliable "ruler" for measuring structural changes in proteins. Dispelling the problem of the unknown orientation factor. *J.Struct.Biol.*, **115**, 175-185.

-
- Eaton, D. L., Stacey, N. H., Wong, K. L. & Klaassen, C. D. (1980) Dose-response effects of various metal ions on rat liver metallothionein, glutathione, heme oxygenase, and cytochrome P-450. **Toxicol.Appl.Pharmacol.**, **55**, 393-402.
- Endre, L., Beck, F. W. & Prasad, A. S. (1990) The role of zinc in human health. **J.Trace Elem.Exp.Med.**, **3**, 337.
- Evans, T., Carpenter, A. & Cohen, J. (1994) Inducible nitric-oxide-synthase mRNA is transiently expressed and destroyed by a cycloheximide-sensitive process. **Eur.J.Biochem.**, **219**, 563-569.
- Feldman, S. L., Failla, M. L. & Cousins, R. J. (1978) Degradation of rat liver metallothioneins in vitro. **Biochim.Biophys.Acta**, **544**, 638-646.
- Fischer, E. H. & Davie, E. W. (1998) Recent excitement regarding metallothionein. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, **95**, 3333-3334.
- Förstermann, U., Closs, E. I., Pollock, J. S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I. & Kleinert, H. (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension**, **23**, 1121-1131.
- Fraker, P. J. & King, L. E. (2001) A distinct role for apoptosis in the changes in lymphopoiesis and myelopoiesis created by deficiencies in zinc. **FASEB J.**, **15**, 2572-2578.
- Fraker, P. J., King, L. E., Laakko, T. & Vollmer, T. L. (2000) The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. **J.Nutr.**, **130**, 1399S-1406S.
- Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, **288**, 373-376.
- Geller, D. A., Lowenstein, C. J., Shapiro, R. A., Nussler, A. K., Di Silvio, M., Wang, S. C., Nakayama, D. K., Simmons, R. L., Snyder, S. H. & Billiar, T. R. (1993) Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, **90**, 3491-3495.
- Gergel, D. & Cederbaum, A. I. (1996) Inhibition of the catalytic activity of alcohol dehydrogenase by nitric oxide is associated with S nitrosylation and the release of zinc. **Biochemistry**, **35**, 16186-16194.

- Glanville, N., Durnam, D. M. & Palmiter, R. D. (1981)** Structure of mouse metallothionein-I gene and its mRNA. **Nature**, **292**, 267-269.
- Gopalakrishna, R., Chen, Z. H. & Gundimeda, U. (1993)** Nitric oxide and nitric oxide-generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol ester binding. **J.Biol.Chem.**, **268**, 27180-27185.
- Gordon, G. W., Berry, G., Liang, X. H., Levine, B. & Herman, B. (1998)** Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. **Biophys.J.**, **74**, 2702-2713.
- Gow, A. & Ischiropoulos, H. (2002)** NO running on MT: regulation of zinc homeostasis by interaction of nitric oxide with metallothionein. **Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol**, **282**, L183-L184.
- Grahn, B. H., Paterson, P. G., Gottschall-Pass, K. T. & Zhang, Z. (2001)** Zinc and the eye. **J.Am.Coll.Nutr.**, **20**, 106-118.
- Gruetter, C. A., Barry, B. K., McNamara, D. B., Gruetter, D. Y., Kadowitz, P. J. & Ignarro, L. (1979)** Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. **J.Cyclic.Nucleotide.Res.**, **5**, 211-224.
- Gunes, C., Heuchel, R., Georgiev, O., Muller, K. H., Lichtlen, P., Bluthmann, H., Marino, S., Aguzzi, A. & Schaffner, W. (1998)** Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the metal- responsive transcriptional activator MTF-1. **EMBO J.**, **17**, 2846-2854.
- Haase, H. & Beyersmann, D. (1999)** Uptake and intracellular distribution of labile and total Zn(II) in C6 rat glioma cells investigated with fluorescent probes and atomic absorption. **Biometals**, **12**, 247-254.
- Hanada, K., Gange, R. W., Siebert, E. & Hasan, T. (1991)** Protective effects of cadmium chloride against UVB injury in mouse skin and in cultured human cells: a possible role of cadmium-induced metallothionein. **Photodermatol.Photoimmunol.Photomed.**, **8**, 111-115.

-
- Hanada, K., Tamai, K., Sawamura, D., Hashimoto, I. & Muramatsu, T. (1998) Dynamic changes in intracellular location of metallothionein in rat keratinocytes after ultraviolet-B irradiation. *J.Invest Dermatol.*, **110**, 98-100.
- Henry, Y., Lepoivre, M., Drapier, J. C., Ducrocq, C., Boucher, J. L. & Guissani, A. (1993) EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. *FASEB J.*, **7**, 1124-1134.
- Hernandez, J., Carrasco, J., Belloso, E., Giralt, M., Bluethmann, H., Kee, L. D., Andrews, G. K. & Hidalgo, J. (2000) Metallothionein induction by restraint stress: role of glucocorticoids and IL-6. *Cytokine*, **12**, 791-796.
- Hesketh, J. E. (1996) Sorting of messenger RNAs in the cytoplasm: mRNA localization and the cytoskeleton. *Exp.Cell Res.*, **225**, 219-236.
- Heuchel, R., Radtke, F., Georgiev, O., Stark, G., Aguet, M. & Schaffner, W. (1994) The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal- induced metallothionein gene expression. *EMBO J.*, **13**, 2870-2875.
- Hibbs, J. B., Jr., Taintor, R. R. & Vavrin, Z. (1987) Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, **235**, 473-476.
- Hibbs, J. B., Jr., Taintor, R. R., Vavrin, Z. & Rachlin, E. M. (1988) Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **157**, 87-94.
- Hidalgo, H. A., Koppa, V. & Bryan, S. E. (1978) Induction of cadmium-thionein in isolated rat liver cells. *Biochem.J.*, **170**, 219-225.
- Hoffman, R. A., Langrehr, J. M., Wren, S. M., Dull, K. E., Ildstad, S. T., McCarthy, S. A. & Simmons, R. L. (1993) Characterization of the immunosuppressive effects of nitric oxide in graft vs host disease. *J.Immunol.*, **151**, 1508-1518.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. & Chaudhuri, G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **84**, 9265-9269.
- Imbra, R. J. & Karin, M. (1987) Metallothionein gene expression is regulated by serum factors and activators of protein kinase C. *Mol.Cell Biol.*, **7**, 1358-1363.

- Jacob, C., Maret, W. & Vallee, B. L. (1998)** Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, **95**, 3489-3494.
- Kagi, J. H. (1991)** Overview of metallothionein. **Methods Enzymol.**, **205**, 613-626.
- Kagi, J. H. & Kojima, Y. (1987)** Chemistry and biochemistry of metallothionein. **Experientia Suppl**, **52**, 25-61.
- Kagi, J. H. & Schaffer, A. (1988)** Biochemistry of metallothionein. **Biochemistry**, **27**, 8509-8515.
- Karin, M., Imbra, R. J., Heguy, A. & Wong, G. (1985)** Interleukin 1 regulates human metallothionein gene expression. **Mol.Cell Biol.**, **5**, 2866-2869.
- Keefer, L. K., Nims, R. W., Davies, K. M. & Wink, D. A. (1996)** "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. **Methods Enzymol.**, **268**, 281-293.
- Keen, C. & Gershwin, M. (1990)** Zinc deficiency and immune functions. **Annu.Rev.Nutr.**, **10**, 415-431.
- Kelly, E. J., Quaife, C. J., Froelick, G. J. & Palmiter, R. D. (1996)** Metallothionein I and II protect against zinc deficiency and zinc toxicity in mice. **J.Nutr.** , **126**, 1782-1790.
- Kentsis, A., Gordon, R. E. & Borden, K. L. (2002)** Self-assembly properties of a model RING domain. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, **99**, 667-672.
- Kilian, P. L., Kaffka, K. L., Biondi, D. A., Lipman, J. M., Benjamin, W. R., Feldman, D. & Campen, C. A. (1991)** Antiproliferative effect of interleukin-1 on human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3). **Cancer Res.**, **51**, 1823-1828.
- King, J. C. (1990)** Assessment of zinc status. **J.Nutr.**, **120 Suppl 11**, 1474-1479.
- King, J. C., Shames, D. M. & Woodhouse, L. R. (2000)** Zinc homeostasis in humans. **J.Nutr.**, **130**, 1360S-1366S.
- King, L. E., Osati-Ashtiani, F. & Fraker, P. J. (2002)** Apoptosis plays a distinct role in the loss of precursor lymphocytes during zinc deficiency in mice. **J.Nutr.** , **132**, 974-979.
- Klug, A. & Schwabe, J. W. (1995)** Protein motifs 5. Zinc fingers. **FASEB J.**, **9**, 597-604.

-
- Knowles, R. G., Palacios, M., Palmer, R. M. & Moncada, S. (1990)** Kinetic characteristics of nitric oxide synthase from rat brain. *Biochem.J.*, **269**, 207-210.
- Kolb-Bachofen, V., Kröncke, K. D., Fehsel, K., & Suschek, C. V. (2000)** Role of inducible Nitric Oxide Synthase in Autoimmune or Other Immune-Mediated Diseases. *Nitric Oxide*, pp. 811-821. Academic Press.
- Kolb, H. & Kolb-Bachofen, V. (1992)** Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. *Immunol.Today*, **13**, 157-160.
- Kolenko, V. M., Uzzo, R. G., Dulin, N., Hauzman, E., Bukowski, R. & Finke, J. H. (2001)** Mechanism of apoptosis induced by zinc deficiency in peripheral blood T lymphocytes. *Apoptosis.*, **6**, 419-429.
- Kondo, Y., Kuo, S. M. & Lazo, J. S. (1994)** Interleukin-1 beta-mediated metallothionein induction and cytoprotection against cadmium and cis-diamminedichloroplatinum. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **270**, 1313-1318.
- Kröncke, K. D. (1998)** Über die Rolle von Stickstoffmonoxid bei der Entstehung des Typ 1 Diabetes.
- Kröncke, K. D. (2001a)** Cysteine-Zn²⁺ complexes: unique molecular switches for inducible nitric oxide synthase-derived NO. *FASEB J.*, **15**, 2503-2507.
- Kröncke, K. D. (2001b)** Zinc finger proteins as molecular targets for nitric oxide-mediated gene regulation. *Antioxid.Redox.Signal.*, **3**, 565-575.
- Kröncke, K. D. & Carlberg, C. (2000)** Inactivation of zinc finger transcription factors provides a mechanism for a gene regulatory role of nitric oxide. *FASEB J.*, **14**, 166-173.
- Kröncke, K. D., Fehsel, K. & Kolb-Bachofen, V. (1995)** Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol.Chem.Hoppe Seyler*, **376**, 327-343.
- Kröncke, K. D., Fehsel, K. & Kolb-Bachofen, V. (1998)** Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin.Exp.Immunol.*, **113**, 147-156.
- Kröncke, K. D., Fehsel, K., Schmidt, T., Zenke, F. T., Dasting, I., Wesener, J. R., Bettermann, H., Breunig, K. D. & Kolb-Bachofen, V. (1994)** Nitric oxide destroys

zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9. **Biochem.Biophys.Res.Commun.**, **200**, 1105-1110.

Kröncke, K. D., Klotz, L. O., Suschek, C. V. & Sies, H. (2002) Comparing nitrosative versus oxidative stress toward zinc finger- dependent transcription. Unique role for NO. **J.Biol.Chem.**, **277**, 13294-13301.

Kröncke, K. D., Suschek, C. V. & Kolb-Bachofen, V. (2000) Implications of inducible nitric oxide synthase expression and enzyme activity. **Antioxid.Redox.Signal.**, **2**, 585-605.

Kubes, P., Suzuki, M. & Granger, D. N. (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, **88**, 4651-4655.

Kunz, D., Walker, G., Eberhardt, W. & Pfeilschifter, J. (1996) Molecular mechanisms of dexamethasone inhibition of nitric oxide synthase expression in interleukin 1 beta-stimulated mesangial cells: evidence for the involvement of transcriptional and posttranscriptional regulation. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, **93**, 255-259.

Kupka, R. & Fawzi, W. (2002) Zinc nutrition and HIV infection. **Nutr.Rev.**, **60**, 69-79.

Kury, S., Devilder, M. C., Avet-Loiseau, H., Dreno, B. & Moisan, J. P. (2001) Expression pattern, genomic structure and evaluation of the human SLC30A4 gene as a candidate for acrodermatitis enteropathica. **Hum.Genet.**, **109**, 178-185.

Kury, S., Dreno, B., Bezieau, S., Giraudet, S., Kharfi, M., Kamoun, R. & Moisan, J. P. (2002) Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica. **Nat.Genet.**, **31**, 239-240.

Lamond, A. I. & Earnshaw, W. C. (1998) Structure and function in the nucleus. **Science**, **280**, 547-553.

Larochelle, O., Stewart, G., Moffatt, P., Tremblay, V. & Seguin, C. (2001) Characterization of the mouse metal-regulatory-element-binding proteins, metal element protein-1 and metal regulatory transcription factor-1. **Biochem.J.**, **353**, 591-601.

-
- Lastra, M. D., Pastelin, R., Camacho, A., Monroy, B. & Aguilar, A. E. (2001)** Zinc intervention on macrophages and lymphocytes response. **J.Trace Elem.Med.Biol.**, **15**, 5-10.
- Laurent, M., Lepoivre, M. & Tenu, J. P. (1996)** Kinetic modelling of the nitric oxide gradient generated in vitro by adherent cells expressing inducible nitric oxide synthase. **Biochem.J.**, **314** (Pt 1), 109-113.
- Laval, F. & Wink, D. A. (1994)** Inhibition by nitric oxide of the repair protein, O6-methylguanine-DNA- methyltransferase. **Carcinogenesis**, **15**, 443-447.
- Levadoux-Martin, M., Hesketh, J. E., Beattie, J. H. & Wallace, H. M. (2001)** Influence of metallothionein-1 localization on its function. **Biochem.J.**, **355**, 473-479.
- Levadoux, M., Mahon, C., Beattie, J. H., Wallace, H. M. & Hesketh, J. E. (1999)** Nuclear import of metallothionein requires its mRNA to be associated with the perinuclear cytoskeleton. **J.Biol.Chem.**, **274**, 34961-34966.
- Liu, S., Kawai, K., Tyurin, V. A., Tyurina, Y. Y., Borisenko, G. G., Fabisiak, J. P., Quinn, P. J., Pitt, B. R. & Kagan, V. E. (2001)** Nitric oxide-dependent pro-oxidant and pro-apoptotic effect of metallothioneins in HL-60 cells challenged with cupric nitritotriacetate. **Biochem.J.**, **354**, 397-406.
- Lohrer, H. & Robson, T. (1989)** Overexpression of metallothionein in CHO cells and its effect on cell killing by ionizing radiation and alkylating agents. **Carcinogenesis**, **10**, 2279-2284.
- Loscalzo, J. & Welch, G. (1995)** Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. **Prog.Cardiovasc.Dis.**, **38**, 87-104.
- Lowenstein, C. J., Dinerman, J. L. & Snyder, S. H. (1994)** Nitric oxide: a physiologic messenger. **Ann.Intern.Med.**, **120**, 227-237.
- MacDonald, R. S. (2000)** The role of zinc in growth and cell proliferation. **J.Nutr.**, **130**, 1500S-1508S.
- Mahmoodi, M. R. & Kimiagar, S. M. (2001)** Prevalence of zinc deficiency in junior high school students of Tehran City. **Biol.Trace Elem.Res.**, **81**, 93-103.

- Mahon, P., Partridge, K., Beattie, J. H., Glover, L. A. & Hesketh, J. E. (1997)** The 3' untranslated region plays a role in the targeting of metallothionein-I mRNA to the perinuclear cytoplasm and cytoskeletal-bound polysomes. **Biochim.Biophys.Acta**, **1358**, 153-162.
- Maret, W., Jacob, C., Vallee, B. L. & Fischer, E. H. (1999)** Inhibitory sites in enzymes: zinc removal and reactivation by thionein. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, **96**, 1936-1940.
- Maret, W., Larsen, K. S. & Vallee, B. L. (1997)** Coordination dynamics of biological zinc "clusters" in metallothioneins and in the DNA-binding domain of the transcription factor Gal4. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, **94**, 2233-2237.
- Maret, W. & Vallee, B. L. (1998)** Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, **95**, 3478-3482.
- Margoshes M. & Vallee, B. L. (1957)** **J.Am.Chem.Soc.**, **79**, 4813.
- Marletta, M. A., Hurshman, A. R. & Rusche, K. M. (1998)** Catalysis by nitric oxide synthase. **Curr.Opin.Chem.Biol.**, **2**, 656-663.
- Marshall, H. E., Merchant, K. & Stamler, J. S. (2000)** Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. **FASEB J.**, **14**, 1889-1900.
- Masters, B. A., Kelly, E. J., Quaife, C. J., Brinster, R. L. & Palmiter, R. D. (1994)** Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, **91**, 584-588.
- McCall, T. B., Feelisch, M., Palmer, R. M. & Moncada, S. (1991)** Identification of N-iminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phagocytic cells. **Br.J.Pharmacol.**, **102**, 234-238.
- McCormick, C. C., Menard, M. P. & Cousins, R. J. (1981)** Induction of hepatic metallothionein by feeding zinc to rats of depleted zinc status. **Am.J.Physiol**, **240**, E414-E421.
- Michalska, A. E. & Choo, K. H. (1993)** Targeting and germ-line transmission of a null mutation at the metallothionein I and II loci in mouse. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, **90**, 8088-8092.

-
- Misra, R. R., Hochadel, J. F., Smith, G. T., Cook, J. C., Waalkes, M. P. & Wink, D. A. (1996) Evidence that nitric oxide enhances cadmium toxicity by displacing the metal from metallothionein. **Chem.Res.Toxicol.**, **9**, 326-332.
- Moffatt, P. & DenizEAU, F. (1997) Metallothionein in physiological and physiopathological processes. **Drug Metab Rev.**, **29**, 261-307.
- Montoliu, C., Monfort, P., Carrasco, J., Palacios, O., Capdevila, M., Hidalgo, J. & Felipo, V. (2000) Metallothionein-III prevents glutamate and nitric oxide neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons. **J Neurochem.**, **75**, 266-273.
- Mori, T., Tani, T., Hanasawa, K. & Kodama, M. (2001) Effects of zinc deficiency and corticosterone elevation on bone marrow in rats. **Eur.Surg.Res.**, **33**, 92-98.
- Muller, H. P., Brungnera, E., Georgiev, O., Badzong, M., Muller, K. H. & Schaffner, W. (1995) Analysis of the heavy metal-responsive transcription factor MTF-1 from human and mouse. **Somat.Cell Mol.Genet.**, **21**, 289-297.
- Murray, A. W. (1992) Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. **Nature**, **359**, 599-604.
- Nagel, W. W. & Vallee, B. L. (1995) Cell cycle regulation of metallothionein in human colonic cancer cells. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, **92**, 579-583.
- Nasir, M. S., Fahrni, C. J., Suhy, D. A., Kolodsick, K. J., Singer, C. P. & O'Halloran, T. V. (1999) The chemical cell biology of zinc: structure and intracellular fluorescence of a zinc-quinolinesulfonamide complex. **J.Biol.Inorg.Chem.**, **4**, 775-783.
- Nathan, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J.**, **6**, 3051-3064.
- Ogra, Y. & Suzuki, K. T. (2000) Nuclear trafficking of metallothionein: possible mechanisms and current knowledge. **Cell Mol.Biol.**, **46**, 357-365.
- Ohtake, H., Hasegawa, K. & Koga, M. (1978) Zinc-binding protein in the livers of neonatal, normal and partially hepatectomized rats. **Biochem.J**, **174**, 999-1005.
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G. & Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, **327**, 524-526.

- Palmiter, R. D. (1994)** Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, **91**, 1219-1223.
- Palmiter, R. D. (1998)** The elusive function of metallothioneins. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, **95**, 8428-8430.
- Palmiter, R. D. & Findley, S. D. (1995)** Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. **EMBO J.**, **14**, 639-649.
- Palmiter, R. D., Sandgren, E. P., Koeller, D. M. & Brinster, R. L. (1993)** Distal regulatory elements from the mouse metallothionein locus stimulate gene expression in transgenic mice. **Mol.Cell Biol.**, **13**, 5266-5275.
- Panemangalore, M., Banerjee, D., Onosaka, S. & Cherian, M. G. (1983)** Changes in the intracellular accumulation and distribution of metallothionein in rat liver and kidney during postnatal development. **Dev.Biol.**, **97**, 95-102.
- Parat, M. O., Richard, M. J., Meplan, C., Favier, A. & Beani, J. C. (1999)** Impairment of cultured cell proliferation and metallothionein expression by metal chelator NNN'N'-tetrakis-(2-pyridylmethyl)ethylene diamine. **Biol.Trace Elem.Res.**, **70**, 51-68.
- Parat, M. O., Richard, M. J., Pollet, S., Hadjur, C., Favier, A. & Beani, J. C. (1997)** Zinc and DNA fragmentation in keratinocyte apoptosis: its inhibitory effect in UVB irradiated cells. **J.Photochem.Photobiol.B**, **37**, 101-106.
- Pardee, A. B. (1989)** G1 events and regulation of cell proliferation. **Science**, **246**, 603-608.
- Paski S.C., X. Z. (2001)** Labile intracellular zinc is associated with 3T3 cell growth. **J.Nutr.Biochem.**, **12**, 655-661.
- Pearce, L. L., Gandley, R. E., Han, W., Wasserloos, K., Stitt, M., Kanai, A. J., McLaughlin, M. K., Pitt, B. R. & Levitan, E. S. (2000a)** Role of metallothionein in nitric oxide signaling as revealed by a green fluorescent fusion protein. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, **97**, 477-482.
- Pearce, L. L., Wasserloos, K., St Croix, C. M., Gandley, R., Levitan, E. S. & Pitt, B. R. (2000b)** Metallothionein, nitric oxide and zinc homeostasis in vascular endothelial cells. **J.Nutr.**, **130**, 1467S-1470S.

-
- Peng, H. B., Spiecker, M. & Liao, J. K. (1998)** Inducible nitric oxide: an autoregulatory feedback inhibitor of vascular inflammation. **J.Immunol.**, **161**, 1970-1976.
- Pfeilschifter, J., Eberhardt, W., Hummel, R., Kunz, D., Muhl, H., Nitsch, D., Pluss, C. & Walker, G. (1996)** Therapeutic strategies for the inhibition of inducible nitric oxide synthase--potential for a novel class of anti-inflammatory agents. **Cell Biol.Int.**, **20**, 51-58.
- Piotrowski, J. K. & Szymanska, J. A. (1976)** Influence of certain metals on the level of metallothionein-like proteins in the liver and kidneys of rats. **J.Toxicol.EnvIRON.Health**, **1**, 991-1002.
- Powell, S. R. (2000)** The antioxidant properties of zinc. **J.Nutr.**, **130**, 1447S-1454S.
- Prasad, A. S. (2002)** Zinc deficiency in patients with sickle cell disease. **Am.J.Clin.Nutr.**, **75**, 181-182.
- Radja, N. & Charles-Holmes, R. (2002)** Acrodermatitis enteropathica - lifelong follow-up and zinc monitoring. **Clin.Exp.Dermatol.**, **27**, 62-63.
- Radtke, F., Georgiev, O., Muller, H. P., Brugnera, E. & Schaffner, W. (1995)** Functional domains of the heavy metal-responsive transcription regulator MTF-1. **Nucleic Acids Res.**, **23**, 2277-2286.
- Radtke, F., Heuchel, R., Georgiev, O., Hergersberg, M., Gariglio, M., Dembic, Z. & Schaffner, W. (1993)** Cloned transcription factor MTF-1 activates the mouse metallothionein I promoter. **EMBO J.**, **12**, 1355-1362.
- Rees, D. D., Palmer, R. M., Schulz, R., Hodson, H. F. & Moncada, S. (1990)** Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **Br.J.Pharmacol.**, **101**, 746-752.
- Richards, M. P. (1989)** Recent developments in trace element metabolism and function: role of metallothionein in copper and zinc metabolism. **J.Nutr.**, **119**, 1062-1070.
- Richards, M. P. & Cousins, R. J. (1975)** Mammalian zinc homeostasis: requirement for RNA and metallothionein synthesis. **Biochem.Biophys.Res.Comm.**, **64**, 1215-1223.

- Richards, R. I., Heguy, A. & Karin, M. (1984)** Structural and functional analysis of the human metallothionein-IA gene: differential induction by metal ions and glucocorticoids. *Cell*, **37**, 263-272.
- Riek, R., Precheur, B., Wang, Y., Mackay, E. A., Wider, G., Guntert, P., Liu, A., Kagi, J. H. & Wuthrich, K. (1999)** NMR structure of the sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) metallothionein MTA. *J.Mol.Biol.*, **291**, 417-428.
- Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A. & Dingwall, C. (1991)** Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*, **64**, 615-623.
- Roesijadi, G., Bogumil, R., Vasak, M. & Kagi, J. H. (1998)** Modulation of DNA binding of a tramtrack zinc finger peptide by the metallothionein-thionein conjugate pair. *J.Biol.Chem.*, **273**, 17425-17432.
- Roth, H. P. & Kirchgessner, M. (1999)** [Diagnosis of zinc deficiency]. *Z.Gerontol.Geriatr.*, **32 Suppl 1**, I55-I63.
- Salgueiro, M. J., Zubillaga, M. B., Lysionek, A. E., Caro, R. A., Weill, R. & Boccio, J. R. (2002)** The role of zinc in the growth and development of children. *Nutrition*, **18**, 510-519.
- Salvemini, D., Settle, S. L., Masferrer, J. L., Seibert, K., Currie, M. G. & Needleman, P. (1995)** Regulation of prostaglandin production by nitric oxide; an in vivo analysis. *Br.J.Pharmacol.*, **114**, 1171-1178.
- Saydam, N., Georgiev, O., Nakano, M. Y., Greber, U. F. & Schaffner, W. (2001)** Nucleo-cytoplasmic trafficking of metal-responsive transcription factor MTF-1 is regulated by diverse stress signals. *J.Biol.Chem.*
- Sazawal, S., Black, R. E., Menon, V. P., Dinghra, P., Caulfield, L. E., Dhingra, U. & Bagati, A. (2001)** Zinc supplementation in infants born small for gestational age reduces mortality: a prospective, randomized, controlled trial. *Pediatrics*, **108**, 1280-1286.
- Schmidt, C. & Beyersmann, D. (1999)** Transient peaks in zinc and metallothionein levels during differentiation of 3T3L1 cells. *Arch.Biochem.Biophys.*, **364**, 91-98.

-
- Schmidt, H. H., Walter, U. & Kochsiek, K. (1997)** [Formation and effects of nitrogen monoxide (NO) in the vascular system]. **Internist (Berl)**, **38**, 406-410.
- Schroeder, J. J. & Cousins, R. J. (1990)** Interleukin 6 regulates metallothionein gene expression and zinc metabolism in hepatocyte monolayer cultures. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, **87**, 3137-3141.
- Schwarz, M. A., Lazo, J. S., Yalowich, J. C., Allen, W. P., Whitmore, M., Bergonia, H. A., Tzeng, E., Billiar, T. R., Robbins, P. D., Lancaster, J. R., Jr. & . (1995)** Metallothionein protects against the cytotoxic and DNA-damaging effects of nitric oxide. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, **92**, 4452-4456.
- Schwarz, M. A., Lazo, J. S., Yalowich, J. C., Reynolds, I., Kagan, V. E., Tyurin, V., Kim, Y. M., Watkins, S. C. & Pitt, B. R. (1994)** Cytoplasmic metallothionein overexpression protects NIH 3T3 cells from tert-butyl hydroperoxide toxicity. **J.Biol.Chem.**, **269**, 15238-15243.
- Sciavolino, P. J. & Vilcek, J. (1995)** Regulation of metallothionein gene expression by TNF-alpha and IFN-beta in human fibroblasts. **Cytokine**, **7**, 242-250.
- Sehgal, V. N. & Jain, S. (2000)** Acrodermatitis enteropathica. **Clin.Dermatol.**, **18**, 745-748.
- Skerka, C., Decker, E. L. & Zipfel, P. F. (1995)** A regulatory element in the human interleukin 2 gene promoter is a binding site for the zinc finger proteins Sp1 and EGR-1. **J.Biol.Chem.**, **270**, 22500-22506.
- Smirnova, I. V., Bittel, D. C., Ravindra, R., Jiang, H. & Andrews, G. K. (2000)** Zinc and cadmium can promote rapid nuclear translocation of metal response element-binding transcription factor-1. **J.Biol.Chem.**, **275**, 9377-9384.
- St Croix, C. M., Wasserloos, K. J., Dineley, K. E., Reynolds, I. J., Levitan, E. S. & Pitt, B. R. (2002)** Nitric oxide-induced changes in intracellular zinc homeostasis are mediated by metallothionein/thionein. **Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol** , **282**, L185-L192.
- Stuart, G. W., Searle, P. F., Chen, H. Y., Brinster, R. L. & Palmiter, R. D. (1984)** A 12-base-pair DNA motif that is repeated several times in metallothionein gene promoters confers metal regulation to a heterologous gene. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, **81**, 7318-7322.

- Stuehr, D. J., Kwon, N. S. & Nathan, C. F. (1990)** FAD and GSH participate in macrophage synthesis of nitric oxide. **Biochem.Biophys.Res.Commun.**, **168**, 558-565.
- Stuehr, D. J. & Nathan, C. F. (1989)** Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **J.Exp.Med.**, **169**, 1543-1555.
- Suhy, D. A., Simon, K. D., Linzer, D. I. & O'Halloran, T. V. (1999)** Metallothionein is part of a zinc-scavenging mechanism for cell survival under conditions of extreme zinc deprivation. **J.Biol.Chem.**, **274**, 9183-9192.
- Sullivan, V. K., Burnett, F. R. & Cousins, R. J. (1998)** Metallothionein expression is increased in monocytes and erythrocytes of young men during zinc supplementation. **J.Nutr.**, **128**, 707-713.
- Suschk, C., Rothe, H., Fehsel, K., Enczmann, J. & Kolb-Bachofen, V. (1993)** Induction of a macrophage-like nitric oxide synthase in cultured rat aortic endothelial cells. IL-1 beta-mediated induction regulated by tumor necrosis factor-alpha and IFN-gamma. **J.Immunol.**, **151**, 3283-3291.
- Takeda, A., Takefuta, S., Okada, S. & Oku, N. (2000)** Relationship between brain zinc and transient learning impairment of adult rats fed zinc-deficient diet. **Brain Res.**, **859**, 352-357.
- Tanaka, M. (2002)** Secretory function of the salivary gland in patients with taste disorders or xerostomia: correlation with zinc deficiency. **Acta Otolaryngol.Suppl**, 134-141.
- Tsujikawa, K., Imai, T., Kakutani, M., Kayamori, Y., Mimura, T., Otaki, N., Kimura, M., Fukuyama, R. & Shimizu, N. (1991)** Localization of metallothionein in nuclei of growing primary cultured adult rat hepatocytes. **FEBS Lett.**, **283**, 239-242.
- Tsujikawa, K., Suzuki, N., Sagawa, K., Itoh, M., Sugiyama, T., Kohama, Y., Otaki, N., Kimura, M. & Mimura, T. (1994)** Induction and subcellular localization of metallothionein in regenerating rat liver. **Eur.J.Cell Biol.**, **63**, 240-246.
- Ugarte, M. & Osborne, N. N. (2001)** Zinc in the retina. **Prog.Neurobiol.**, **64**, 219-249.
- Umesono, K. & Evans, R. M. (1989)** Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. **Cell**, **57**, 1139-1146.

-
- Van Wouwe, J. P. (1995)** Clinical and laboratory assessment of zinc deficiency in Dutch children. A review. **Biol.Trace Elem.Res.**, **49**, 211-225.
- Vasak, M. & Hasler, D. W. (2000)** Metallothioneins: new functional and structural insights. **Curr.Opin.Chem.Biol.**, **4**, 177-183.
- Wang, K., Zhou, B., Kuo, Y. M., Zemansky, J. & Gitschier, J. (2002)** A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. **Am.J.Hum.Genet.**, **71**, 66-73.
- Wang, S., Wang, W., Wesley, R. A. & Danner, R. L. (1999)** A Sp1 binding site of the tumor necrosis factor alpha promoter functions as a nitric oxide response element. **J.Biol.Chem.**, **274**, 33190-33193.
- Willi A. & Hunziker, P.E. (1999)** Characterization of isometallothioneins in Chang cells and the transient accumulation of metallothionein and glutathione during cell proliferation. *Metallothionein IV*, pp. 117-123. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Winge, D. R. & Miklossy, K. A. (1982)** Domain nature of metallothionein. **J.Biol.Chem.**, **257**, 3471-3476.
- Wink, D. A. & Mitchell, J. B. (1998)** Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radic.Biol.Med.**, **25**, 434-456.
- Wink, D. A., Nims, R. W., Darbyshire, J. F., Christodoulou, D., Hanbauer, I., Cox, G. W., Laval, F., Laval, J., Cook, J. A., Krishna, M. C. & . (1994)** Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O₂ reaction. **Chem.Res.Toxicol.**, **7**, 519-525.
- Woo, E. S., Dellapiazza, D., Wang, A. S. & Lazo, J. S. (2000)** Energy-dependent nuclear binding dictates metallothionein localization. **J.Cell Physiol**, **182**, 69-76.
- Woo, E. S. & Lazo, J. S. (1997)** Nucleocytoplasmic functionality of metallothionein. **Cancer Res.**, **57**, 4236-4241.

- Woo, E. S., Monks, A., Watkins, S. C., Wang, A. S. & Lazo, J. S. (1997)** Diversity of metallothionein content and subcellular localization in the National Cancer Institute tumor panel. **Cancer Chemother.Pharmacol.**, **41** , 61-68.
- Wood, K. S., Buga, G. M., Byrns, R. E. & Ignarro, L. J. (1990)** Vascular smooth muscle-derived relaxing factor (MDRF) and its close similarity to nitric oxide. **Biochem.Biophys.Res.Comm.**, **170**, 80-88.
- Wu, F. Y., Huang, W. J., Sinclair, R. B. & Powers, L. (1992)** The structure of the zinc sites of Escherichia coli DNA-dependent RNA polymerase. **J.Biol.Chem.**, **267**, 25560-25567.
- Wu, F. Y. & Wu, C. W. (1987)** Zinc in DNA replication and transcription. **Annu.Rev.Nutr.**, **7**, 251-272.
- Yagle, M. K. & Palmiter, R. D. (1985)** Coordinate regulation of mouse metallothionein I and II genes by heavy metals and glucocorticoids. **Mol.Cell Biol.**, **5**, 291-294.
- Yamaoka, J., Kume, T., Akaike, A. & Miyachi, Y. (2000)** Suppressive effect of zinc ion on iNOS expression induced by interferon- gamma or tumor necrosis factor-alpha in murine keratinocytes. **J.Dermatol.Sci.**, **23**, 27-35.
- Zalewski, P. D., Forbes, I. J. & Betts, W. H. (1993)** Correlation of apoptosis with change in intracellular labile Zn(II) using zinquin [(2-methyl-8-p-toluenesulphonamido-6-quinolyloxy)acetic acid], a new specific fluorescent probe for Zn(II). **Biochem.J.**, **296** (Pt 2), 403-408.
- Zamora, R., Vodovotz, Y. & Billiar, T. R. (2000)** Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. **Mol.Med.**, **6**, 347-373.
- Zangger, K., Oz, G., Haslinger, E., Kunert, O. & Armitage, I. M. (2001)** Nitric oxide selectively releases metals from the amino-terminal domain of metallothioneins: potential role at inflammatory sites. **FASEB J.**, **15**, 1303-1305.
- Zemel, B. S., Kawchak, D. A., Fung, E. B., Ohene-Frempong, K. & Stallings, V. A. (2002)** Effect of zinc supplementation on growth and body composition in children with sickle cell disease. **Am.J.Clin.Nutr.**, **75**, 300-307.

7 Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. V. Kolb-Bachofen sehr herzlich für die Überlassung des Themas, für zahlreiche wertvolle Ratschläge und konstruktive Kritik. Bei ihr fand ich immer ein offenes Ohr und eine Tasse Cafe.

Herrn PD Dr. K.-D. Kröncke danke ich für die hervorragende fachliche Betreuung bei der experimentellen Arbeit sowie für die Hilfe beim Schreiben dieser Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter, die durch ihre unermüdliche Förderung und Unterstützung erst das Erstellen dieser Arbeit ermöglichte und leider die Fertigstellung nicht mehr miterleben konnte. Weiterhin danke ich meinem Vater und Bruder für den liebenden familiären Rückhalt während des gesamten Studiums.

8 Lebenslauf

- **Persönliche Daten**

Name: Daniela Ursula Spahl
Geburtsdatum/-ort: 04.07.1978 in Düsseldorf
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Eltern: Rainer Spahl, Ursula Ege-Spahl

- **Schulausbildung**

1984-1988 Gemeinschaftsgrundschule Vennhauser Allee in Düsseldorf
1988-1997 St. Ursula Gymnasium in Düsseldorf, Abschluss: Abitur

- **Studium**

10/1997-06/2003 Studium der Humanmedizin
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
08/1999 Physikum
08/2000 1. Staatsexamen
08/2002 2. Staatsexamen
1. Terial Innere Medizin, Notfallzentrum des Inselspitals, Bern
2. Terial Chirurgie, Baylor College of Medicine, Houston, Tx

06/2003-10/2003 Studium der Humanmedizin
Rheinische-Friedrich-Wilhelm-Universität zu Bonn
3. Terial Anästhesie, Universitätsklinik, Bonn
20.10.2003 3. Staatsexamen

- **Wissenschaftliche Arbeit**

10/2000-05/2001 Erstellen der Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe
Immunbiologie unter Prof. Dr. V. Kolb-Bachofen
05.10.2001 Vortrag auf dem „7. NO-Forum“ in Magdeburg

Spahl, D. U., Berendji-Grün, D., Suschek, C. V., Kolb-Bachofen, V. & Kröncke, K. D. (2003) Regulation of zinc homeostasis by inducible NO synthase-derived NO: nuclear metallothionein translocation and intranuclear Zn²⁺ release. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, **100**, 13952-13957.

Seit Januar 2004 arbeite ich als Ärztin im Praktikum in der Klinik und Poliklinik für Anästhesie und spezielle Intensivmedizin der Rheinischen-Friedrich-Wilhelm-Universität zu Bonn.