# Untersuchungen zur intrazellulären Zinkhomöostase: Effekt von nitrosativem Stress und Hitze-Schock

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Yasemin Ince

aus Altena

Dezember 2007

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Dietrich Kröncke
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Frank Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.2008

Anne ve Babama

**Teile dieser Arbeit wurden publiziert in**

Cronauer MV, **Ince Y**, Engers R, Rinnab L, Weidemann W, Suschek CV, Burchardt M, Kleinert H, Wiedenmann J, Sies H, Ackermann R, Kröncke KD.
Nitric oxide-mediated inhibition of androgen receptor activity: possible implications for prostate cancer progression. Oncogene. 2007 Mar 22;26(13):1875-84.

# Inhalt


**1. Einleitung** 1

1.1 Stickstoffmonoxid 1

1.2 Nitrosativer Stress 2

1.3 Zink 4

1.4 Das Zelluläre Reparatursystem Thioredoxin-Reduktase/Thioredoxin 6

1.5 Hitze-Schock 8

1.6 Fragestellung 10

**2. Material und Methoden** 11

2.1 Versuchsmaterialien 11

2.2 Verbrauchsmaterialien 12

2.3 Zelllinien 13

2.4 Isolation von Humanen Dermalen Fibroblasten (HDF) aus Biopsien 13

2.5 Kultivierung der Zellen 13

2.6 Mykoplasem Test 14

2.7 Herstellung von Gesamtproteinextrakten 15

2.8 Herstellung von Kernextrakten 15

2.9 Messung der Proteinkonzentration 16

2.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 16

2.11 Western Blot der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran 17

2.12 Antikörper-Inkubation der Nitrozellulosemembran 17

2.13 Immunzytochemie 18

2.14 Immunhistochemie 19

2.15 Quantifizierung des Zelltodes durch Apoptose 20

2.16 Nachweis von intrazellulären $Zn^{2+}$ Ionen 21

2.17 Hitze-Schock-Methode 21

2.18 Thioredoxin-Reduktase-Assay 22

2.19 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 23

2.20 Atomabsorptionsspektrometrie 24

2.21 Statistische Auswertung 25

**3. Ergebnisse** 26

3.1 iNOS- und Nitrotyrosin-Nachweis in Prostata-Krebs-Biopsien 26

3.2 Wirkungen von nitrosativem Stress auf Prostatakarzinom-Zellen 27

3.3 Hemmung der DNA-Bindungsaktivitäts des Androgen-Rezeptors durch nitrosativer Stress 28

3.4 Wirkung von nitrosativem Stress auf die Intrazelluläre Zinkhomöostase 30

3.5 Wirkung von nitrosativem Stress auf die Lokalisation von Thioredoxin 33

3.6 Wirkungen von Nitrosativem-Stress auf die Proteinexpression von reduzierten Thioredoxin 35

3.7 Wirkungen von nitrosativem Stress auf die Lokalisation der Thioredoxin-Reduktase 38

3.8 Thioredoxin-Reduktase-Aktivität 39

3.9 Thioredoxin-Reduktase-Aktivität nach nitrosativem Stress 41

3.10 Wirkungen von Auranofin auf die Protein-expression von reduzierten Thioredoxin nach nitrosativem Stress 42

3.11 Auranofin-Wirkung auf die Reversibilität der Zinkfreisetzung nach nitrosativem Stress 43

3.12 Hitze-Schock 46

3.13 Hitze-Schock und intrazelluläre Zinkfreisetzung 46

3.14 Lokalisation von reduzierten Thioredoxin nach Hitze-Schock-Behandlung 48

3.15 Proteinexpression von reduzierten Thioredoxin nach Hitze-Schock-Behandlung 49

3.16 Wirkung eines Hitze-Schocks auf die Thioredoxin-Reduktase-Lokalisation 52

3.17 Wirkung eines Hitze-Schocks auf die Thioredoxin-Reduktase Aktivität 53

3.18 Wirkung von Auranofin auf die Proteinexpression von reduzierten Thioredoxin nach Hitze-Schock 55

3.19 Wirkung von Auranofin auf die Reversibilität der Zinkfreisetzung nach Hitze-Schock-Behandlung 56

**4. Diskussion** 58

4.1 Nitorsativer Stress 58

4.2 Erhöhte iNOS-Expression und Nitrotyrosin-Bildung in Prostatatumor-Geweben und Prostatakrebs-Zellen 59

4.3 Einfluss von NO auf den Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Androgen-Rezeptor 60

4.4 Nitrosativer Stress beeinflußt die Intrazelluläre Zinkhomöostase 61

4.5 Wirkungen von nitrosativem Stress auf das Trx/Trx-R-System 63

4.6 Einfluß des Trx/Trx-R-Systems auf die Reversibilität der intrazellulären Zinkfreisetzung nach nitrosativem Stress 64

4.7 Hitze-Schock 65

**5. Zusammenfassung** 67

**6. Summary** 68

**7. Literaturverzeichnes** 69

**8. Abkürzungsverzeichens** 82

**Danksagung** 83

**Erklärung** 84

# 1. Einleitung

## 1.1 Stickstoffmonoxid

Erst 1987 wurde von Louis Ignarro entdeckt, dass das zuvor nur als Umweltgift bekannte Stickstoffmonoxid (NO) auch in Säugetieren produziert wird und ein wichtiger Mediator für die Regulation von Blutfluss 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 wirkt über die Aktivierung der Guanylat-Zyklase (Gruetter *et al.*, 1979) und führt zu einer Vasodilatation (Ignarro *et al.*, 1987; Palmiter *et al.*, 1995). Kurz danach wurde die Bedeutung von NO als Neurotransmitter und als Effektormolekül der Immunabwehr entdeckt. So können z.B. aktivierte Makrophagen große Mengen an NO synthetisieren.
NO wird durch Oxidation und Abspaltung eines Stickstoff-Atoms von 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 (nNOS und eNOS) und eine induzierbare NO-Synthase (iNOS) unterschieden. Die konstitutiven NO-Synthasen produzieren auf geeignete Stimuli (z.B. $Ca^{2+}$) für eine kurze Zeit „physiologische“ Konzentrationen an NO. Dieses führt zu einer Aktivierung der Guanylat-Zyklase mit nachfolgender cGMP-Synthese. Im Gegensatz dazu wird die induzierbare NO-Synthase nur nach einer Aktivierung von Zellen exprimiert (Nathan, 1992; Förstermann *et al.*, 1994;). Befähigt sind hierzu praktisch alle kernhaltigen Körperzellen, wie z.B. 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. TNF-α, IFN-γ und IL-1β induziert. Daher findet man die iNOS bei zahlreichen akuten und chronischen Entzündungsreaktionen (Kröncke *et al.*, 1998; Zamora *et al.*, 2000). Andere Zytokine wie z.B. Transforming Growth Factor-β, IL-4 und IL–10 führen hingegen zu einer Hemmung der iNOS-Expression. Auch Glukokortikoide hemmen die Expression der iNOS (Kunz *et al.*, 1996; Pfeilschifter *et al*., 1996). In aktivierten Zellen produziert die iNOS bei Substratsättigung über einen längeren Zeitraum NO in mikromolaren steady-state-Konzentrationen im niedrigen mikromolaren Breich (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- oder Abschalten der Enzymaktivität, sondern wird vom Substratangebot (L-Arginin), von der Enzym-Halbwertszeit und von der Enzym-Neubildung bestimmt (Marletta *et al.*, 1998).

## 1.2 Nitrosativer Stress

Von Zellen synthetisiertes NO hat in biologischen Flüssigkeiten eine Halbwertzeit von wenigen Sekunden, da es rasch von molekularem Sauerstoff zu den stabilen Endprodukten Nitrit und Nitrat oxidiert wird. Als Zwischenprodukte treten reaktive Stickoxidverbindungen auf (z.B. $N_2O_3$), welche ihrerseits ein breiteres chemisches Reaktionsspektrum als NO selbst haben (Wink & Mitchell, 1998).
Bei Entzündungsreaktionen wird NO im Körper lokal in großen Mengen durch die iNOS synthetisiert, man spricht dann von "nitrosativem Stress". Hierbei wird die Schädigung von gesundem Gewebe durch die 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 hemmt 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 der 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 hemmen (Henry *et al.*, 1993). Die Reaktion mit dem Superoxid-Anion ergibt Peroxynitrit, ein starkes Oxidationsmittel, welches zur Tötung von Mikroorganismen, aber auch zur Gewebsschädigung führt (Beckman *et al.*, 1990). Peroxynitrit zeigt eine hohe Affinität zu aromatischen Aminosäuren, die Vorstufen für Neurotransmitter oder Hormone sind. Es kommt zur Nitrierung von Tyrosin zu Nitrotyrosin (Abb. 1) (Ischiropoulos *et al*., 1998).

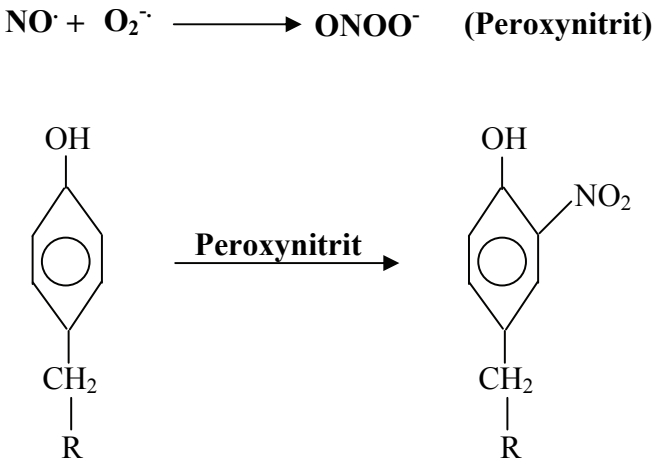



**Abb. 1:** Tyrosin-Nitrierung

Der Hauptangriffspunkt von NO in Proteinen ist die Aminosäure Cystein, deren SH-Gruppen mit NO in Gegenwart von $O_2$ 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 DNA, RNA oder Proteinen in Interaktion treten können (Klug & Schwabe, 1995). Nitrosativer Stress setzt in verschiedenen Zellen Zinkionen im Nukleus frei (Berendji *et al*., 1997). Kröncke et al. zeigten, dass nitrosativer Stress $Zn^{2+}$ aus Zinkfinger-Strukturen freisetzt, was über eine Strukturänderung zur Hemmung der spezifischen Bindung von Zinkfinger-TF an der DNA führt (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 *et al.*, 2002). IL-2 wird dominant reguliert durch die Zinkfinger-TF Sp1 und EGR-1. Die reversible Hemmung der Zinkfinger-Familie von TF wie Sp1 und EGR-1 von NO führt zu einer Hemmung der IL-1β-induzierten IL-2 mRNA-Expression (Berendji *et al*., 1999). Diese inaktivierende Wirkung von NO auf Zinkfinger-TF stellt wohl einen Teil der immunsupressiven Wirkungen von NO dar. Schließlich wurde nachgewiesen, daß NO

die DNA-Bindungsaktivität des Zinkfinger-TF LAC9 hemmt, während ein Transkriptionsfaktor ohne Zinkfinger nach NO-Behandlung in seiner DNA-Bindungskapazität nicht beeinträchtigt ist. Wenn der TF ein Aktivator ist, kann NO zur Inaktivierung von Genen führen. Ist der TF jedoch ein Repressor, kann die Aufhebung der DNA-Bindung zur Aktivierung der Transkription führen, vorausgesetzt, die nun aktiven TF sind nicht redox-sensitiv (Kröncke, 2001). Ein anderes Beispiel ist der TF OxyR, der ein Sensor für Redoxstress in Bakterien ist und die Transkription von protektiven Enzymen wie Katalase und Glutathion-Reduktase induziert. Die NO-abhängige S-Nitrosierung der Cysteine in OxyR ermöglicht erst die spezifische DNA-Bindung mit nachfolgender Transkription (Kolb-Bachofen *et al.*, 2000; Marshall *et al.*, 2000).

Bisher wurden einige Wirkmechanismen von NO beschrieben, welches sowohl zytotoxisch als auch zytoprotektiv wirken kann. Es scheint, dass es abhängig von der Dauer und Stärke der Aktivierung der iNOS zu sehr unterschiedlichen Reaktionen kommen kann. Eine besondere Bedeutung bekommt diese Problematik im Hinblick auf die Therapie von chronisch entzündlichen, autoimmunen oder Tumor-Erkrankungen, die entweder von der Gabe von NO-Donoren oder von einer selektiven Hemmung der iNOS profitieren könnten (Kröncke, 2000).

## 1.3 Zink

Zink in Form von Zinkionen ist ein essentieller Mikronährstoff, der für die DNA-Synthese, die Zellteilung und die Proteinsynthese benötigt wird. Als strukturelle und/oder funktionelle Komponente in Metalloenzymen und Metalloproteinen (Coleman, 1992) hat er zwei Wirkungen. Auf der einen Seite hält er durch koordinative Bindungen mehrere Aminosäurenketten des Enzymproteins in einer bestimmten Anordnung fest, welche zur Einleitung einer enzymatischen Reaktion günstig ist. Auf der anderen Seite kann er 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).

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 besitzt etwa 2-3 g Zink, wovon sich etwa 99% intrazellulär befinden. 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 (75%, Carboanhydrase) und Leukozyten (3%, alkalische Phosphatase). Die Normalkonzentration im Plasma beträgt 15-20 µmol/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. Auf zellulärer Ebene scheint das Zinkspeicherprotein Metallothionein eine zentrale Rolle in der Regulation des Zinkmetabolismus zu spielen (Richards, 1989; Kagi, 1991).

Zink wird über zelluläre Zink-Aufnahmesysteme in die Zelle aufgenommen. Diese Zink-Aufnahmesysteme sind Mitglieder der ZIP-Familie (zinc-regulated transporter and iron-regulated transporter protein) (Zhao & Eide, 1996a; Zhao & Eide, 1996b; Grotz *et al*., 1998; Gaither & Eide, 2000; Rogers *et al*., 2000). Bisher sind 15 ZIP-Transporter in menschlichen Zellen gefunden worden (Liuzzi & Cousins, 2004). Die meisten Zip-Proteine haben 8 Transmembran-Domänen. Ein charakteristisches Merkmal dieser Gruppe ist eine histidin-reiche Region mit einer möglichen Zink-bindenden Domäne (Paulsen & Saier, 1997), die sich zwischen den transmembranen Helices 3 und 4 befindet.

Eine essenzielle Rolle spielen dabei die cation diffusion facilitator (CDF) Proteine (Nies, 2003). Zur den CDF-Proteinen gehören die $Zn^{2+}$-transportierenden Proteine der ZnT-Reihe (zinc transporter) (McMahon & Cousins, 1998; Kambe *et al*., 2002; Kirschke & Huang, 2003). Die Hauptaufgabe von ZnT-Transportern ist das cytoplasmatisch verfügbare Zink reduzieren durch Zinkexport aus der Zelle (Palmiter & Findley, 1995) zu. Sie sind in der Plasmamembran lokalisiert und werden in vielen Zellen und Gewebetypen exprimiert. ZnT haben eine histidin-reiche Region mit einer möglichen Zink-bindenden Domäne (Paulsen & Saier, 1997), die sich zwischen den transmembranen Helices IV und V befindet. In Säugerzellen wurden 10 homologe ZnT-

Proteine (ZnT-1 bis ZnT-10) beschrieben (Seve *et al*., 2004). Das bekannteste ZnT Mitglied ist das in der Plasmamembran lokalisierte ZnT-1. Die Hauptaufgabe von ZnT-1 ist die Regulation des Zinkefflux aus der Zelle. (Jirakulaporn & Muslin, 2004).
Im Immunsystem ist eine optimale systemische Zinkkonzentration für die normale Aktivität von T-Helferzellen, T-Killerzellen und Natürliche-Killerzellen wichtig. Über das Thymushormon Thymulin ist Zink an der Transformation von Thymozyten beteiligt. Auch die Aktivität einiger Lymphokine ist Zink-abhängig (Fraker *et al.*, 2000; Dardenne, 2002; Pinna *et al.*, 2002). Die besondere Bedeutung von Zink wird klar, wenn man sich vergegenwärtigt, welche unterschiedlichsten 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). Ein angeborener Zinkmangel besteht bei der *Acrodermatitis enteropathica* (Sehgal & Jain, 2000), wo unter anderem Hautefflorenzen (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.
Eine extensive Bildung von NO durch die iNOS trägt zu entzündlichen Veränderungen (Appleton *et al*., 1996) und möglicherweise zur Tumorentstehung bei. NO kann direkt oder über Peroxynitrit DNA-Schäden hervorrufen, die DNA-Reparatur hemmen, die Apoptose blockieren, die Expression von Onkogenen fördern und Transkriptionsfaktoren modulieren. NO trägt auch zur Angiogenese bei (Tamir & Tannenbaum, 1996; Ambs *et al*., 1998; Jaiswal *et al*., 2001; Marnett *et al*., 2003).

## 1.4 Das zelluläre Reparatursystem Thioredoxin-Reduktase/Thioredoxin

Das System Thioredoxin-Reduktase/Thioredoxin kommt ubiquitär vor und existiert sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten. Die Komponten des Systems sind die Thioredoxin-Reduktase (Trx-R), ihr Substrat Thioredoxin (Trx) und NADPH. Trx-R gehört zur Gruppe der NADPH-abhängigen Disulfid-Oxidoreduktasen, die als prosthetische Gruppe ein FAD besitzen, wie die Lipoamiddehydrogenase und die Glutathion-Reduktase. Die Trx-R reduziert oxidierte Thiole, die Thiole sind für die

Faltung von Proteinen, Protein/Protein- und DNA/Protein-Interaktionen, z.B. mittels Ausbildung von Zinkfingerstrukturen, wichtig (Wu *et al.,* 1996). Das Enzym Trx-R trägt seinen Namen daher charakteristischen redoxaktiven Disulfid/Dithiol-Eigenschaft und daher aufgrund seiner Bedeutung bei der Redoxregulation der Zelle. Oxidiertes Thioredoxin als Substrat der TrxR in einer NADPH-abhängigen Reaktion zu Trx-$(SH)_2$ reduziert (Abb. 2).

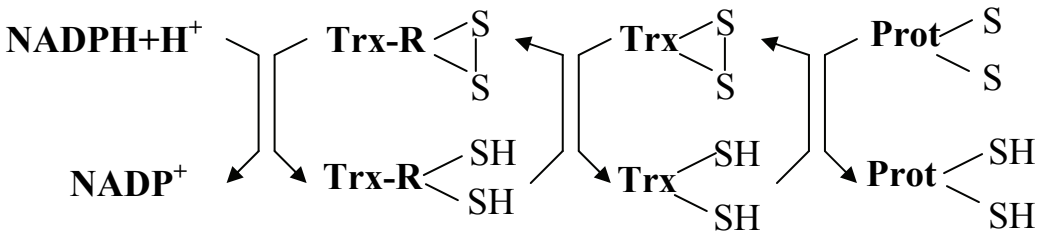



**Abb. 2:** Schematische Darstellung des Trx/Trx-R-Systems (Landino *et al*., 2004)

Reduziertes Trx beeinflußt die Aktivitäten von wichtigen Zellkomponenten des Zellmetabolismus, wie z.B. Ribonucleotid-Reduktase, Transkriptionfaktoren (AP-1, NFκB), Vitamin K-Epoxid-Reduktase, Thiolperoxidase und plasmatische-Glutathionperoxidase (pGPx) (Tamura *et al.,* 2002). Es sind bis jetzt drei Isoformen der Trx-R in Eukaryonten beschrieben. Die zytosolische Thioredoxin-Reduktase 1 (Trx-R1) setzt sich aus homodimeren 55 kDa Untereinheiten mit je 499 Aminosäuren zusammen, wobei sich jeweils an Position 498 ein Selenocystein befindet. Substrate der Trx-R1 sind außer Trx auch die Proteindisulfidisomerase, natural killer cell lysin (NK-Lysin) und die $Ca^{2+}$-Bindungsproteine 1 und 2, aber auch kleine Verbindungen wie Selenodiglutathion, Lipidhydroperoxide oder 5,5´-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) werden reduziert (Luthman *et al.,*1982; Holmgren *et al.,* 1989; Oblong *et al.,* 1993; Lundstrom-Ljung *et al.,* 1995; Andersson *et al.,* 1996; Holmgren *et al.,* 1996; Gromer *et al.,* 1998). Zwei weitere Thioredoxin-Reduktasen sind bekannt, Trx-R2 und Trx-R3, die ebenfalls ein Selenocystein im aktiven Zentrum besitzen, das sich am C-Terminus der Polypeptidkette befindet. Die Trx-R1 befindet sich im Zytoplasma, wohingegen die Trx-R2 hauptsächlich in Mitochondrien vorkommt. Die Expression der Trx-R3 wurde bisher nur im Testikel nachgewiesen (Gasdaska *et al.,* 1999; Sun *et al.,* 1999).

Das Substrat der Trx-R ist Trx, das ubiquitär und in hoher Konzentration exprimiert wird. Es wurde als Wachstumsfaktor von Lymphozyten identifiziert und erschwert die

Apoptose von Zellen, was bei Überexpression in Tumorzellen einen Wachstumsvorteil für diese Zellen darstellen kann (Schenk *et al.,* 1996; Baker *et al.,* 1997; Das *et al.,* 1999). Es sind zwei Isoformen von Thioredoxin bekannt: Thioredoxin 1 (Trx1) und Thioredoxin 2 (Trx2). Das aus 104 Aminosäuren bestehende Trx1 hat ein Molekulargewicht von 12 kDa; es enthält zwei katalytische Stellen, Cysteinreste (-Trp-$Cys_{32}$-Gly-Pro-$Cys_{35}$-Lys-), die in allen Thioredoxinproteinen vorhanden sind und als Wasserstoffdonor dienen können. Zusätzlich enthält es noch drei Cysteinreste ($Cys_{62}$, $Cys_{69}$ und $Cys_{73}$), die in Bakterien nicht zu finden sind. Trx1 ist vorwiegend im Zytosol lokalisiert. Nach Behandlung mit $H_2O_2$, NO oder Bestrahlung mit UV-Licht wurde eine Translokation des Trx vom Zytosol in den Zellkern beobachtet (Didier *et al*., 2001; Arai *et al*., 2006). Vermutlich reduziert Trx Transkriptionsfaktoren wie z.B. NFκB oder Nrf2 (Akamatsu *et al.*; 1997; Saitoh *et al.*, 1998; Bertini *et al.*, 1999; Hirota *et al.*, 1999; Makino *et al*., 1999). Trx2 wurde als mitochondrial beschrieben, hat ein Molekulargewicht von 18 kDa und besteht aus 166 Aminosäuren. Trx2 ist während der Embryonal-Entwicklung für die Zellproliferation und für mitochondriale Funktionen essenziell (Patenaude *et al*., 2003) Trx1 wird von verschiedenen Zellen sezeniert (z.B. von Ebstein-Barr-Virus-transformierten Zellen, Hepatoma-Zellen, Hepatozyten, Lymphozyten und Fibroblasten). Es hat verschiedene Funktionen, z.B. bei der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, beim Wachstum und der Differenzierung, bei der Hemmung der Apoptose und dem Schutz vor oxidativem Stress (Powis *et al*., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden Trx-R1 und Trx1 untersucht.

## 1.5 Hitze-Schock

Der Hitze-Schock (HS) hat eine lebensbedrohliche Wirkung. Er ist im Organismus charakterisiert durch eine erhöhte Kerntemperatur von >40°C und Störungen des Zentralnervensystems. Bei Fieber erhöht sich die Körpertemperatur, der Höchstwert kann zwischen 42°C und 44°C liegen. Fieber kann durch Infektionen mit Viren oder Bakterien auftreten, aber auch durch Impfungen oder körpereigene Abwehrreaktionen. Auch Vergiftungen und andere chemische Stoffe lösen Fieber aus. Es kann zu Krämpfen oder einem Koma bei trockener und heisser Haut kommen (Knochel *et al*., 1994; Bauchama *et al*., 2002). Ein charakteristisches Warnzeichen ist die stark verminderte oder eingestellte Schweißsekretion, Kopfschmerzen,

Konzentrationsschwäche, Benommenheit, Schwindelanfälle, Übelkeit und Erbrechen. Es ist das Ergebnis einer thermischen Schädigung der Zentren der Thermoregulation. Als häufigste Komplikation entwickelt sich eine Gefäßinsuffizienz. Die Haut im Gesicht und an den Extremitäten wird schlecht durchblutet und ist blass-zyanotisch (graues Stadium). Der Tod tritt bei Temperaturen über 44°C durch Lähmung der medullären Atmungs- und Kreislaufzentren und infolge des Multiorganversagens ein. Überlebende leiden meist an anhaltenden neurologischen Störungen (Bauchama *et al*., 2002). Die erhöhte Körpertemperatur wirkt als Noxe, die im Zentralnervensystem (ZNS) zu thermischen Zellschädigungen führen kann. Das klinische Bild ist durch Beeinträchtigung des ZNS und durch Kreislaufinsuffizienz geprägt (Dematte *et al*., 1982). Um in der vorliegenden Arbeit die Wirkungen von HS *in vitro* untersuchen zu können, wurden die Zellen 40 Minuten lang auf 43$^{o}$C erhitzt. Anschließend wurden die Wirkungen auf die intrazelluläre Zinkhomöostase und das Trx/Trx-R-System untersucht.

Nach einem Hitze-Schock werden in erhöhtem Maße Hitze-Schock-Proteine (HSP) gebildet. In diesen Situationen zellulären Stresses stabilisieren HSP zelluläre Proteine, um sie vor Denaturierung zu schützen oder beschleunigen den Abbau nicht mehr funktionsfähiger Proteine über das Proteasom. In physiologisch normalen Situationen spielen ubiquitär vorkommende Hitzeschockproteine eine wichtige Rolle als Chaperone, die an der korrekten Faltung und Reifung von Proteinen beteiligt sind. Diese nicht stressinduzierten Hitzeschockproteine werden auch Hsc genannt (für heat shock cognates). Hitzeschockproteine werden nach ihrer Molekülmasse unterteilt, z. B. in Hsp27 mit einer Masse von 27 kDa, Hsp40, Hsp60 (Chaperonine) sowie die Hsp70/Hsp90-Proteine. Hsp70/90 binden während der Proteinsynthese an neu synthetisierten Peptide, Chaperonine (Hsp60-Proteine) umschließen neu synthetisierte Proteine wie ein Faß, um ihnen in geschützter Umgebung die richtige Faltung zu ermöglichen (Buchner *et al*., 2002; Wegele *et al*., 2004).

Ein HS hat hemmende Effekte auf die Transkription (ausgenommen HS-Gene) und Translation von vielen Genen. Es hemmt beispielsweise die Synthese und Akkumulation von zellspezifischen Proteinen, Cycline, die Expression von S-Phase spezifischen Genen und den Transkriptionsfaktor-E2F. Ein HS ändert die Membran-Permeabilität und erhöht den Ionenfluss. Eine intrazelluläre Erhöhung von Calcium-Ionen, Aktivität von Calcium-Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen. Außerdem erhöht ein HS die intrazelluläre Natrium- und Protonen-Konzentration. In der

Mitochondrienmembran bewirkt ein HS einen ATP-Abbau, wodurch ATP-abhängige Zellzyklus-Prozesse verhindert werden (Gaither *et al*., 2001; Persans *et al*., 2001; Gitan *et al*., 2003; Palmiter *et al*., 2004).

## 1.6 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll zu erst in Prostatatumor-Geweben *in vivo* nitrosativer Stress nachgewiesen werden. Nach diesen *in vivo* Untersuchungen, soll eine Zellkultur-Methode etabilierden werden, um den nitrosativen Stress *in vitro* nachweisen zu können. Danach soll der Einfluß von NO auf einen Transkriptionsfaktor, der bei einer menschlichen Erkrankung eine Rolle spielt, untersucht werden. Ausgewählt wurde der Androgen-Rezeptor.

Anschließend soll untersucht werden, ob das Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase-System beim Wiedereinbau von durch nitrosativem Stress freigesetzten intrazellulärem Zink eine Rolle spielt.

Zum Schluß sollen die Wirkungen von nitrosativem Stress mit den Wirkungen eines Hitze-Schocks in Bezug auf die zelluläre Zinkhomöostase verglichen werden.

# 2. Material und Methoden

## 2.1 Versuchsmaterialien

| | |
|---|---|
| Acrylamidlösung, rotiphorese Gel 30 | Roth, Karlsruhe |
| APS analytical grade | Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| Albumin from bovine serum (BSA) 98% | Sigma, Deisenhofen |
| Auranofin | Alexis, Stutttgart |
| Coomassie Brilliant Blau R250 | Merck, Darmstadt |
| DAPI | Molecular Probes, Karlsruhe |
| DEA/NO | Sigma, Deisenhofen |
| DETA | Sigma, Deisenhofen |
| DETA/NO | Prof. Dr. Klaus-Dietrich Kröncke |
| DMEM | Sigma, Deisenhofen |
| DMSO | Roth, Karlsruhe |
| DPBS | Sigma, Deisenhofen |
| DTNB | Sigma, Deisenhofen |
| DTT | Sigma, Deisenhofen |
| EDTA electrophoresis grade | ICN Biomedicals, Ohio |
| Essigsäure (Eisessig) 100% pro analysi | Merck, Darmstadt |
| Ethidiumbromid | Molecular Probes, Karlsruhe |
| FCS | PAA Laboratories GmbH, Pasching |
| Fettfreies Milchpulver blotting grade | Roth, Karlsruhe |
| Fluoromount C | Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| Gentamycin solution | Sigma, Deisenhofen |
| Glukose | Sigma, Deisenhofen |
| Glycin ≥ 99,9% p.A. | Roth, Karlsruhe |
| Guanidin Hydrochlorid | Merck, Darmstadt |
| HEPES | Sigma, Deisenhofen |
| Insulin | Sigma, Deisenhofen |
| KCl | Invitrogen, Carlsbad |
| L-Glutamin | Merck, Darmstadt |

| | |
|---|---|
| Matrigel | Becton Dickinson, Le Pont de Claix |
| Methanol p.A. | Merck, Darmstadt |
| $MgCl_2$ | Invitrogen, Carlsbad |
| $NaCl_2$ pro analysi | Merck, Darmstadt |
| NADPH | Sigma, Deisenhofen |
| $Na_2HPO_4$ pro analysi | Merck, Darmstadt |
| Selenit | Merck, Darmstadt |
| Paraformaldehyd | Sigma, Deisenhofen |
| Penicillin | PAA Laboratories GmbH, Pasching |
| SDS Ultra Pure ≥ 99% | Roth, Karlsruhe |
| Streptomycin | PAA Laboratories GmbH, Pasching |
| TEMED p.A. 99% | Roth, Karlsruhe |
| Thioredoxin | Sigma, Deisenhofen |
| Tris Pufferan® ≥ 99,9% | Roth, Karlsruhe |
| Triton X-100 | Sigma, Deisenhofen |
| Trypsin-EDTA | PAA Laboratories GmbH, Pasching |
| Tween 20 | Sigma, Deisenhofen |

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

| | |
|---|---|
| Zellkultureinsätze | Becton Dickinson, Le Pont de Claix |
| Zellkultur-Materialien | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Deckgläschen | Assistent, Stuttgart |
| Kryotubes | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Einmal-Küvetten | Sarstedt, Nümbrecht |
| Nitrozellulose-Membran Hybond-C Extra | Amersham Biosciences, Freiburg |
| Whatman-Filterpapiere | Roth, Karlsruhe |
| Bio-Max-Film | Kodak, Stuttgart |
| Objektträger | Engelbrecht, Edermünde |

## 2.3 Zelllinien

| | |
|---|---|
| LNCaP | American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA |
| 22Rv1 | American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA |

## 2.4 Isolation von Humanen Dermalen Fibroblasten (HDF) aus Biopsien

Vor Beginn der Isolation wurden die Biopsien in kaltem PBS gewaschen und daraufhin erneut eine Minute in PBS plus 20 µg/ml Gentamyzin gewaschen. Anschließend wurde das Fettgewebe großzügig mit einem Skalpell entfernt, wobei darauf zu achten war, dass die Biopsie nicht austrocknet. Dann wurde die Biopsie in möglichst kleine Stücke, die nicht größer als 5 mm sein sollten, zerteilt. Diese Stücke wurden mit der Dermisseite nach unten auf einer Petrischale plaziert und 10 Minuten angetrocknet. Anschließend wurde die Petrischale mit Dublecco`s modified Eagle`s Medium (DMEM), das mit 20% FCS supplementiert wurde, aufgefüllt, bis die Hautstücke komplett mit Medium bedeckt waren. Die Schalen sollten möglichst wenig bewegt werden, um das Ablösen der Hautstücke zu verhindern. Nach einigen Tagen wuchsen zuerst epitheliale Zellen aus der Biopsie nach außen. Unter diesen wuchsen einige Tage später die Fibroblasten heraus. Nachdem die Fibroblasten einen gewissen Konfluenzgrad erreicht hatten, konnten sie trypsiniert und im Folgenden unter Aufrechterhaltung des hohen Serumanteils weiterkultiviert werden. Nur Fibroblasten überleben das stark serumhaltige Medium (Fleischmeyer *et al.*, 1990; Bayreuther *et al*., 1992).

## 2.5 Kultivierung der Zellen

Die HDF wurden in Dublecco`s modified Eagle`s Medium (DMEM-Medium), das mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin (Komplettmedium) supplementiert wurde, in einer wasserdampfgesättigten, auf 37°C temperierten Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid kultiviert. Nach Erreichen einer 80-90%-igen Konfluenz wurden alle Zellen zuerst mit PBS gewaschen und anschließend mit einer

Trypsin-EDTA:PBS Lösung von den Kulturflaschen abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde nach 2 bis 5 Minuten durch Zugabe von FCS-haltigem Medium abgestoppt, die Zellen resuspendiert, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in die entsprechende Anzahl Kulturflaschen oder -schalen überführt.
Prostata Karzinom-Zellen (LNCaP und 22RV1) wurden in RPMI 1640 Medium mit 2,5% Steroid-freiem FBS (cFBS; Biochrom, Berlin, Deutschland) und 10 nM R1881 (synnthetisches Androgen Methyltrienolon, New England Nuclear, Dreieichenhain, Deutschland) inkubiert.

## 2.6 Mykoplasmentest

In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen auf Kontaminationen mit Mykoplasmen untersucht. Bei Mykoplasmen handelt es sich um zellwandlose, von einer Zytoplasmamembran umgebene Bakterien, welche parasitär Zellen befallen. Mykoplasmen können das geregelte Zellwachstum beeinflussen bzw. die Reaktionen von Zellen auf bestimmte Stimuli verändern. Da sie lichtmikroskopisch nicht zu sehen sind, bleiben sie ohne eine geeignete Detektionsmethode unerkannt. Die Zellkultur wurde mit Hilfe des fluoreszierenden Farbstoffes Bisbenzimid kontrolliert. Zellen wurden mit einer Dichte von etwa 1000 Zellen/$cm^2$ auf einem Deckgläschen kultiviert. Nach 2 Tagen Inkubation wurden die subkonfluenten Zellen auf dem Deckgläschen mit 2 ml PBS gewaschen und für 10 Minuten in 1 ml Carnoy's Fixativ fixiert. Danach erfolgte zweimaliges Waschen der Zellen mit McIlvaine-Puffer und eine 15-minütige Inkubation in 1 ml DAPI-Lösung. Nach zweimaligem Waschen mit destiliertem $H_2O$ ($dH_2O$) konnte das Deckgläschen mit den Zellen auf einen Objektträger mit 20 µl Einbettmedium (Fluoromount C) fixiert werden. Innerhalb der nächsten 20 Minuten wurden die gefärbten Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm auf Mykoplasmen kontrolliert. Durch den Farbstoff Bisbenzimid (DAPI) wird selektiv DNA angefärbt. Nicht-kontaminierte Kulturen zeigten eine hellblaue Fluoreszenz, welche ausschließlich auf den Zellkern beschränkt ist. Zellkulturen mit Mykoplasmen zeigten neben dem fluoreszierenden Zellkern eine deutliche Fluoreszenz im Bereich der äußeren Zellmembran und zwischen den Zellen. Die Mykoplasmen erschienen entweder als gleichmäßig über die Zytoplasmamembran verteilte Partikel oder sie bildeten

Aggregate auf der Zelloberfläche und/oder zwischen den Zellen. Kontaminierte Zellkulturen wurden autoklaviert und entsorgt.

### 2.7 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Die behandelten Zellen wurden auf der Kulturschale zweimal mit 10 ml kaltem PBS gewaschen und in 1 ml PBS abgeschabt. Anschließend wurden die Zellen mit Ultraschallwellen aufgebrochen, in SDS-haltigem Lämmlipuffer (0,5%) suspendiert und für die Analyse auf ein Gel aufgetragen. Der Proteingehalt des Überstandes wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt (s. 2.9) und die Aliquots bei –80 °C aufbewahrt.

### 2.8 Herstellung von Kernextrakten

Kernextrakte wurden mit den Kernextraktions-Kits von Active Motive hergestellt. Die behandelten Zellen wurden auf der Kulturschale zweimal mit kaltem PBS gewaschen, anschließend in PBS + Phosphatase Inhibitoren augenommen, dann abgeschabt und für fünf Minuten bei 100 g abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen in Zelllysepuffer resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 0,5%igem Nondinet-P40- (NP-40) Lösung erfolgte eine erneute Inkubation auf Eis für 2 Minuten. In Anwesenheit von NP-40 werden die Zellmembranen aufgebrochen und das Zytoplasma in den Zelllysepuffer freigesetzt. Bei der anschließenden Zentrifugation mit 14000 g für 30 Sekunden wurde Zytoplasma isoliert. Das Pellet wurde in AM1 Lyse-Puffer mit 1 mM Dithiothreitol resuspendiert. Nach 30 minütiger Rotation wurden die Zellkerne zentrifugiert (14000g für 10 Minuten). Der Proteingehalt des Überstandes wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt, Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C aufbewahrt.

Lysepuffer: 20 mM HEPES, 5 mM NaF, 10 µM $Na_2MoO_4$, 0,1 mM EDTA

## 2.9 Messung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Als Proteinstandard zur Erstellung der Kalibrierungsgeraden diente die Verdünnungsreihe einer BSA-Lösung (1, 2, 3, 4, 5 und 6 µg/µl). Auf einer 96-Loch-Microtiter-Platte wurden jeweils 200 µl des Bradford-Reagenzes mit 1 µl der Proteinlösungen bzw. der Standards vermischt. Nach 2 Minuten erfolgte die photometrische Auswertung bei 595 nm mittels eines Spectrafluor-Plus-Photometers und der X-Fluor-Software (Tecan, Crailsheim).
Bradford-Reagenz: 0,01% Coomassie Brillant Blue G-250, 25 ml Ethanol, 50 ml Phosphorsäure 85% , ad 500 ml Aqua dest.

## 2.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteingemische erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) im Lämmli-System mit Tris-Glycin-Puffern (Laemmli, 1970). Die Arbeiten wurden mit dem vertikalen Elektrophoresesystem Mini-Protean-3 durchgeführt. Die 1 mm dicken Gele bestanden aus einem Trenngel (Höhe: ca. 5,5 cm, 12% Polyacrylamid, pH 8,8) und einem Sammelgel (Höhe: ca. 1,5 cm, 5% Polyacrylamid, pH 6,8). Für die Analyse der Gesamt-Proteinextrakte und der Kernextrakte wurden je 30 µg Protein eingesetzt. Die Proteinproben wurden im Verhältnis 4:1 mit 4-fach Lämmlipuffer versetzt und nach fünfminütigem Erhitzen bei 95 °C (Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg) in die Taschen des Sammelgels gefüllt. Eine Tasche wurde jeweils mit Marker beladen (SeeBlue oder SeeBlue Plus 2, Invitrogen, Karlsruhe). Die Elektrophorese wurde innerhalb der ersten 10 Minuten bei 80 V, danach mit einer konstanten Spannung von 120 V für ca. 2 Stunden durchgeführt.

Trenngel 12% (1 Gel): 2,08 ml Aqua dest., 1,23 ml Tris-HCl-Puffer (1,5 M; pH 8,8), 1,64 ml Acrylamidlösung (rotiphorese Gel 30, Roth, Karlsruhe), 49,2 µl SDS-Lösung (10%), 24,6 µl APS-Lösung (10%), 2,46 µl TEMED
Sammelgel 5% (1 Gel): 1,2 ml Aqua dest., 0,5 ml Tris-HCl-Puffer (0,5 M; pH 6,8), 0,25 ml Acrylamidlösung (rotiphorese Gel 30, Roth, Karlsruhe), 20 µl SDS-Lösung (10%), 20 µl APS-Lösung (10%), 2 µl TEMED

Lämmlipuffer (4-fach): 1,0 g SDS, 0,24 g Tris, 0,1 g Bromphenolblau, 4 ml Glycerol, ad 10 ml mit Aqua dest., q.s. konzentrierte Salzsäure (zur Einstellung von pH 6,8), 20% β-Mercaptoethanol (frisch zugegeben)
Elektrophoresepuffer: 15 g Glycin, 3 g Tris, 1 g SDS, ad 1 l mit Aqua dest.

### 2.11 Western Blot der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden nach der Burnette-Methode (Burnette, 1981) auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Der Transfer erfolgte nach einer kurzen Äquilibrierung von Gel-Blotting-Papier, Membran und Gel in Transferpuffer mit einer Trans-Blot Semi-Dry-Transferzelle bei einer konstanten Spannung von 12 V über 20 min. Alternativ wurde auch eine Mini Trans-Blot-Transferzelle bei einer konstanten Spannung von 100 V über 1 Stunde verwendet. Unmittelbar danach wurde der Proteintransfer und die gleichmäßige Proteinbeladung durch eine reversible Färbung der Membran mit Ponceau-Lösung kontrolliert und mittels Lichtfotokopie dokumentiert. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran nun über Nacht bei 4 °C in Blockpuffer TBST inkubiert.

Transferpuffer: 5,81 g Tris, 2,93 g Glycin, 200 ml Methanol, 0,37 g SDS, ad 1l mit Aqua dest.
Ponceau-Lösung: 3% Trichloressigsäure, 0,1% Ponceau S, in Aqua dest.
Blockpuffer: 5% fettfreies Milchpulver, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20, pH 7,5

### 2.12 Antikörper-Inkubation der Nitrozellulosemembran

Die Membran wurde zusammen mit dem in 5 ml Blockpuffer/0,1% Tween aufgenommenen Thioredoxin Primär-Antikörper (AbD Serotec, UK) verdünnt 1:250 in eine Klarsichtfolie eingeschweißt. Die Inkubation erfolgte auf einem Schüttler unter ständigem Umschütteln über einen Zeitraum von 2 Stunden. Anschließend wurde die Membran aus der Folie entnommen, auf einem Schüttler dreimal für 10 Minuten in PBS/0,1% Tween gewaschen und für 1 Stunde mit dem in 25 ml Blockpuffer/0,1% Tween aufgenommenen HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörper (Biosciences,

Heidelberg, Deutschland) Verdünnung: 1/2000 (v/v) in TBST inkubiert. Anschließend wurde erneut für 1 Stunde gewaschen. Zum Nachweis der Bindung wurden die beiden Nachweisreagenzien (Luminol-Lösung, Verstärker-Lösung; Pierce Biotechnology, Rockford IL) im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Membran gegeben. Die Membran wurde in Folie eingeschweißt und mit einem Bio-Max-Film in einer Filmkassette platziert. Der Film wurde etwa zwei Minuten exponiert und anschließend in einer Dunkelkammer entwickelt und fixiert. Densitometrische Analysen der Western Blots wurden mit Hilfe einer Scion Image Software durchgeführt.

### 2.13 Immunzytochemie

Die Zellen wurden auf Glasplättchen kultiviert, zweimal mit kaltem PBS gewaschen und für 10 Minuten bei 4°C mit 3,5% Paraformaldehyde fixiert. Anschließend wurde das Formaldehyd entfernt und die Zellen weitere zwei Mal mit PBS gewaschen. Zur Erhöhung der Permabilität wurde anschließend 10 Minuten bei Raumtemparatur (RT) mit 0,5% Triton X-100 in TBS inkubiert. Die Zellen wurden mit einer Blocking-Lösung (TBT/5%BSA) für 60 Minuten RT behandelt, anschließend wurden sie 1 Stunde mit dem primären Antikörper inkubiert.
Nach viermaligem Waschen für je 10 Minuten mit TBT wurden die fixierten Zellen mit Alexa 488-gekoppeltem IgG-Sekundärantikörpern für 1 Stunden bei RT inkubiert. Danach wurde erneut viermal je 15 Minuten mit TBST gewaschen. Anschließend wurden die Zellen einer DAPI-Färbung unterzogen. Dafür wurden die Zellen für 10 Minuten mit DAPI-Färbelösung (Verdünnung: 1/500 in McIlvaine-Puffer) inkubiert und anschließend für weitere 30 Minuten mit TBST gewaschen. Im letzten Schritt wurden die Glasplättchen mit einem Tropfen Fluoromount C auf einem Objektträger fixiert und mit einem Zeiss Axiovert Fluoreszenzmikroskop, das mit einer CCD Kamera (ORCA II) verbunden war, ausgewertet. Für die Immunzytochemie verwendete Antikörper:

| Primär-Antikörper | Verdünnung | Hersteller |
|---|---|---|
| Nitrotyrosine (ab7048) | 1:50 | Abcam (Cambridge, UK) |
| Thioredoxin | 1:200 | AbD Serotec (UK) |
| Thioredoxin Reduktase | 1:200 | Santa Cruz, USA |

| Sekundär-Antikörper | Verdünnung | Hersteller |
|---|---|---|

| | | |
|---|---|---|
| Alexa Fluor 488 | 1:1000 | Invitrogen, Karlsruhe |

## 2.14 Immunhistochemie

Hierfür wurde der „Labelled StreptAvidin Biotin- (LSAB) Kit“ von DAKO verwendet. Diese Methode weist eine bis zu achtfach gesteigerte Sensitivität gegenüber der ABC-Methode auf. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten Brückenantikörper gefolgt vom Streptavidin-Peroxidase-Konjugat. Der Färbevorgang wurde durch Inkubation mit einer Substrat-Chromogenlösung (hier DAB: 3’,3’-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid) beendet.

Der LSAB-Kit von DAKO wurde nach Angaben des Herstellers angewandt. Folgende Reagenzien wurden von DAKO eingesetzt:

| | |
|---|---|
| Blocken der endogene Avidin-Bindungsaktivität: | Biotin Blocking System |
| Blocken der endogenen Peroxidase: | Peroxidase Blocking Reagenz |
| Absättigen unspezifischer Bindungsstellen: | Protein Block Serum-free |
| Antikörperverdünnungsmedium: | Antibody Diluent |
| Substrat-Chromogen: | DAB Chromogen Tabletten |

**Paraffinschnitte:**

- 5 mm dicke Paraffinschnitte herstellen und auf silanisierte Objektträger aufziehen
- Entparaffiniert und Rehydriert:
  2x 5 min in Xylol entparaffinieren
  3 min in 100% Ethanol tauchen
  3 min in 96% Ethanol tauchen
  3 min in 70%Ethanol tauchen
  kurz in destilliertem Wasser waschen
- Antigendemaskierung:
  Schnitte 5x 5 min in 10 mM NaCitratpuffer (pH 6,0) bei 600 Watt in der Mikrowelle kochen, auf RT abkühlen lassen (15 min); waschen mit PBS und nach Aufziehen auf Coverplates (Shandon)
  Beginn der Färbung laut Angaben des Herstellers (LSAB+ Kit, DAKO)

- Fixieren der Parafinschnitte in Aceton (-20°C) für 10 min und bei RT trocknen lassen
- Spülen in PBS
- Blocken der unspezifischen Bindungsstellen: 15 min mit Protein-Block Serum free (DAKO)
- Inkubation mit Primär-Antikörper für 1 Std. bei RT verdünnt in Antikörperverdünnungsmedium (DAKO)
- Spülen mit 2 ml PBS
- Inkubation mit Sekundär-Antikörper für 30 min bei RT verdünnt in Antikörperverdünnungsmedium (DAKO) (abdunkeln)
- Als Negativkontrolle muß immer ein Schnitt mitgeführt werden, der nur mit dem Sekundär-Antikörper und nicht mit dem Primär-Antikörper inkubiert wird
- Spülen mit 2 ml PBS
- Eindecken in Fluorescent Mounting Medium (DAKO) und dunkel bei 4°C lagern
- Auswertung

| Primär-Antikörper | Verdünnung | Hersteller |
|---|---|---|
| Nitrotyrosine (ab7048) | 1:50 | Abcam (Cambridge, UK) |
| iNOS (ab15323) | 1:25 | Abcam (Cambridge, UK) |

## 2.15 Quantifizierung des Zelltodes durch Apoptose

Zur Quantifizierung der Apoptose-induzierenden Wirkung des NO-Donors SNOC, des Hitze-Schocks und des Thioredoxin-Reduktase (Trx-R)-Inhibitors Auranofin wurden die Zellen mit dem an die DNA bindenden Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid (DAPI) (Invitrogen) gefärbt. DAPI ist ein DNA-spezifischer Fluoreszenz-Farbstoff, der nach Bindung an DNA fluoresziert. Zuerst wurden ca. $10^5$ Zellen in die Vertiefungen einer 6 well Kulturplatte gegeben und die Zellen bis zur Subkonfluenz kultiviert. Danach wurden sie mit unterschiedlichen Konzentrationen und über unterschiedliche Intervalle mit den Reagenzien behandelt. Nach einem Mediumswechsel wurden die Zellen einer DAPI-Färbung unterzogen. Dafür wurden die Zellen für 10 Minuten in DAPI-Färbelösung (Verdünnung: 1/500 in McIlvaine-Puffer) inkubiert und anschließend für weitere 30 Minuten mit TBST gewaschen. Im letzten Schritt wurden die Glasplättchen

mit einem Tropfen Fluoromount C auf einem Objektträger fixiert und mit einem Zeiss Axiovert Fluoreszenzmikroskop, das mit einer CCD Kamera (ORCA II) ausgestattet war, untersucht. Es wurden mindestens 100 Zellen aus jeweils nebeneinander liegenden Gesichtsfeldern ausgezählt. Alle Zellkerne wurden nach den morphologisch-apoptotischen Kriterien wie Kernfragmentierung analysiert.

### 2.16 Nachweis von intrazellulären $Zn^{2+}$-Ionen

Jeweils $10^5$ HDF wurden in die Vertiefungen einer 6 well Kulturplatte gegeben. Vor Erreichen der Konfluenz wurde das Kulturmedium gewechselt und die Zellen mit 10 µM Zinquin in 1 ml Kulturmedium für 25 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. Parallel wurden Phasenkontrast-Bilder zur Darstellung der Zellen angefertigt.

### 2.17 Hitze-Schock-Methode

Das Prinzip der Hitze-Schock-Methode ist es, Zellen die normalerweise bei 37°C kultiviert werden, für bestimmte Zeiträume einer höheren Temperatur auszusetzen. Humane dermale Fibroblasten (HDF) wurden mit Hitze-Shock (HS) behandelt. Dazu wurden die Zellen in Schalen auf 25mm-Glasdeckplättchen kultiviert, so dass nach etwa 80-90%iger Konfluenz eine Behandlung mit einen HS möglich war. Die in den Schalen kultivierten Zellen wurden vor Beginn der HS-Exposition einmal mit Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Formulation (DPBS) + 1 mM Glukose gewaschen und schließlich für die Zeit der Behandlung darin inkubiert. Versuche, die Zellen während der HS-Exposition mit DMEM-Medium zu inkubieren, zeigten im Hinblick auf die Zinkfreisetzung kein anderes Ergebnis, trotzdem wurde die Inkubation DPBS + 1 mM Glukose vorgezogen, da DPBS im Gegensatz zu DMEM pH-Wert-Schwankungen (aufgrund seiner Pufferfunktion) besser abpuffern kann und damit zusätzlich unnötiger Stress für die Zellen verhindert wurde.

Der HS wurde in einem Inkubator, der auf die gewünschte Temperaturen eingestellt werden konnte, erzeugt. Da der Inkubator keinen 5%igen $CO_2$-Gehalt erzeugen konnte, wurden die Schalen mit Parafilm isoliert. Die Isolierung mittels Parafilm wurde auch bei den Kontroll-Schalen angewandt. So konnte gewährleistet werden, dass die Zellen

den selben Bedingungen ausgesetzt wurden wie die mit HS behandelten Zellen und die Kulturbedingungen sich nur in Bezug auf die Temperatur änderten. Auch hier zeigten Versuche ohne Parafilm-Isolierung im Hinblick auf die Zinkfreisetzung kein anderes Ergebnis. Dadurch wurde diese Prozedur beibehalten, um nicht-sichtbare Effekte auf die Zellen auszuschließen. Die Zellen wurden im Inkubator, der mindestens eine Stunde vorher auf die gewünschte Temperatur vorgeheizt wurde, über einen bestimmten Zeitraum mit dem HS behandelt. Die Temparatur des Kulturmediums wurde mittels Messfühler kontrolliert. Nach der HS-Behandlung, die verschiedene Zeiträume (15 min, 30 min, 1 Std. usw.) und Temperaturen (37-50°C) umfasste, wurde die Parafilm-Isolierung von den Schalen entfernt, die Zellen einmal mit DPBS + 1 mM Glukose gewaschen und wieder ins DMEM-Medium überführt.

## 2.18 Thioredoxin-Reduktase-Assay

Der Assay zur Bestimmung der Thioredoxin-Reduktase (Trx-R)-Aktivität basiert auf einer Thioredoxin-gekoppelten Reduktion von Insulin (siehe Reaktionsgleichung). Die dabei gebildeten freien Sulfylhydrylgruppen des Insulins reduzieren anschließend DTNB zum gelb gefärbten TNB (Arnér *et al*., 1999).

*Reaktionsgleichung:*

$$\text{Trx-(SH)}_2 + \text{Insulin-S}_2 \rightarrow \text{Trx-S}_2 + \text{Insulin-(SH)}_2 \qquad (1)$$

$$\text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{Trx -S}_2 \xrightarrow{\text{Trx-R}} \text{NADP}^+ + \text{Trx-(SH)}_2 \qquad (2)$$

$$\text{Insulin-(SH)}_2 + \text{DTNB} \rightarrow \text{Insulin-S}_2 + \text{TNB} \qquad (3)$$

Als Trx-R-Assaypuffer wurde ein Mastermix aus 200 µl HEPES-Puffer (1 M, pH 7,6), 40 µl EDTA (0,2 M), 40 µl NADPH (40 mM) und 500 µl Insulin (10 µg/ml) vorbereitet. Um die Reaktion zu starten, wurden 40 µl Trx-R-Assaypuffer zu 70 µl Fibroblasten-Lysat und 10 µl Thioredoxin (60 µM) pipettiert und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 500 µl 1 mM DTNB/6 M Guanidin Hydrochloride in 0,2 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) hinzugegeben, um die Reaktion zu

stoppen. Das gelb gefärbte Endprodukt (TNB) der Reaktion wurde photometrisch bei 412 nm gemessen. Die Trx-R-Aktivität wurde unter Verwendung des Extinktinskoeffizienten für TNB bei 412 nm ($\varepsilon$ = 13.6 $mM^{-1}$ x $cm^{-1}$) berechnet. Zur Berechnung der spezifischen Enzymaktivität von TR im Zell-Lysat wurde zusätzlich die Proteinkonzentration des Lysats bestimmt.

Trx-R-Lysepuffer: 1 M Hepes, pH 7,6, 0,2 M EDTA, 40 mM NADPH

**2.19 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)**

Mit der EMSA-Methode kann die Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren an DNA-Konsensussequenzen innerhalb von Promotoregionen gemessen werden. Hierzu werden Kernproteinextrakte mit Biotin-markierten Konsensus-Oligonukleotiden inkubiert, die entstandenen Protein-Oligonukleotid-Komplexe mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt.

Folgende Oligonukleotide wurden von Sigma-Genosys synthesiert und für die Androgen-Response-Element (ARE)-DNA-Bindungsaktivität verwendet:

| Bindungssequenz | Sequenz der Oligonukleotide | Hersteller |
|---|---|---|
| ARE | 5´- AGCTTAGAACACA GTGTTCTCTAGAG- 3´<br>3´- ATCTTGTGTCACAA GAGATCTCCTAG-5´ | Sigma-Genosys, Steinheim |

Annealing Ansatz: 20 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 200 fmol ARE1, 200 fmol ARE2

Der Ansatz wurde nun für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

Jeweils 0,5 µg Kernextrakten wurden in EMSA-Bindungspuffer in Anwesenheit von 200 fmol biotinyliertem Oligonukleotid für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Nukleotid/Protein-Komplexe wurden anschließend auf einem 6%igen nativen Polyacrylamid-Gel bei 100 V und RT mir einer Laufzeit von 2,5 Stunden von restlichen Proteinen und freiem Oligonukleotid getrennt.

EMSA-Bindungspuffer: 5% Glycerol, 10 mM HEPES KOH pH 7.9, 30 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 0,5µg poly(dI-dC)

6%iges EMSA-Gel: 5 ml Acrylamidlösung (rotiphorese Gel 40, Roth, Karlsruhe), 1 ml 10x TBE-Puffer, 34 ml Aqua dest., 400 µl APS (10% in Aqua dest.), 40 µl TEMED, 10x TBE-Pufer: 108 g Tris, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA, ad 1 l mit Aqua dest.

Für die Supershift-Experimente wurden 0,5 µg Kernextrakt mit 2 µg Supershift-Antikörper (anti-Androgen-Rezeptor-Antikörper) für 15 Minuten bei RT vorinkubiert und des Extrakt wie oben geschrieben weiterverarbeitet. Die Protein-Oligonukleotid-Komplexe wurden nach der Gelelektrophorese auf eine Nylonmembran (Hybond, Amersham, Freiburg) überführt. Die überführten Protein-Oligonukleotid-Komplexe wurden für 10 Minuten durch UV-Licht (120 mJ/cm$^2$) vernetzt. Anschließend wurden die Bindungskomplexe mittels Light-Shift Chemiluminescent EMSA Kit (Pierce Biotechnologie, Rockford, IL, USA) dedektiert.
Die Membran wurde in Folie eingeschweißt und mit einem Bio-Max-Film in einer Filmkassette platziert. Der Film wurde etwa zwei Minuten exponiert und anschließend in der Dunkelkammer entwickelt und fixiert. Densitometrische Analysen der Western Blots wurden mit Hilfe einer Scion Image Software durchgeführt.

## 2.20 Atomabsorptionsspektrometrie

Die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) ist eine bewährte und schnelle Methode zur quantitativen Analyse vieler Elemente (z.B. von Metallen, Halbmetalle etc.) in an Lösungen. Eine Lichtquelle emittiert Licht verschiedener Wellenlängen mit einer bestimmten Intensität. Im Strahlengang befindet sich eine Atomisierungseinheit, in der die Bestandteile einer zu untersuchenden Probe atomisiert, d.h. in einzelne, anregbare Atome überführt werden. Die Atomisierung der Elemente erfolgt durch schnelles, starkes Erhitzen (elektrisch in einem Graphitrohr), in das zuvor eine geringe Menge der Lösung hineingegeben wurde. Nach Schwächung des Lichtstrahls in der Atomwolke (Absorption) wird seine Intensität hinter der Atomisierungseinheit gemessen und mit der Intensität des ungeschwächten Lichtes verglichen. Es wird detektiert, wieviel des eingestrahlten Lichtes einer bestimmten Wellenlänge durch das zu messende Element absorbiert wurde. Für die Untersuchungen wurde 10 ml HDF-Zellkulturüberstand in ein Graphitrohrofen gebracht und in mehreren Schritten erhitzt. Anschließend maß das Programm den Zinkgehalt der Lösung. Diese Messungen wurden von Herr Dr. Erich

Jermann von Institut für umweltmedizinische Forschung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

### 2.21 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.

# 3. Ergebnisse

## 3.1 iNOS- und Nitrotyrosin-Nachweis in Prostata-Krebs-Biopsien

Eine erhöhte iNOS-Proteinexpression wurde sowohl bei chronisch-inflammatorischen Krankheiten als auch bei vielen Krebsarten, einschließlich dem Prostatakarzinom, nachgewiesen. Die erhöhte iNOS-Expression bewirkt eine Erhöhung der NO-Produktion, die zu nitrosativem Stress führt. Von untersuchten Prostatakarzinom-Proben zeigten etwa 80-100% eine erhöhte iNOS-Expression (Klotz *et al.*, 1998), dies ist vor allem bei fortgeschrittenen und metastasierenden Tumoren zu beobachten. Die Überproduktion von NO bewirkt eine Nitrotyrosin-Bildung in Proteinen (Kröncke *et al.* 2000). Um eine mögliche Nitrotyrosin-Bildung zu untersuchen, wurden Prostatatumor-Gewebeproben von fünf verschiedenen Patienten, die nicht mit einer Anti-Androgen-Therapie behandelt worden waren, untersucht.

Mit Hilfe der immunhistochemischen Methode wurde in allen Proben eine iNOS-Expression nachgewiesen (Abb. 3 A), parallel dazu wurde in allen Prostatatumor-Geweben auch Nitrotyrosine als Maß für eine erhöhte iNOS-Aktivität gefunden (Abb. 3 B). Dabei zeigt sich, dass die Intensität der iNOS-Expression mit der Nitrotyrosin-Färbung korreliert. Um artifizielle Färbungen auszuschließen, wurden die Gewebe auch ohne Primär-Antikörper gefärbt. Hierbei zeigte sich keine spezifische iNOS oder Nitrotyrosin-Färbung (Abb. 3 C + 3 D).

Diese Ergebnisse zeigten, dass in humanem Prostatatumor-Gewebe eine erhöhte iNOS-Expression und -Aktivität zu finden ist, die zu nitrosativem Stress führt. Die dadurch entstehende Überproduktion von NO bewirkt eine massive Nitrotyrosin-Bildung.

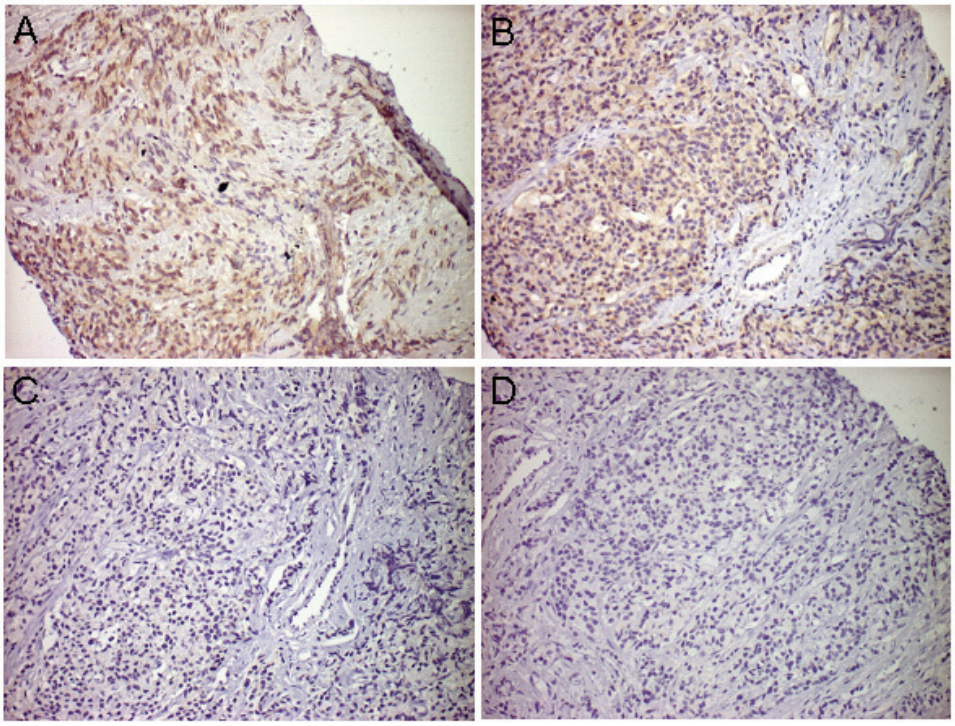



**Abbildung 3: Immunhistochemische Analyse der iNOS-Expression und der Nitrotyrosin-Bildung in Prostatatumor-Biopsien**

Prostatatumor-Gewebe: iNOS Expression **(A)** und Nitrotyrosin-Bildung, ein Marker für nitrosativen Stress **(B)**, sind deutlich zu erkennen. Zur Kontrolle wurden die Schnitte mit der gleichen Methode ohne Primär-Antikörper (iNOS und Nitrotyrosine) behandelt **(C, D)**. Gezeigt sind 200-fach vergrößerte Gewebeschnitte. Gezeigt wird eine von fünf gefärbten Biopsien mit gleichen Ergebniss.

## 3.2 Wirkung von nitrosativem Stress auf Prostatakarzinom-Zellen

Als nächstes wurde untersucht, ob die in Prostatatumor-Gewebe gefundene Nitrotyrosin-Bildung auch *in vitro* gefunden wird. Da humane Prostatatumor-Zelllinie *in vitro* keine iNOS exprimieren, werden die Zellen mit dem langsam wirkenden NO-Donor DETA/NO (Halbwertszeit ca. 7-8 Stunden bei 37°C) behandelt. Prostatakarzinom-Zellen (22RV1) wurden für 6 Stunden mit der nicht-toxischen Konzentration von 400 µM DETA/NO inkubiert. Immunzytochemische Analysen zeigten eine intrazelluläre Nitrotyrosin-Färbung (Abb. 4 B). Zum Vergleich werden unbehandelte Zellen gezeigt (Abb. 4 A) bzw. Prostatakarzinom-Zellen, die mit 400 µM DETA (ohne NO) inkubiert wurden (Abb. 4 C). In beiden Fällen war keine Nitrotyrosin-Färbung zu beobachten. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch DETA/NO erzeugter nitrosativer Stress eine deutliche intrazelluläre Nitrotyrosin-Bildung in Prostatakarzinom-Zellen (22RV1) bewirkt.

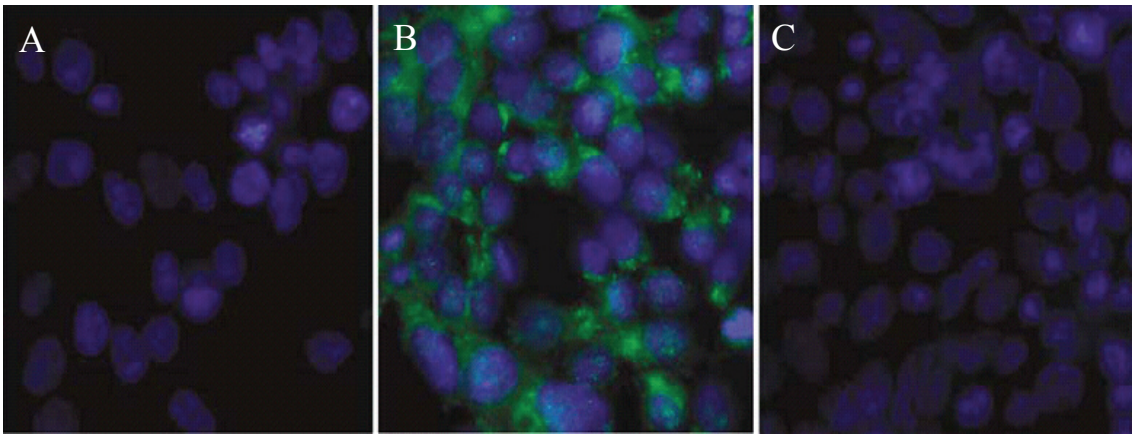



**Abbildung 4: Immunzytochemischer Nachweis von Nitrotyrosinen nach DETA/NO-Behandlung in Prostatakarzinom-Zellen**

Prostatakarzinom-Zellen (22RV1) wurden für 6 Stunden mit 400 µM DETA/NO inkubiert. Anschließend wurde mittels immunzytochemischer Analyse intrazelluläres Nitrotyrosin nachgewiesen (**B**). Als Kontrolle wurden unbehandelte (**A**) bzw. mit 400 µM DETA behandelte Zellen (**C**) gefärbt. Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren eines von drei unabhängigen Experimenten.

## 3.3 Hemmung der DNA-Bindungsaktivitäts des Androgen-Rezeptors durch nitrosativen Stress

Ein Effekt einer erhöhten NO-Konzentration ist die Hemmung der DNA-Bindungsaktivität von Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren (z.B. 1α,25-Dihydroxy-Vitamin D3-Rezeptor, Retinoid-X-Rezeptor und der Östrogen-Rezeptor α) (Kröncke & Carlberg, 2000; Gaban *et.al*., 2005). Der hemmende Effekt von NO wird durch eine S-Nitrosierung von Cystein-Resten bewirkt, wodurch die Zinkfinger-Strukturen zerstört werden und die DNA-Bindungsaktivität gehemmt wird (Kröncke *et al.,* 1994; Berendji *et al*., 1999). Der Androgen-Rezeptor (AR) hat zwei $Cys_4$-Type Zinkfinger-Strukturen, diese binden an das Androgen-Response-Element (ARE) von Androgen-Response-Genen, z.B. Probasin, Prostata-spezifisches-Antigen etc. Es sollte nun die DNA-Bindungsaktivität des Androgen-Rezeptors nach nitrosativem Stress mit Hilfe der Gel-Shift-Methode (EMSA) untersucht werden.

Prostatakarzinom-Zellen 22RV1 wurden in Abwesenheit und in Anwesenheit von 10 nM künstlichem Androgenhormon (R1881) mit verschiedenen Konzentrationen von DETA/NO (0-400 µM) für 30 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die nukleären Extrakte isoliert und die Bindungsaktivität des AR an das ARE untersucht. R1881

induziert die Bindung des AR an das ARE. Deswegen wurde in den Zellen, die nicht mit dem künstlichen Androgen-Hormon inkubiert worden waren, keine Bindungsaktivität gefunden (Abb. 5 A, Probe 1). Bei den mit dem Hormon behandelten Zellen wurde dagegen ein Bindungsaktivität gefunden, die durch DETA/NO konzentrationsabhängig gehemmt wurde. Eine Konzentration von 400 µM DETA/NO führte zu einer mehr als 90%igen Hemmung der Bindungsaktivität (Abb. 5 A, Probe 6). Zum Vergleich wurden mit 400 µM DETA behandelte Prostatakarzinom-Zellen untersucht, bei denen jedoch kein Effekt auf die Bindungsaktivität des AR zu sehen war (Abb. 5 A, Probe 7).

Um die Spezifität der AR-Bindung nachzuweisen, wurden Supershift-Experimente durchgeführt. 22RV1-Kernextrakte wurden mit anti-AR-Antikörper (AK) vorinkubiert. Der AK erkennt den N-Terminus (DNA-Bindungs-Domäne) und verhindert die DNA-Bindungs-Aktivität des AR (Abb. 5 B, Probe 3). Als zusätzliche Kontrolle wurden 22RV1-Kernextrakte mit 200-fachem Überschuss von nicht-biotinylierten ARE vorinkubiert, danach erfolgte die Inkubation mit biotinylierten ARE. Die AR-Bindungsaktivität wurde durch diese Vorinkubation gesättigt, deswegen wurde keine sichtbare Bindungsaktivität beobachtet (Abb. 5 Probe 4). Diese Kontrollen zeigten, dass die gebundene DNA-Bindung spezifisch bei dem AR sind.

Um einen direkten NO-Effekt auf die AR-Bindungsaktivität zu untersuchen, wurden 22RV1-Kernextrakte, die aus 30 Stunden mit R1881 behandelten 22RV1-Zellen isoliert worden waren, mit steigenden Konzentrationen des schnell NO-freisetzenden NO-Donors DEA/NO (Halbwertszeit bei Raumtemparatur ca. 16 min) (Keefer *et al*., 1996) behandelt. Die Gel-Shift-Analyse zeigte, dass DEA/NO konzentrationsabhängig eine Abnahme der AR-Bindungsaktivität bewirkt. Eine Konzentration von 500 µM DEA/NO bewirkte eine mehr als 90%ige Hemmung der AR-Bindungsaktivität (Abb. 5 C, Probe 6). Als Negativ-Kontrolle wurden Kernextrakte mit 500 µM denitrosiertem DEA/NO ($DEA/NO_{-NO}$) inkubiert, wobei jedoch kein Wirkung auf die AR-Bindungsaktivität zu sehen war (Abb. 5 C Probe 7).

Diese Ergebnisse zeigten, dass NO die DNA-Bindungsaktivität, des Androgen-Rezeptors konzentrationsabhängig hemmt.

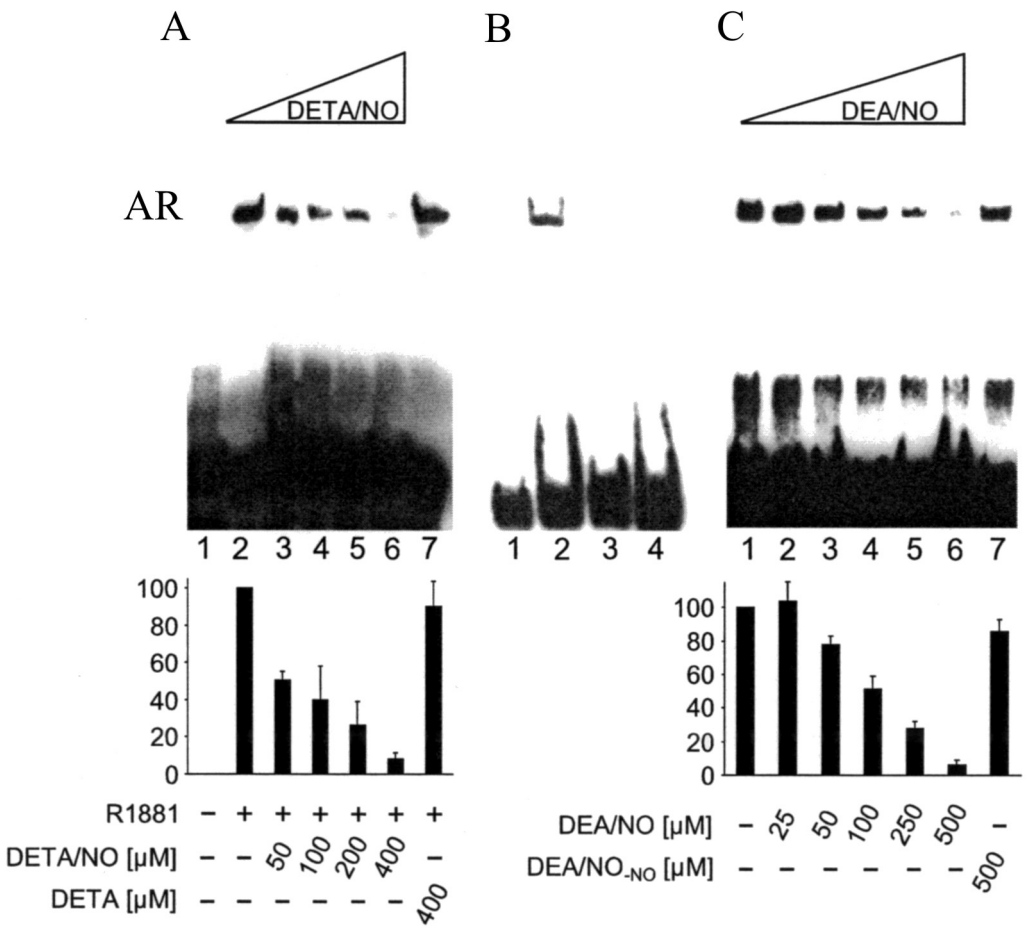



**Abbildung 5: Hemmung der DNA-Bindugsaktivität des AR durch NO**

**A)** Prostatakarzinom-Zellen wurden in Abwesenheit (1) oder in Anwesenheit von 10 nM R1881 und steigenden Konzentrationen von DETA/NO (2-6) bzw. DETA (7) behandelt. Nach einer 30- stündigen Inkubation wurden die Kernextrakte isoliert und mittels EMSA untersucht. **B)** Super-Shift: ARE (1), ARE mit 22RV1 Kernextrakten (2), Kernextrakte vorinkubiert mit anti-AR-Antikörper (3) und mit 200-fachem Überschuss von nicht-biotinylierten Oligonukleotiden (4) **C)** Aus 30 Stunden mit R1881 behandelten 22RV1-Zellen hergestellte Kernextrakte wurden *in vitro* mit DEA/NO (1-6) bzw. $DEA/NO_{-NO}$ behandelt (7). Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren eines von drei unabhängigen Experimenten.

### 3.4 Wirkung von nitrosativem Stress auf die intrazelluläre Zinkhomöostase

Die Wirkungen von nitrosativem Stress auf Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren wurde in Gel-Shift-Experimenten gezeigt (Abb. 5). Eine anderer Effekt von nitrosativem Stress ist die Wirkung auf die intrazelluläre Zinkhomöostase. Es ist bereits bekannt, dass exogen in Form von NO-Donoren zugeführtes NO zu einer $Zn^{2+}$-Freisetzung vorwiegend im Zytoplasma von Zellen führt (Berendji *et al.*, 1997). Es besteht die Vermutung, dass diese Zink-Ionen aus Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren stammen

(Kröncke & Carlberg, 2000), da gezeigt werden konnte, dass NO *in vitro* mittels S-Nitrosierung $Zn^{2+}$ aus dem Zink-komplexierenden Protein Metallothionein freisetzt (Kröncke *et al.*, 1994). Ein wesentliches Werkzeug für diese Studien war das Zink-spezifische Zinquin. Bei Zinquin handelt es sich um ein Fluorophor, welches hochspezifisch an freies Zink bindet (Zalewski *et al.*, 1993). Nach spezifischer Bindung von $Zn^{2+}$ und Anregung mit UV-Licht wird Zinquin stark fluoreszenzaktiv und kann deshalb genutzt werden, um eine NO-induzierte Änderung von freien intrazellulären $Zn^{2+}$-Konzentrationen zu detektieren. Die Affinität von Zinquin zu $Zn^{2+}$ reicht jedoch nicht aus, um $Zn^{2+}$ aus Zinkfinger-Strukturen von Proteinen herauszulösen (Fahrni *et.al*. 1999; Snitsarev *et al.*, 2001).

Es wurde bereits gezeigt, dass durch S-Nitrosocystein (SNOC) entstehender nitrosativer Stress eine intrazelluläre Zinkfreisetzung in L929 Zellen (Maus Fibroblasten) verursacht (Berendji *et al.,* 1997). Um zu untersuchen, ob nitrosativer Stress auch in Prostatakarzinom-Zellen 22RV1 eine intrazelluläre Zinkfreisetzung verursacht, wurden 22RV1 Zellen mit SNOC (Halbwertszeit bei Raumtemparatur ca. 25 Min) behandelt. Für die SNOC Versuche wurde die nicht toxische Konzentration von 1 mM SNOC verwendet. Zum Nachweis des intrazellulär freigesetzten Zinks wurden die Zellen danach für 25 min bei 37°C mit 10 µM Zinquin inkubiert. Die Untersuchungen mit 22RV1 Zellen zeigten sowohl in unbehandeltem Zustand als auch nach der NO-Behandlung eine starke Zinkfluoreszenz (Bilder nicht gezeigt). Dies zeigt, dass Prostatakarzinom-Zellen einen hohen Gehalt an freiem Zink besitzen und daher für diese Untersuchungen nicht geeignet sind. Deswegen wurden alternativ humane dermale Fibroblasten (HDF) untersucht.

Bei unbehandelten Zellen, die nur mit Zinquin gefärbt wurden, war eine diffuse, schwache Zinquinfluoreszenz in gesamten Zytoplasma zu erkennen. Nach 30 Minuten Inkubation mit 1 mM SNOC zeigte sich bei den HDF eine starke vorwiegend nukleäre Zinquinfluoreszenz, was auf eine hohe freie $Zn^{2+}$-Konzentration im Kern schließen lässt. Innerhalb des Zellkerns gab es oft runde Areale mit erhöhter Fluoreszenzintensität. Erst nach 8 bzw. 12 h zeigte sich kein Unterschied mehr zu unbehandelten Zellen (Abb. 6).

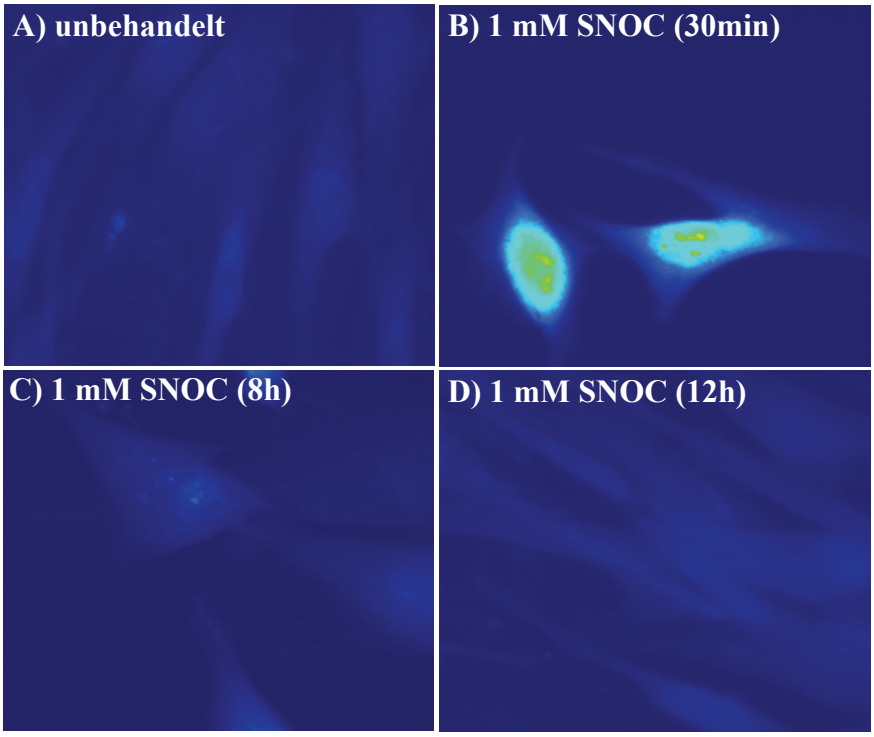



**Abbildung 6: Wirkung von nitrosativem Stress auf die intrazelluläre Zinkhomöostase**

Humane dermale Fibroblasten (HDF) wurden nach Inkubation mit 1 mM SNOC gewaschen und 25 min bei 37°C mit 10 µM Zinquin inkubiert. **A)** Bei unbehandelten HDF wurde keine Zinquinfluoreszens beobachtet. **B)** 30 Minuten nach der SNOC-Behandlung zeigten die mit Zinquin gefärbten Zellen eine starke vorwiegend nukleäre Zinquinfluoreszens. Nach 8 Stunden **(C)** bzw. 12 Stunden SNOC-Behandlung **(D)** zeigten mit Zinquin gefärbte Zellen keine Fluoreszens. Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren eines von drei unabhängigen Experimenten.

Um zu untersuchen, ob die Zellen dass frei gewordene intrazelluläre Zink exportieren wurde zusätzlich mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) freies Zink in Zellkulturüberständen gemessen. Die AAS ist eine bewährte und schnelle Methode zur quantitativen Analyse von Zink in Zellkulturüberständen. Dafür wurden die HDF in 10 cm Platten gezüchtet, nach 1 mM SNOC-Behandlung wurde 30 Minuten bzw. 12 Stunden später das Medium abgesaugt und in Graphitröhchen gefüllt. Anschließend wurde die Zinkkonzentrationen in den Zellkulturüberständen gemessen.

30 Minuten nach der SNOC-Behandlung wurde, verglichen mit unbehandelten Zellen eine 3-fache Erhöhung des Zinkgehalts im Zellkulturüberstand beobachtet. 12 Stunden nach der SNOC-Behandlung sank der Zinkgehalt jedoch wieder auf den Ursprungszustand. Die AAS-Messungen zeigten, dass eine NO-Behandlung einen vorübergehende intrazelluläre Zinkexport aus der Zelle verursacht (Abb. 7).

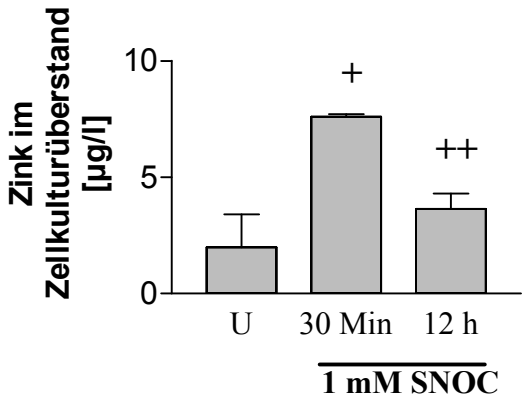



**Abbildung 7: Zinkmessungen im Zellüberstand mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)**

HDF wurden auf 10 cm Platten gezüchtet, nach mehr als 70% Konfluenz wurde mit 1 mM SNOC behandelt. Bei den 1 mM SNOC-behandelten Zellen wurde nach 30 Minuten bzw. 12 Stunden und bei den unbehandelten Zellen Medium abgesaugt und in Graphitröhren eingefüllt. Mit dem AAS-Spektrometer wurde freies Zink in mit Zellkulturüberständen gefüllten Graphitröhren gemessen.
Signifikanten waren verglichen mit unbehandelten Zellen + $p < 0{,}02$, ++ $p < 0{,}4$.
U = unbehandelte Zellen

Die Ergebnisse zeigten, dass nitrosativer Stress eine transiente intrazelluläre Zinkfreisetzung und einen Export von Zink bewirkt. Das freigesetzte Zink wird später von den Zellen wieder aufgenommen und vermutlich wieder in Proteine eingebaut. Diese Ergebnisse zeigten, dass HDF geeignet sind, eine intrazelluläre Zinkfreisetzung zu beobachten. Daher wurden HDF für alle weiteren Untersuchungen verwendet.

### 3.5 Wirkung von nitrosativem Stress auf die Lokalisation von Thioredoxin

Thioredoxin (Trx) ist eines der Hauptmitglieder des Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase-Reparatur-Systems. Es ist bekannt, dass unter nitrosativem (Haendeler *et al*., 2002; Arai *et al.*, 2006) und oxidativem Stress Trx vom Zytoplasma in den Zellkern transloziert wird und S-S-Gruppen von Proteinen (z.B. in NF-$_K$B) reduziert (Hirota *et al.*, 1999; Dider *et al.,* 2001). Die Wirkung von nitrosativem Stress auf die Trx wurde in dieser Arbeit bei HDF untersucht. Die HDF wurden auf Glasplättchen kultiviert, mit 1 mM SNOC behandelt und mit frischem Medium weiter inkubiert. Eine Stunde nach der SNOC-Behandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, anschließend wurde Trx immunzytochemisch nachgewiesen. Als primärer Antikörper (AK) wurde ein monoklonaler anti-Human-Trx-AK benutzt, welcher reduziertes Trx erkennt. Als sekundär-AK wurde anti-Maus Alexafluor A488 konjugierter AK, benutzt. Um die

Spezifität des Trx-AK nachzuweisen, wurden die Zellen parallel nur mit einem sekundären AK A488 gefärbt. Zur Kontrolle wurden auch unbehandelte Zellen mit dem Trx-AK gefärbt.

Bei den unbehandelten HDF zeigte sich eine schwache Fluoreszenz im Zytoplasma und im Zellkern im Vergleich zu mit SNOC-behandelten Zellen, die eine starke Fluoreszenz besonders in Kernbereich zeigten. Keine Färbung dagegen war bei den nur mit sekundärem AK gefärbten und SNOC-behandelten Zellen zu beobachten (Abb. 8).

Dies zeigt, dass nitrosativer Stress eine erhöhte Proteinexpression von reduziertem Trx bewirkt und das Trx in den Zellkern transloziert wird.

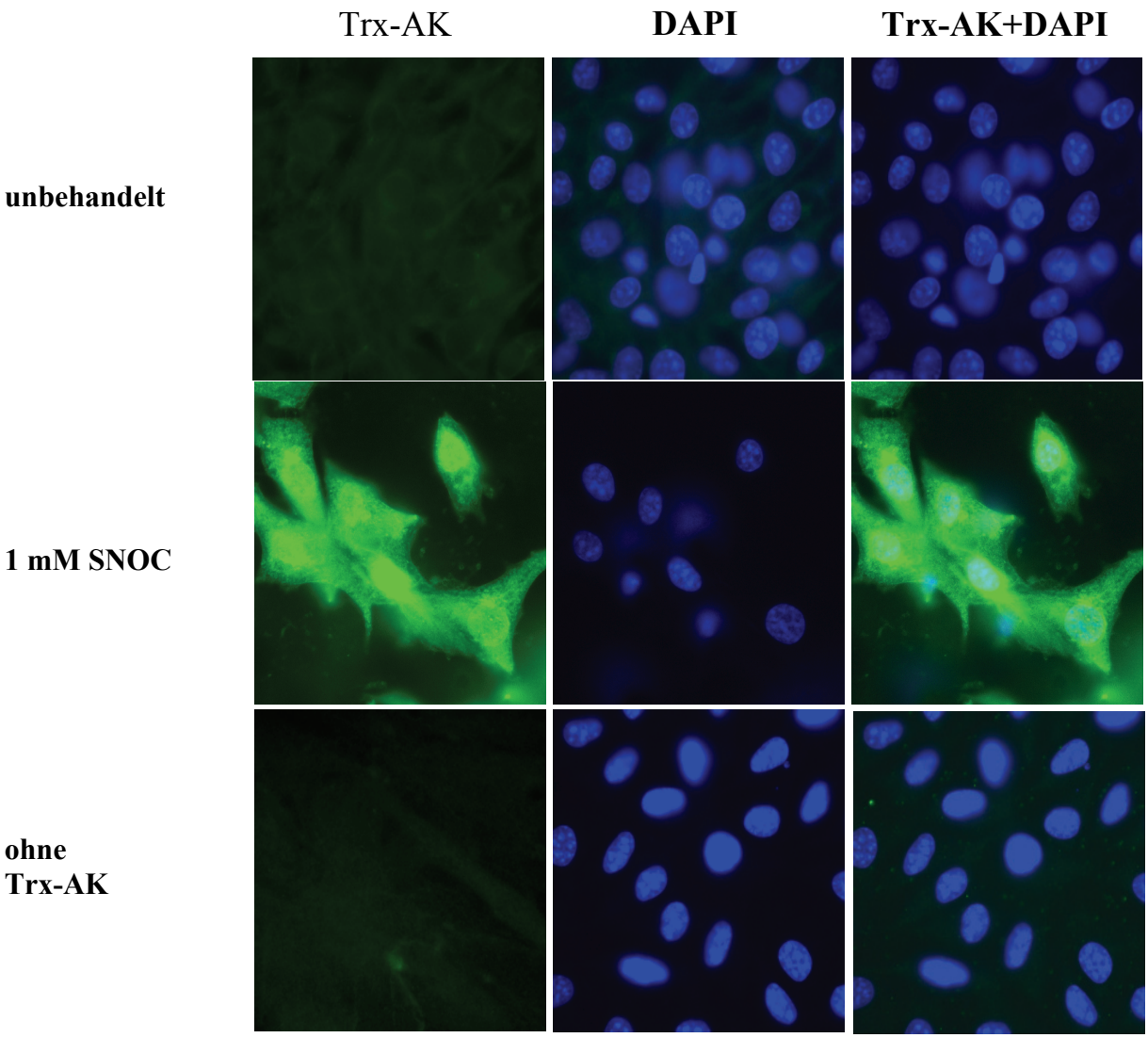


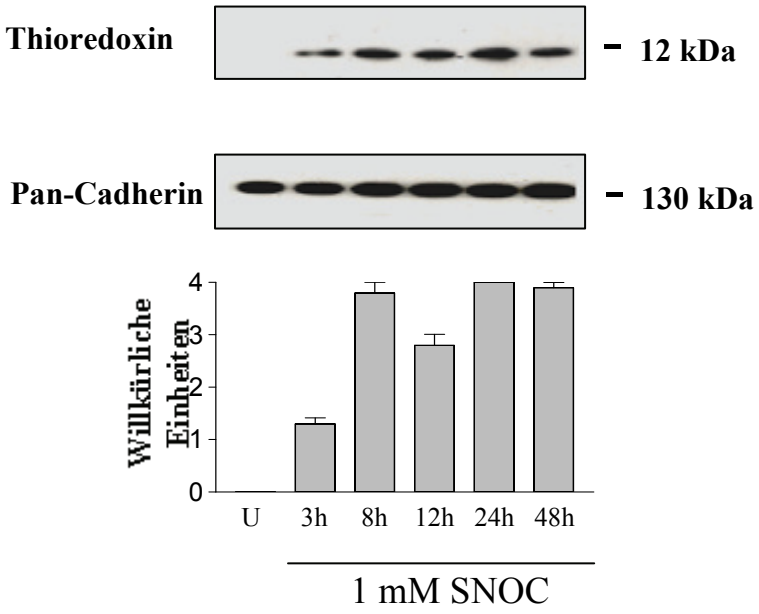

**Abbildung 8: Lokalisation von reduzierten Thioredoxin nach nitrosativen Stress**

HDF wurden mit 1 mM SNOC inkubiert und eine Stunde später mit Thioredoxin-AK behandelt. Die immunzytochemischen Ergebnisse zeigen die Thioredoxin-AK-Färbung und DAPI-gefärbte Zellkerne. Unbehandelte Zellen zeigten eine sehr schwache Thioredoxin-Färbung sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern. Eine starke Färbung besonders im Kern ist nach einer Stunde bei SNOC-behandelten Zellen zu beobachten. Als Negativkontrolle dienten SNOC-behandelte Zellen, die nur mit dem sekundär-AK gefärbt wurden; diese zeigten keine Fluoreszenz. Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren eines von drei unabhängigen Experimenten.

### 3.6 Wirkungen von nitrosativem Stress auf die Proteinexpression von reduziertem Thioredoxin

Nach den immunzytochemischen Versuchen wurde mit Hilfe der Western Blot-Analyse (WB) die Proteinexpression von reduziertem Trx untersucht. Die HDF wurden mit 1 mM SNOC inkubiert und anschließend 3-24 Stunden lang in frischem Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten lysiert. Für den Western Blot wurde 30 µg Protein benutzt. Als Primär-AK wurde ein anti-Human-Maus-Trx-Antikörper (1:250) verwendet, welcher reduziertes Trx erkennt, als sekundär-AK wurde anti-Maus-Kaninchen-HRP-Antikörper (1:2000) benutzt.
Die WB-Ergebnisse zeigten, dass sowohl in den Gesamtlysaten als auch in den Kernextrakten eine basale Trx-Proteinexpression durch den WB nicht nachzuweisen ist. Eine SNOC-Behandlung verursachte eine Erhöhung der Expression von reduziertem Trx, sowohl in den Gesamtlysaten (Abb. 9 A) als auch in den Kernextrakten (Abb. 9 B). Diese Versuche zeigten, dass nitrosativer Stress eine Erhöhung der Expression von reduziertem Trx in HDF-Zellen bewirkt.

A




B

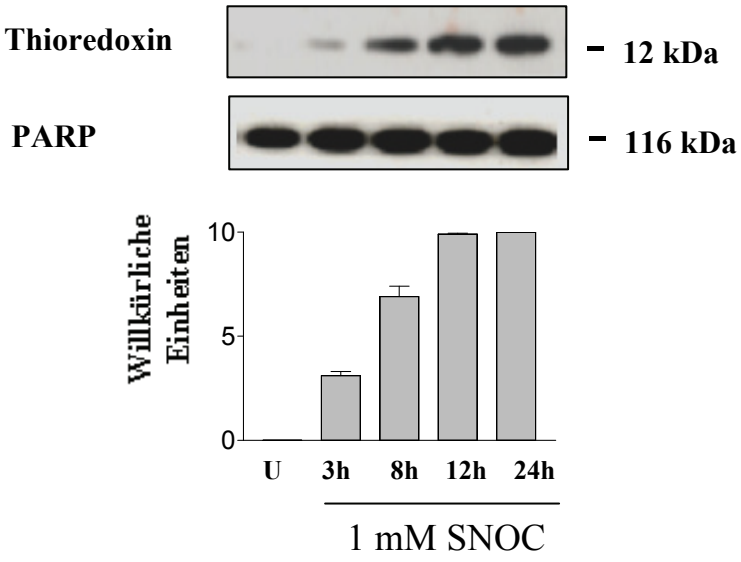



**Abbildung 9: Wirkungen von nitrosativem Stress auf die Proteinexpression von reduziertem Thioredoxin**

HDF wurden mit 1 mM SNOC behandelt. Gezeigt ist die Zunahme der durch 1 mM SNOC induzierten Thioredoxin-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Es wurde eine erhöhte Proteinexpression von reduzierten Trx zu unterschiedlichen Zeitpunkten in den Gesamtlysaten **(A)** sowie in den Kernextrakten **(B)** gefunden**.** Die gezeigten Western-Blot Ergebnisse repräsentieren einen von drei unabhängigen Versuchen. U = unbehandelte Zellen

## 3.7 Wirkungen von nitrosativem Stress auf die Lokalisation der Thioredoxin-Reduktase

Thioredoxin-Reduktase (Trx-R) ist das zweite Mitglied des Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase-Reparatur-Systems. In Kapital 3.5 wurde erwähnt, dass unter oxidativem Stress Thioredoxin (Trx) vom Zytoplasma in den Kern transloziert und dort S-S-Gruppen von Proteinen reduziert (Hirota *et al.*, 1999). Unter oxidativem Stress reduziert die Trx-R Trx. Dies führt dazu, dass reduziertes Trx in den Kern wandert, um dort oxidierte Proteine zu reduzieren (Mustacich *et al.*, 2000; Nordberg *et al.*, 2001). Die vorherigen Ergebnisse zeigten, dass nitrosativer Stress eine erhöhte Trx-Proteinexpression bewirkt und die Lokalisation von Trx beeinflußt. Deshalb wurde in den folgenden Experimenten die Wirkung von nitrosativem Stress auf die Trx-R untersucht.

Dafür wurden die HDF auf Glasplättchen kultiviert. Nach Inkubation mit 1 mM SNOC wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium weiter inkubiert. Anschließend wurde Trx-R eine Stunde nach der SNOC-Behandlung immunzytochemisch nachgewiesen. Als primärer Antikörper (AK) wurde ein monoklonaler anti-Human-Trx-R-AK benutzt. Als Sekundär-AK wurde anti-Maus-Alexafluor A488 konjugierter AK benutzt. Um die Spezifität des Trx-R-AK nachzuweisen, wurden die Zellen parallel nur mit dem sekundären AK A488 gefärbt. Zur Kontrolle wurden auch unbehandelte Zellen mit den Trx-R-AK gefärbt.

Beobachtet wurde kein Unterschied, ob Zellen unbehandelt waren oder mit 1 mM SNOC behandelt wurden bzw. nur mit den sekundären AK gefärbt werden (Abb. 10).

Aus diesen Ergebnisse lässt sich schlußfolgern, dass die SNOC-Behandlung keine Auswirkung auf die Thioredoxin-Reduktase-Expression bzw. –Translokation hatte.

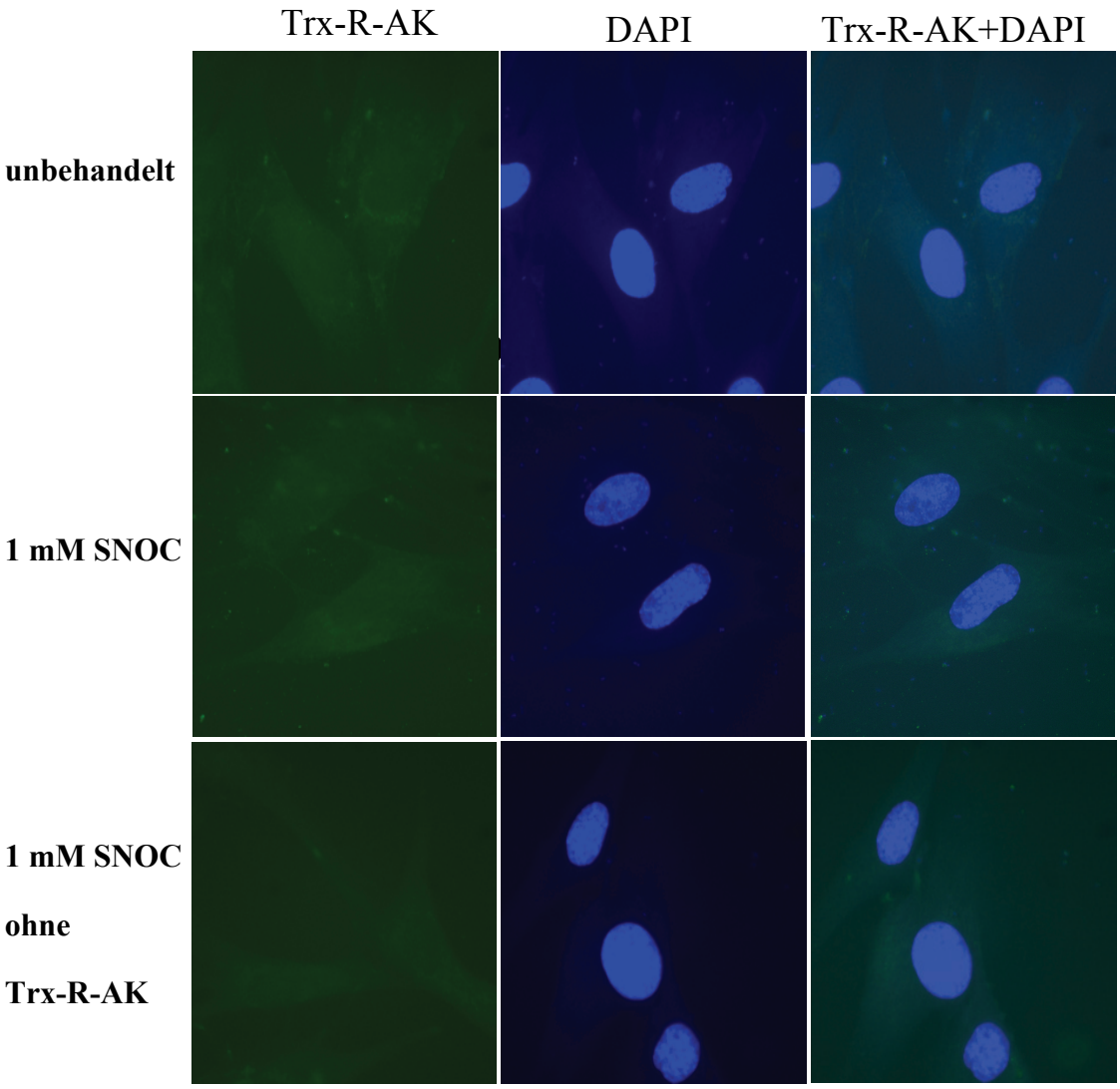



**Abbildung 10: Lokalisation der Thioredoxin-Reduktase nach nitrosativem Stress**

Nach SNOC-Behandlung wurde mittels immunzytochemischer Methode die Thioredoxin-Reduktase (Trx-R)-Lokalisation untersucht. Die Abbildung zeigt die Trx-R-AK-Färbung, DAPI-gefärbte Zellkerne und die Trx-R-AK- + DAPI-Färbung. Zellen, die eine Stunde nach der SNOC-Behandlung gefärbt wurden oder nur mit den sekundären AK gefärbt wurden, zeigten dieselbe leichte Hintergrund-Fluoreszenz. Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren eines von drei unabhängigen Experimenten.

### 3.8 Thioredoxin-Reduktase-Aktivität

Nach den immunzytochemischen Experimenten wurde die Trx-R-Aktivität von HDF untersucht. In neuronalen Zellen wurde gezeigt, dass die Trx-R-Aktivität durch Zugabe von 100 nM Selenit erhöht wird, eine Zugabe von 0,5 µM Auranofin dagegen eine Hemmung der Trx-R-Aktivität bewirkt (Grömer *et al*., 1998; Steinbrenner *et al*., 2006).

Die Zellen wurden in 10 cm-Zellkultur-Schalen gezüchtet. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von mehr als 70% erreicht hatten, wurden sie für weitere 24 Stunden mit Selenit und/oder mit steigenden Konzentrationen von Auranofin (0-1 µM) inkubiert. Für die Messungen wurden die Zellen lysiert und mit Hilfe eines Photometers bei 412 nm die Trx-R-Aktivität gemessen.

Abb. 11 zeigt, dass geringe Konzentrationen von Auranofin (0,01 und 0,1 µM) eine leichte Erhöhung der Trx-R Aktivität, höhere Konzentrationen (0,5 und 1 µM) jedoch eine sehr starke Hemmung der Trx-R-Aktivität nach 24 Stunden bewirken. Selenit bewirkt eine Erhöhung der Trx-R-Aktivität, diese ist durch 0,5 µM Auranofin ebenfalls hemmbar.

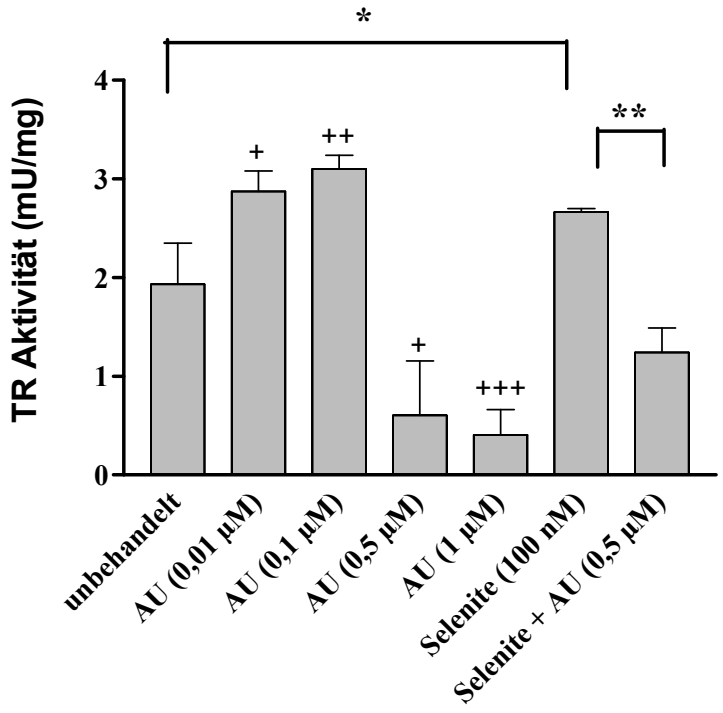



**Abbildung 11: Thioredoxin-Reduktase-Aktivität und Hemmung durch Auranofin**

HDF wurden mit steigenden Konzentrationen von Auranofin (AU) bzw. Selenit und Selenit + AU für 24 Stunden inkubiert. 0,01 und 0,1 µM Auranofin bewirkten eine leichte Erhöhung der Trx-R Aktivität, 0,5 µM und 1 µM Auranofin zeigten eine starke Hemmung der Trx-R-Aktivität. 100 nM Selenit-Supplementation erhöhte die Trx-R-Aktivität, während die 0,5 µM Auranofin-Behandelung eine Hemmung der durch Selenit-induzierten Trx-R-Aktivität bewirkte. Das gezeigte Ergebnisse repräsentiert eines von drei unabhängigen Experimenten. Unterschied zu den unbehandelten Zellen: + $p < 0,03$; ++ $p < 0,02$; +++ $p < 0,006$;
* $p < 0,04$; ** $p < 0,0006$.
AU = Auranofin

### 3.9 Thioredoxin-Reduktase Aktivität nach nitrosativem Stress

In dieser Versuchsreihe wurde die Trx-R Aktivität nach nitrosativem Stress untersucht und die Aktivität durch eine Auranofin-Behandlung gehemmt. Zuerst wurden mit SNOC behandelte bzw. unbehandelte Zellen einem Toxititäts-Test mit Auranofin unterzogen. HDF wurden in 10 cm Zellkultur-Schalen kultiviert. In der subkonfluenten Phase wurden die Zellen für 24 Stunden mit steigenden Konzentrationen (0,01- 10 µM) von Auranofin vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten mit 1 mM SNOC behandelt. SNOC-behandelte Zellen bzw. unbehandelte Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen (0,01 µM-10 µM) von Auranofin für 24 Stunden weiter kultiviert. Am Ende der Inkubation wurden die Proben mit DAPI behandelt und Zellen mit normal gefärbten Zellkern gezählt.
Es zeigte sich, dass 0,5 µM Auranofin in Gegenwart oder Abwesenheit von 1 mM SNOC untoxisch war, höhere Auranofin-Konzentrationen (ab 1 µM) jedoch eine deutliche Toxitität aufweisen (Abb. 12). Für die weiteren Versuche wurde daher eine Auranofin-Konzentration von 0,5 µM verwendet.

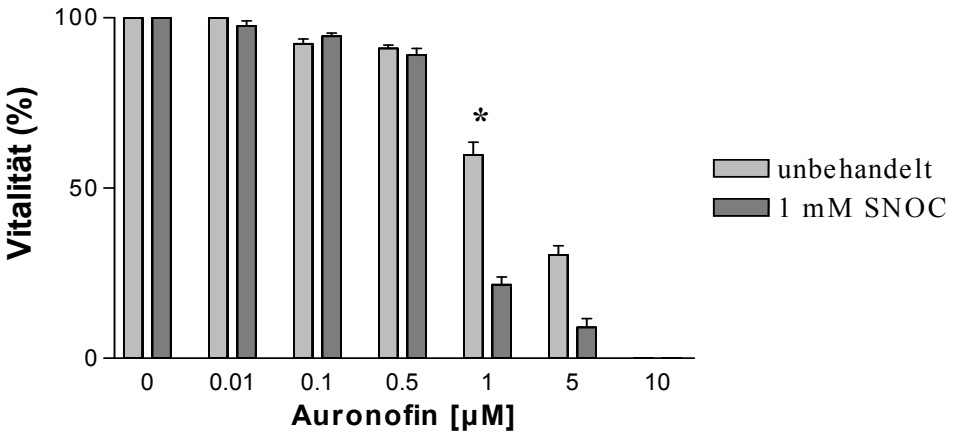



**Abbildung 12: Toxizitäts-Test**

Bestimmung der Vitalität von HDF nach 24 Stunden Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Auranofin (0-10 µM) bei unbehandelten bzw. mit 1 mM SNOC behandelten Zellen. Die Vitalität ist bezogen auf unbehandelte HDF. Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren eines von drei unabhängigen Experimenten.
Unterschied zu unbehandelten Zellen: * $p < 0{,}0004$

Nach Ermittlung der nicht-toxischen Auranofin-Konzentration wurde bei den SNOC-behandelten bzw. bei den mit SNOC + Auranofin behandelten HDF zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Trx-R-Aktivität gemessen. Durch eine SNOC-

Behandlung hervorgerufener nitrosativer Stress verursachte innerhalb von 24 Stunden eine etwa siebenfache Erhöhung der Trx-R Aktivität (von 2 mU/mg auf 15 mU/mg), diese wurde durch gleichzeitige Behandlung mit 0,5 µM Auranofin stark gehemmt (Abb. 13).

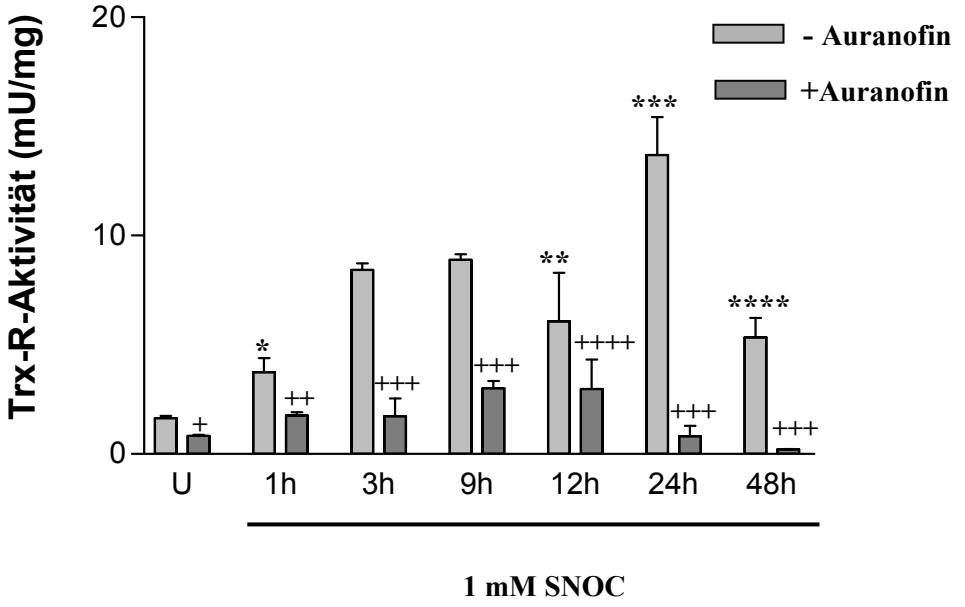



**Abbildung 13: Thioredoxin-Reduktase-Aktivität nach nitrosativem Stress und die Hemmung durch Auranofin**

HDF wurden mit 1 mM SNOC behandelt. Für die Hemmung der Trx-R Aktivität wurden Zellen mit 0,5 µM Auranofin vorinkubiert, anschließend mit 1 mM SNOC behandelt und mit Auranofin weiter inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Proben lysiert und anschließend die Trx-R-Aktivität gemessen. Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren eines von drei unabhängigen Experimenten.
Signifikanzen verglichen mit unbehandelten Zellen: * $p < 0{,}03$; ** $p < 0{,}1$; *** $p < 0{,}002$; **** $p < 0{,}01$; Verglichen mit +/- AU: + $p < 0{,}001$; ++ $p < 0{,}04$; +++ $p < 0{,}002$; ++++ $p < 0{,}03$
U = unbehandelte Zellen

## 3.10 Wirkungen von Auranofin auf die Proteinexpression von reduziertem Thioredoxin nach nitrosativem Stress

Nach oxidativem Stress verhindert eine Hemmung der Trx-R-Aktivität durch Auranofin die Reduktion von oxidiertem Trx zu reduzierten Trx (Grömer *et al.*, 1998; Hirota *et al.*, 1999). In Kapitel 3.6 wurde nach Behandlung mit 1 mM SNOC durch den WB-Methode eine erhöhte Proteinexpression von reduzierten Trx nachgewiesen. Nach

diesen Ergebnissen wurde die Wirkung von Auranofin auf die Proteinexpression von reduziertem Trx untersucht. Die HDF wurden mit 1 mM SNOC bzw. 1 mM SNOC + 0,5 µM Auranofin behandelt. Die Zellen wurden 12 und 24 Stunden nach der Behandlung mit SNOC bzw. SNOC + Auranofin lysiert und für den Western Blot je 30 µg Protein aufgetragen. Als primär-AK wurde der anti-Human-Maus-Trx-Antikörper (1:250) verwendet, als sekundär-AK anti-Maus-Kaninchen-HRP-Antikörper (1:2000) benutzt.

Die WB-Ergebnisse zeigten nach 12 und 24 Stunden, dass auch die durch 1 mM SNOC Behandlung erhöhte Proteinexpression von reduziertem Trx durch Hemmung der Trx-R Aktivität mit Auranofin erniedrigt ist (Abb. 14).

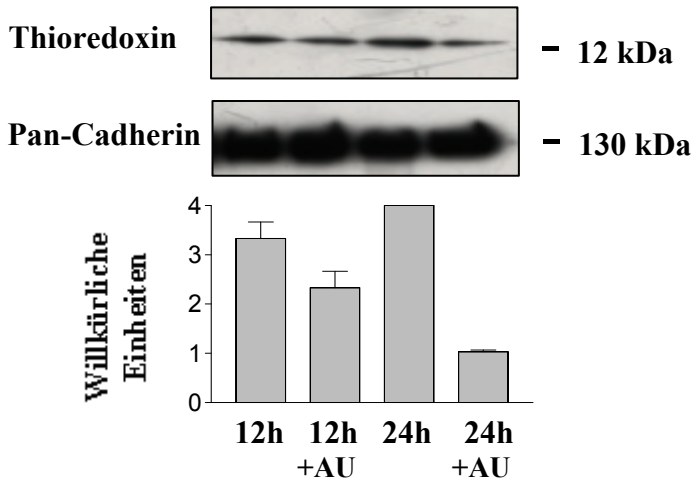



**Abbildung 14: Wirkungen von Auranofin auf die Proteinexpression von reduziertem Thioredoxin nach nitrosativem Stress**

HDF wurden mit 1 mM SNOC bzw. mit 1 mM SNOC + 0,5 µM Auranofin behandelt. Gezeigt ist, dass die durch 1 mM SNOC induzierte Expression von reduzierten Trx bei Auranofin Behandlung vermindert ist. Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren eines von drei unabhängigen Experimenten.
AU = Auranofin

## 3.11 Auranofin-Wirkung auf die Reversibilität der Zinkfreisetzung nach nitrosativem Stress

Eine Konzentration von 0,5 µM Auranofin verursacht bei SNOC-behandelten Zellen eine Hemmung der Trx-R-Aktivität (Abb. 13) und ernidrigte Proteinexpression von reduzierten Trx (Abb. 14). In Kapitel 3.5 wurde beschrieben, dass Trx von der Trx-R

reduziert wird. Die Hemmung der Trx-R-Aktivität durch Auranofin soll dies verhindern. Eine Vermutung ist, dass die Hemmung der Trx-R Aktivität die Reparatur von durch nitrosativen Stress zerstörten intrazellulären Zinkfinger-Strukturen verzögert. Deswegen wurde als nächster Schritt die Wirkungen von Auranofin auf die Reversibilität der Zinkfreisetzung untersucht. Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Zinquin wurde die Zinkfreisetzung in HDF nach einen SNOC-Behandlung im Gegenwart und Abwesenheit von 0,5 µM Auranofin untersucht.

Nach 30 Minuten zeigten mit SNOC und/oder mit SNOC + 0,5 µM Auranofin behandelte Zellen eine starke intrazelluläre Zinkfreisetzung, die besonders im Zellkern lokalisiert war. Eine Reversibilität der Zinkfreisetzung war bei den mit SNOC behandelten Zellen erst nach 8 Stunden zu beobachten, dagegen zeigten zusätzlich mit 0,5 µM Auranofin behandelte Zellen weiterhin eine Zinkfreisetzung. Nach 12 Stunden war auch bei mit 1 mM SNOC + 0,5 µM Auranofin behandelten Zellen eine vollständige Reversibilität zu beobachten (Abb. 15).

Diese Experimente zeigten, dass eine Hemmung der Trx-R-Aktivität durch Auranofin zu einem verzögerten Wiedereinbau von durch nitrosativem Stress freigesetztem intrazellulärem Zink führt.

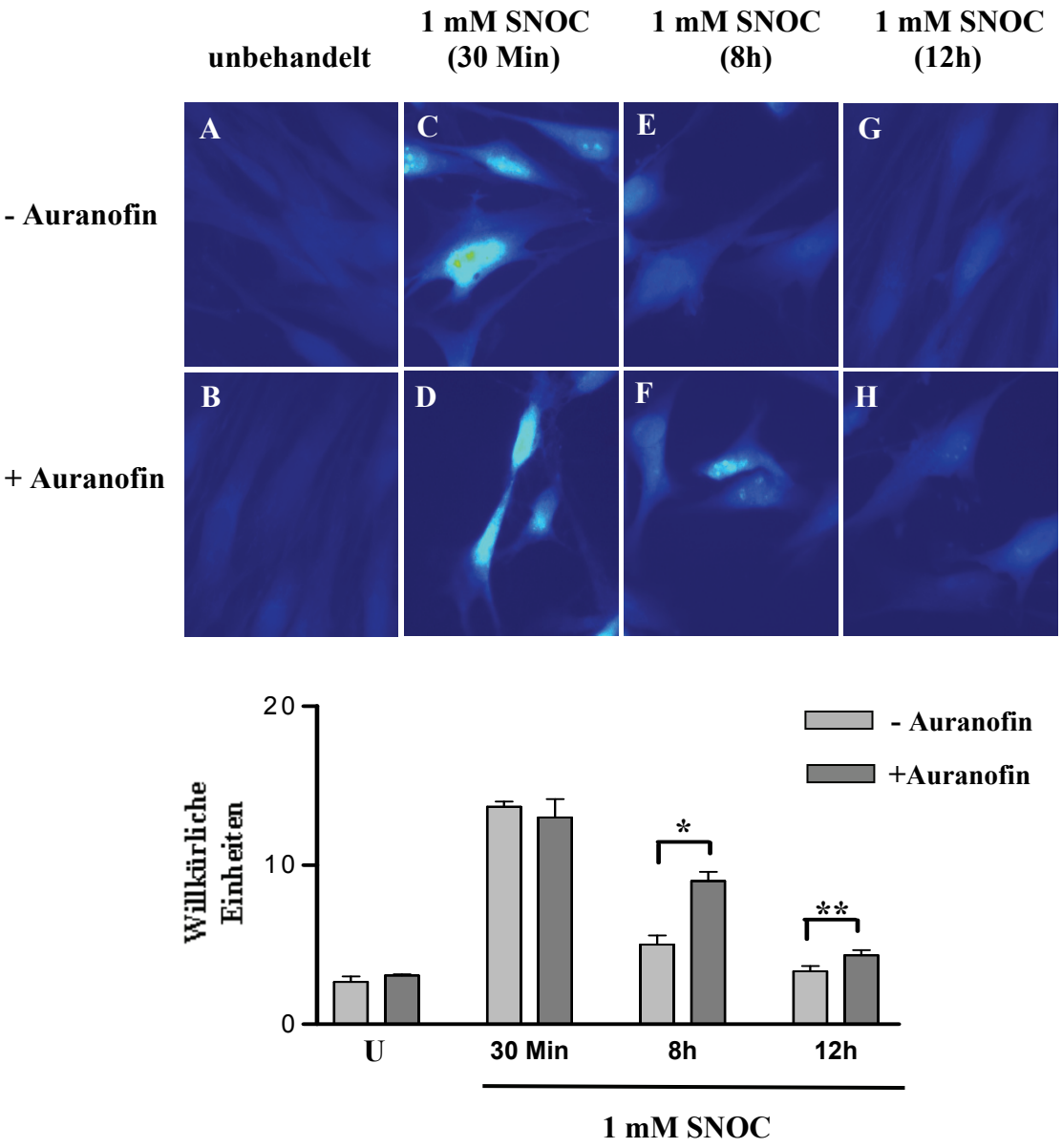



**Abbildung 15: Auranofin-Wirkung auf die Reversibilität der Zinkfreisetzung nach nitrosativem Stress**

HDF wurden 24 Stunden mit 0,5 µM Auranofin vorinkubiert und anschließend für 30 Minuten mit 1 mM SNOC behandelt. Nach der SNOC-Behandlung wurden die Zellen mit 10 µM Zinquin gefärbt. Keine Zinkfreisetzung war bei unbehandelten **(A)** bzw. nur mit 0,5 µM Auranofin behandelten Zellen zu beobachten **(B)**. 30 Minuten nach SNOC-Behandlung **(C)** und bei mit SNOC + Auranofin behandelten Zellen **(D)** zeigte sich eine starke Zinkfreisetzung vorwiegend im Kernbereich. Nach 8 Stunden war die Zinkfreisetzung bei SNOC-behandelten Zellen teilweise reversibel **(E)**, eine gleichzeitige Behandlung mit 0,5 µM Auranofin zeigte dagegen einen verzögerten Wiedereinbau des intrazellulär freigesetzten Zinks **(F)**. Nach 12 Stunden war eine vollständige Reversibilität sowohl bei mit SNOC **(G)** als auch mit SNOC + Auranofin behandelten Zellen **(H)** zu sehen.
Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren eines von drei unabhängigen Experimenten.
* $p < 0{,}01$; ** $p < 0{,}1$
U = unbehandelte Zellen

### 3.12 Hitze-Schock

Die Untersuchungen mit nitrosativem Stress haben gezeigt, dass HDF auf diese Stressart mit einer intrazellulären Zinkfreisetzung, einer erhöhten Trx-R Aktivität und ein verstärkten Proteinexpression von reduzierten Trx reagieren. Um die Wirkungen von nitrosativem Stress mit einen anderen Stressart vergleichen, wurde als weiterer Stress ein Hitze-Schock (HS) verwendet. Für die HS-Behandlung wurden HDF 40 Minuten bei 43$^{o}$C inkubiert.

### 3. 13 Hitze-Schock und intrazelluäre Zinkfreisetzung

Für die HS-Behandlung wurden HDF auf Glasplatten kultiviert. Nach mehr als 70%iger Konfluenz wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in DPBS + 10 % Glukose für 40 Minuten bei 43$^{o}$C inkubiert. Eine Temparatur von mehr als 43$^{o}$C oder eine längere Inkubation als 40 Minuten erwies sich als toxisch für die HDF. Nach 40 Minuten HS-Behandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit frischem Medium bei 37$^{o}$C inkubiert. Zur Kontrolle wurden die HDF 40 Minuten bei 37$^{o}$C in DPBS + 10 % Glukose inkubiert und nach 40 Minuten mit frischem Medium bei 37$^{o}$C weiter inkubiert. Nach der HS-Behandlung wurden die Zellen zum Nachweis einer intrazellulären Zinkfreisetzung zu unterschiedlichen Zeitpunkten für 25 Minuten bei 37$^{o}$C mit 10 µM Zinquin inkubiert.
Nach der HS-Behandlung wurde nach einer Stunde eine erhöhte Zinkfreisetzung vorwiegend im Zellkernbreich beobachtet. Nach 15 Stunden bzw. 24 Stunden nach der HS-Behandlung war wie bei unbehandelten Zellen keine Zinquinfluoreszens mehr zu beobachten (Abb. 16).

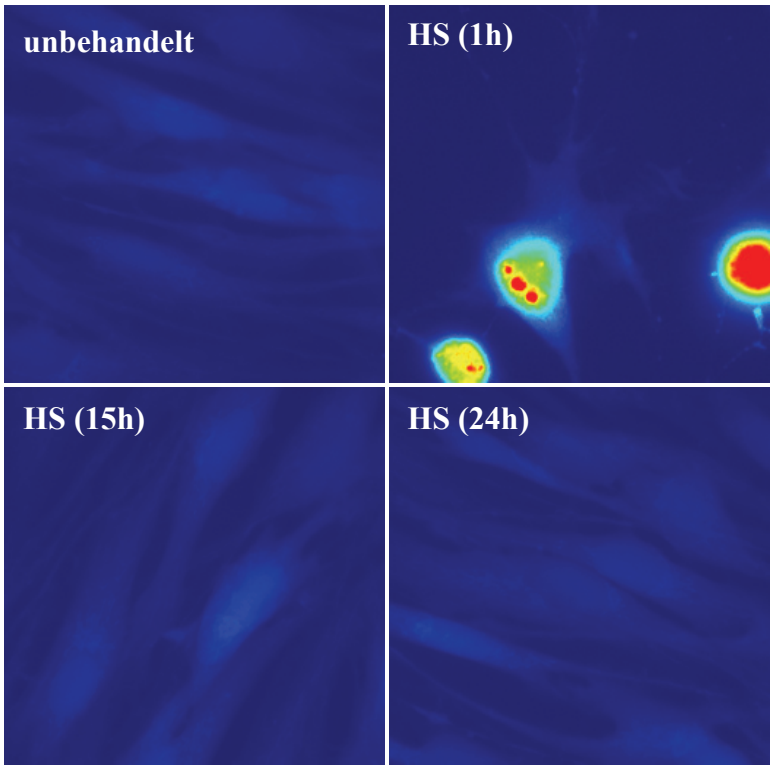



**Abbildung 16: Hitze-Schock (HS) und intrazelluläre Zinkfreisetzung**

Für die Hitze-Schock-Behandlung wurden HDF auf Glasdeckplatten kultiviert und für 40 Minuten bei 43°C inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Zellen mit frischem Medium bei 37°C weiter inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten für 25 min bei 37 °C mit 10 µM Zinquin gefärbt. Unbehandelte Zellen zeigten keine Zinquinfluoreszens, nach HS-Behandlung zeigten HDF eine Stunde später eine starke nukleäre Zinquinfluoreszens, nach 15 Stunden und nach 24 Stunden war dagegen keine Fluoreszens zu beobachten. Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren eines von drei unabhängigen Experimenten

Zusätzlich wurde bei HS-behandelten Zellen wie bei den Versuchen mit nitrosativem Stress Zink mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) in Zellkulturüberständen gemessen. Dafür wurden die HDF auf 10 cm-Platten gezüchtet und 40 Minuten auf 43$^{o}$C gewärmt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1-12h) wurde das Medium abgesaugt und in Graphitröhchen gefüllt und die Zinkkonzentration gemessen.

Eine Stunde nach der HS-Behandlung wurde im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine etwa 13-fache signifikante Erhöhung des Zinkgehalts im Zellkulturüberstand gemessen. Zu späteren Zeitpunkten unterschied sich der Zinkgehalt in Zellkulturüberstand nicht signifikant vom Zinkgehalt in Zellkulturüberstand von unbehandelten Zellen (Abb. 17).

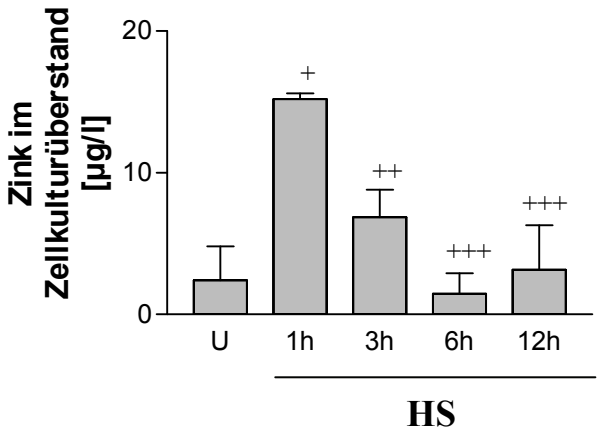



**Abbildung 17: Zinkmessungen im Zellüberstand mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)**

HDF wurden auf 10 cm Platten gezüchtet, und mit HS (40 min 43°C) behandelt. Bei HS-behandelten Zellen wurde nach 1, 3, 6 und 12 Stunden das Medium abgesaugt und in Graphitröhchen eingefüllt. Zur Kontrolle wurde der Zellkulturüberstand von unbehandelten Zellen verwendet. Mittels AAS-Spektrometer wurde die Zinkkontzentration gemessen.
Signifikanzen verglichen mit unbehandelten Zellen: + $p < 0{,}03$; ++ $p < 0{,}3$; +++ $p < 0{,}5$
U = unbehandelte Zellen

Dies zeigt, dass ein HS bei HDF wie bei nitrosativem Stress Zink aus der Zelle exportiert, welches anschließend wieder aufgenommen wird.

### 3.14 Lokalisation von reduziertem Thioredoxin nach Hitze-Schock-Behandlung

Trx transloziert nach oxidativem (Hirota *et al.*, 1999; Dider *et.al.,* 2001) bzw. nitrosativem Stress (Arai *et al.,* 2006) (s. Abb. 8) vom Zytoplasma in den Zellkern. Im folgenden Experiment wurde die Lokalisation von Trx nach Hitze-Schock-Behandlung mit der immunzytochemischen (ICC)-Methode untersucht. Die HDF wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend in DPBS für 40 Minuten bei 43°C inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und mit frischem Medium weiter bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde reduziertes Trx wie in den vorherigen Immunzytochemischen-Versuchen (s. Kapitel 3.5) mit den gleichen Methoden und den gleichen Antikörpern nachgewiesen.
Eine Stunde nach der HS-Behandlung zeigten die Zellen wie bei nitrosativem Stress (s. Abb. 8) sowohl im Kernbreich als auch im Zytoplasma eine starke Trx-Färbung. Unbehandelte bzw. nur mit sekundärem AK gefärbte Zellen zeigten keine Trx-Färbung (Abb. 18).

Dies bedeutet, dass es nach HS genau wie nach nitrosativem Stress zu einer verstärkten Proteinexpression von reduzierten Trx kommt und Trx in den Zellkernbereich wandert.

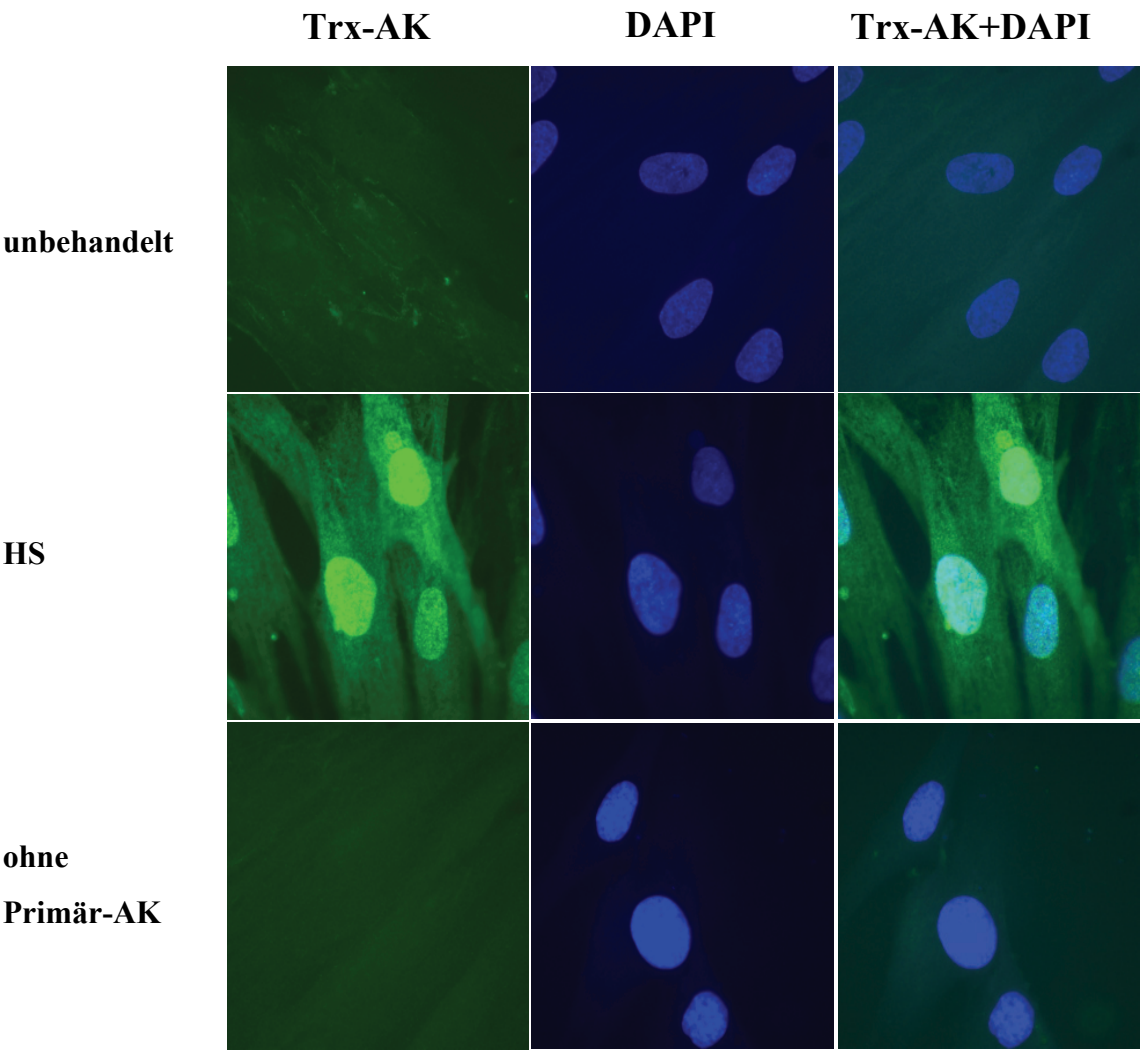



**Abbildung 18: Lokalisation von reduziertem Thioredoxin nach Hitze-Schock-Behandlung**

Eine Stunde nach HS Behandlung (40 Minuten bei 43°C) wurde bei HDF die reduzierte Trx-Lokalisation untersucht. Die Ergebnisse zeigen die Trx-AK-Färbung, DAPI gefärbte Zellkerne und Trx-AK + DAPI-Färbung. Unbehandelte Zellen zeigten eine sehr schwache Thioredoxin-Färbung sowohl im Zytoplasma als auch im Kern. Eine starke Färbung ist bei Hitze-Schock-behandelten Zellen besonders in Zellkernbereich zu beobachten. Als Negativ-Kontrolle wurden Hitze-Schock-behandelte Zellen nur mit einem sekundär-AK gefärbt, dabei war keine Fluoreszenz sichtbar.
Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren eines von drei unabhängigen Experimenten.

### 3.15 Proteinexpression von reduzierten Thioredoxin nach Hitze-Schock-Behandlung

Wie auch bei nitrosativem Stress wurde nach einer Hitze-Schock-Behandlung eine verstärkte Proteinexpression von reduziertem Trx besonders im Zellkern von HDF beobachtet. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die Proteinexpression von reduzierten Trx nach HS-Behandlung auch mittels WB untersucht.

Für den HS wurden die HDF 40 Minuten bei 43°C erhitzt, anschließend mit frischem Medium weiter inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten mittels WB-Analyse die Trx-Proteinexpression untersucht (WB-Methode s. Kapitel 3.6)

Eine basale Expression von reduziertem Trx konnte mittels WB nicht nachgewiesen werden. Anschließend zeigte sich dagegen eine zeitabhängigie Trx-Proteinexpression nach HS-Behandlung sowohl in Zelllysaten als auch in Kernextrakten (Abb. 19).

Die Ergebnisse zeigten, dass eine basale Proteinxpression von reduziertem Trx nicht nachzuweisen ist, eine HS-Behandlung jedoch die Expression von reduziertem Trx wie beim nitrosativen Stress (Abb. 9) zeitabhängig deutlich erhöht.

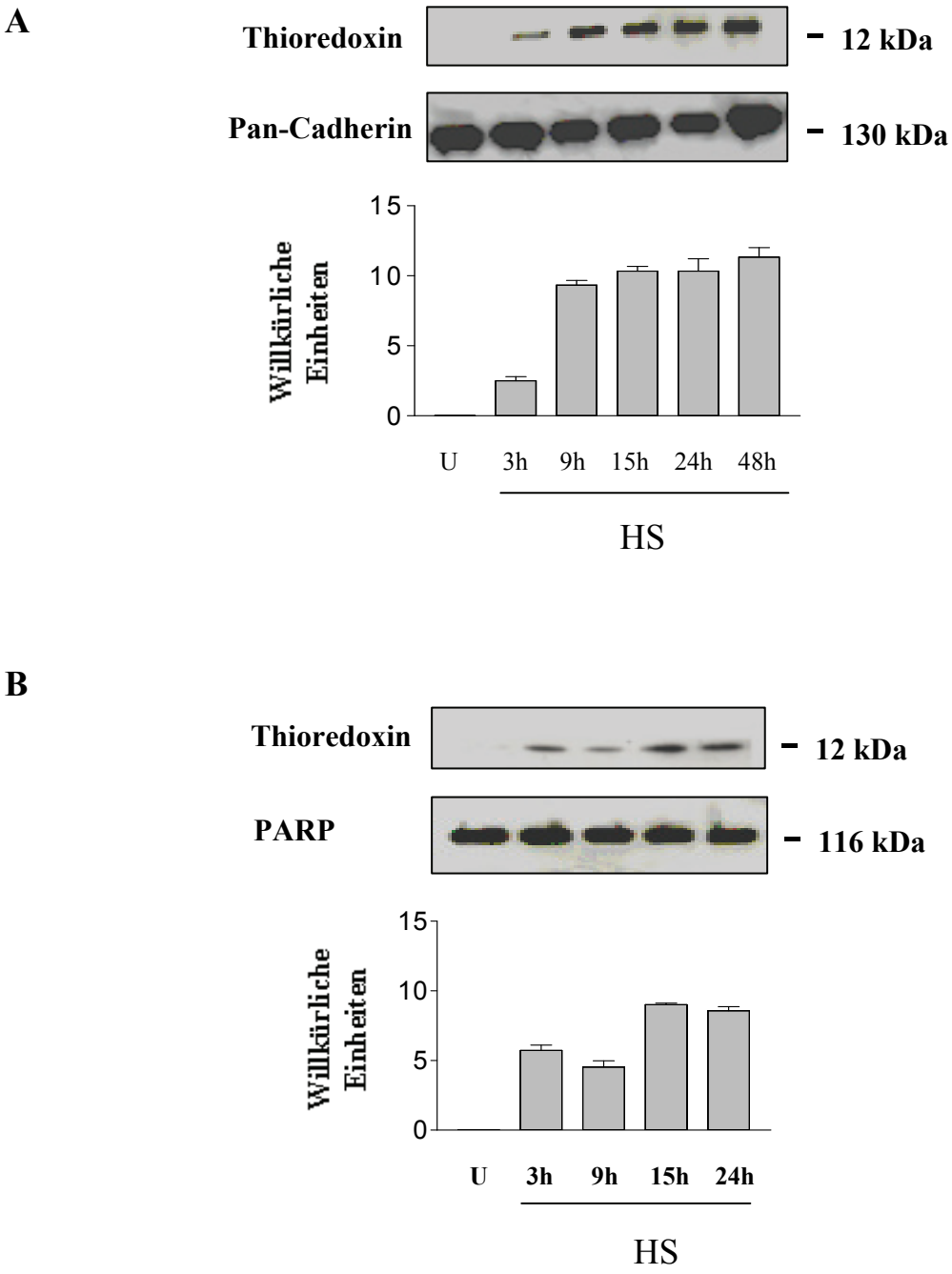



**Abb. 19: Proteinexpression von reduzierten Thioredoxin nach Hitze-Schock-Behandlung**

Für die WB-Untersuchung wurden HDF 40 Minuten bei 43°C erhitzt. Nach der HS-Behandlung wurde mit frischem Medium bei 37°C weiter inkubiert und anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten mittels WB-Analyse die Proteinexpression von reduziertem Trx untersucht. Sowohl in Gesamtzelllysaten als auch in Kernextrakten konnte basale Expression von reduziertem Trx nicht nachgewiesen werden. Dagegen wurde nach der HS-Behandlung eine zeitabhängig erhöhte Expression sowohl in Gesamtlysaten (A) als auch in Kernextrakten beobachtet (B).
Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren eines von drei unabhängigen Experimenten.
U = unbehandelte Zellen

### 3.16 Wirkung eines Hitze-Schocks auf die Thioredoxin-Reduktase-Lokalisation

Nach der Wirkung eines Hitze-Schocks auf die Lokalisation und Proteinexpression von reduzierten Trx wurde als nächstes die Lokalisation der Trx-R untersucht. Nach Erhitzen für 40 Minuten bei 43$^{o}$C wurde mittels Immunzytochemie-Methode die Trx-R-Lokalisation in HDF untersucht. Als Kontrolle wurden HS-behandelte Zellen nur mit sekundär-AK gefärbt.

Sowohl die unbehandelten Zellen als auch HS-behandelte Zellen zeigten keine signifikante Trx-R-Färbung. Alle Zellen zeigten die gleiche leichte Hintergrund-Fluoreszenz (Abb. 20).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die HDF nur eine sehr niedrige basale Trx-R-Proteinexpression aufweisen und das ein Hitze-Schock diese niedrige Expression wie nach nitrosativem Stress (Abb. 10) nicht steigert.

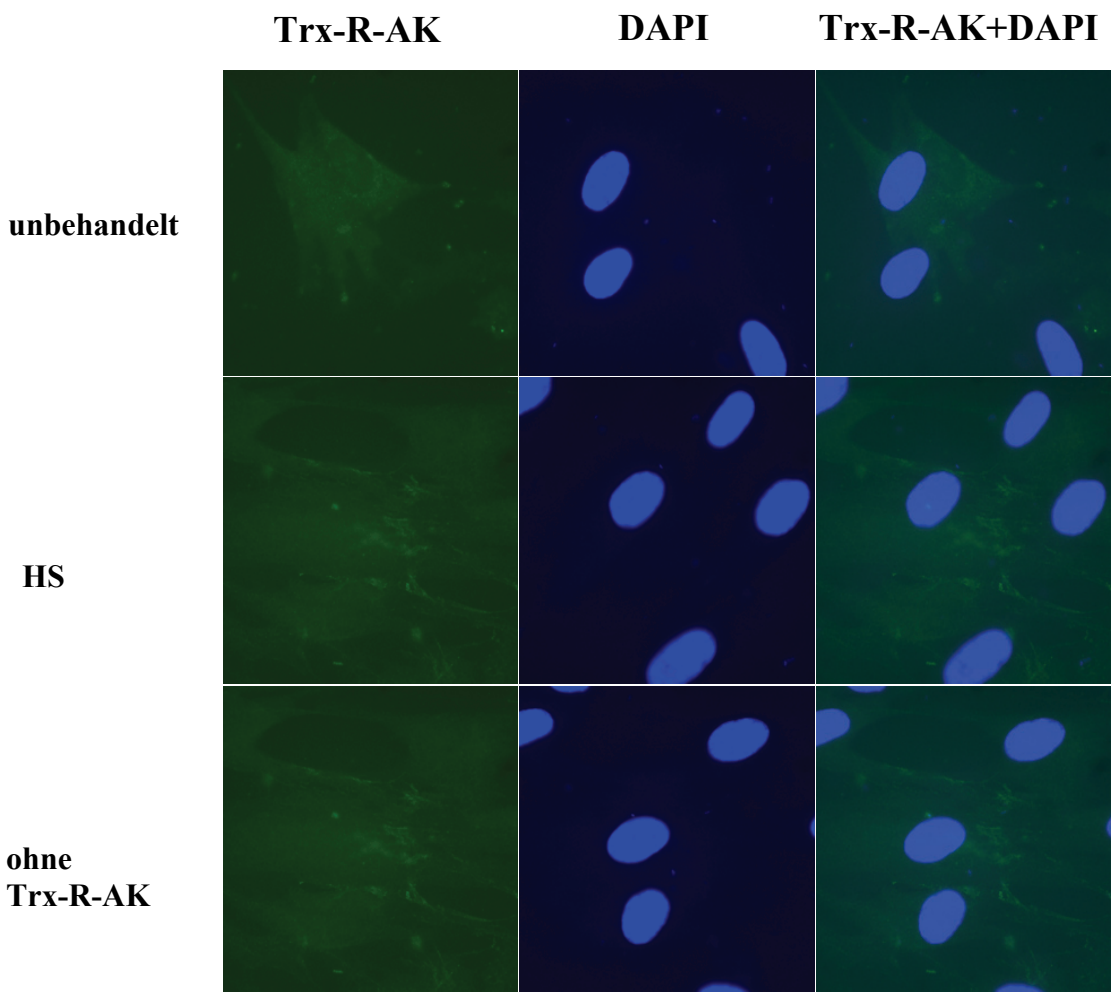



**Abbildung 20: Wirkung eines Hitze-Schocks auf die Thioredoxin-Reduktase Lokalisation und Proteinexpression**

Bei HDF wurden nach einer Hitze-Schock-Behandlung (40 Minuten bei 43°C) mittels immunzytochemischer Methoden die Trx-R-Proteinexpression nachgewiesen. Die Abbildung zeigt die Trx-R-AK-Färbung, DAPI-gefärbte Kerne und die Trx-R-AK + DAPI-Färbung. Unbehandelte Zellen zeigten eine sehr schwache Trx-R-Färbung sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern; eine HS-Behandlung veränderte dieses Expressionsmuster nicht. Alle Zellen zeigten die gleiche leichte Hintergrund-Fluoreszenz. Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren eines von drei unabhängigen Experimenten.

### 3.17 Wirkung eines Hitze-Schocks auf die Thioredoxin-Reduktase-Aktivität

Die Immunzytochemie-Versuche haben gezeigt, dass eine Hitze-Schock-Behandlung keine Wirkung auf die Lokalisation der Trx-R hat und keine erhöhte Trx-R-Proteinexpression bewirkt. Nach diesen Ergebnissen wurde nun die HS-Wirkung auf die Trx-R-Aktivität untersucht. Zuerst wurde ein Toxititäts-Test durchgeführt. Subkonfluente HDF wurden mit steigenden Konzentrationen von Auranofin (0-10 µM) für 24 Stunden vorinkubiert, anschließend folgte die Hitze-Schock-Behandlung (40

Minuten bei 43°C). Für weitere 24 Stunden wurden die HS-behandelten bzw. unbehandelten Zellen anschließend mit steigenden Auranofin-Konzentrationen (0-10 µM) inkubiert. Eine Konzentration von 0,5 µM Auranofin zeigte bei den behandelten Zellen eine Vitalität von mehr als 95%. Ab 0,5 µM wirkte Auranofin für HS-behandelte Zellen toxisch, deswegen wurden für die weiteren Versuche 0,5 µM Auranofin verwendet (Abb. 21).

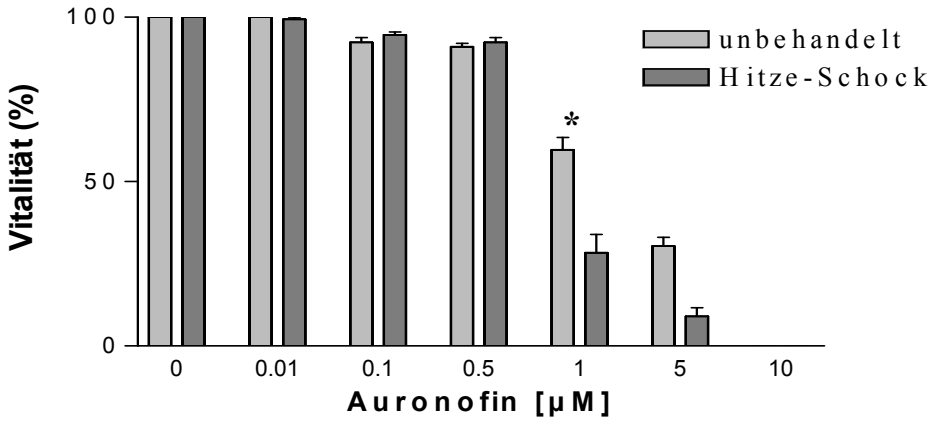



**Abbildung 21: Toxizitäts-Test nach Hitze-Schock-behandlung**

Bestimmung der Vitalität von HDF nach 24 Stunden Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Auranofin (0-10 µM) bei unbehandelten bzw. mit HS behandelten Zellen. Die Vitalität ist bezogen auf unbehandelte HDF. Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren eines von drei unabhängigen Experimenten.
*$p < 0{,}0004$

Nach Ermittlung der nicht-toxischen Auranofin-Konzentration wurde bei den HS-behandelten HDF die Trx-R-Aktivität gemessen. HDF wurden mit 0,5 µM Auranofin für 24 Stunden vorinkubiert, anschließend folgte die Hitze-Schock-Behandlung (40 Minuten bei 43°C). Bei HS-behandelten Zellen bzw. HS + Auranofin-behandelte Zellen wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Trx-R-Aktivität gemessen.

Die Trx-R-Aktivität war nach der HS-Behandlung erhöht (Maximum bei 3h bzw. 9h). Die Inkubation mit 0,5 µM Auranofin hemmte die durch HS-Behandlung erhöhte Trx-R-Aktivität (Abb. 22).

Bei nitrosativem Stress wurde die höchste Trx-R-Aktivität erst nach 24 Stunden gemessen. Dies zeigt, dass eine Hitze-Schock-Behandlung bei HDF eine schnelle Erhöhung von Trx-R-Aktivität zur Folge hat, welche durch eine Auranofin-Behandlung gehemmt wird.

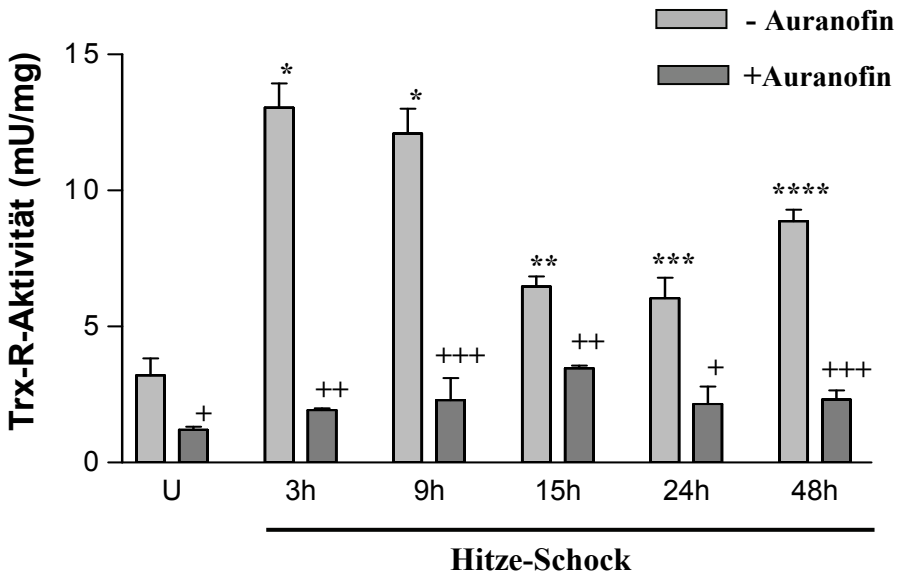



**Abbildung 22: Hitze-Schock-Wirkung auf die Thioredoxin-Reduktase-Aktivität**

HDF wurden mit HS (40 min/43°C) behandelt. Für die Hemmung der Trx-R-Aktivität wurden Zellen 24 h lang mit 0,5 µM Auranofin vorinkubiert, anschließend mit HS behandelt und mit Auranofin weiter inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0h - 48h) wurden die Proben lysiert und anschließend die Trx-R-Aktivität gemessen. Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren eines von drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzen verglichen mit unbehandelten Zellen: * $p < 0{,}001$; ** $p < 0{,}01$; *** $p < 0{,}04$; **** $p < 0{,}002$; Verglichen mit +/- Auranofin: + $p < 0{,}03$, ++ $p < 0{,}0003$, +++ $p < 0{,}002$
U = unbehandelte Zellen

## 3.18 Wirkung von Auranofin auf die Proteinexpression von reduziertem Thioredoxin nach Hitze-Schock

Bei HS-behandelten Zellen wurde nach dem hemmenden Effekt von Auranofin auf die Trx-R-Aktivität als nächstes die Wirkungen auf die Expression von reduziertem Trx untersucht.

HDF wurden mit 0,5 µM Auranofin für 24 Stunden vorinkubiert, anschließend folgte die Hitze-Schock-Behandlung (40 Minuten bei 43°C). Nach HS-Behandlung wurde bei HS-behandelten bzw. HS + Auranofin-behandelte Zellen nach 12 und 24 Stunden mittels WB-Analyse die Proteinexpression von reduziertem Trx untersucht.

Der WB zeigte 15 und 24 Stunden nach der HS-Behandlung eine erhöhte Expression von reduziertem Trx, die durch Auranofin-Behandlung zu etwa 50% gehemmt wurde (Abb. 23).

Diese Ergebnisse zeigten wie bei nitrosativem Stress, dass eine durch Hitze-Schock erhöhte Expression von reduziertem Trx mittels Hemmung der Trx-R-Aktivität erniedrigt wird.

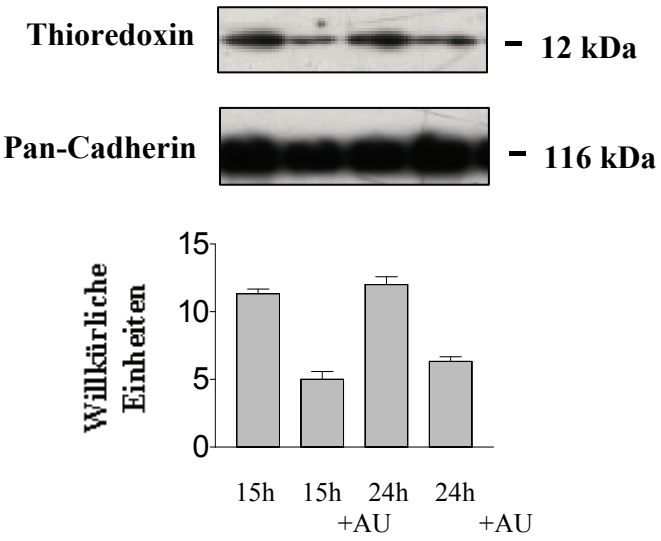



**Abb. 23: Wirkung von Auranofin auf die Proteinexpression von reduzierten Thioredoxin nach Hitze-Schock**

HDF wurden mit HS bzw. HS + Auranofin behandelt. Die innerhalb von 15 und 24 Stunden nach der Hitze-Schock-Behandlung erhöhte Expression von reduziertem Trx wurde durch Auranofin Behandlung zu etwa 50 % vermindert. Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren eines von drei unabhängigen Experimenten.
AU = Auranofin

## 3.19 Wirkung von Auranofin auf die Reversibilität der Zinkfreisetzung nach Hitze-Schock-Behandlung

Nach dem hemmenden Effekt von Auranofin auf die durch HS-Behandlung erhöhte Trx-R-Aktivität wurde nun die Wirkung von Auranofin auf die intrazelluläre Zinkfreisetzung nach einen HS untersucht. HDF wurden 24 Stunden mit 0,5 µM Auranofin vorinkubiert. Unbehandelte bzw. mit Auranofin behandelte Zellen wurden 40 Minuten bei 43°C erhitzt und anschließend mit 10 µM Zinquin gefärbt.
Unbehandelte Zellen (Abb. 24 A) bzw. nur mit Auranofin behandelte Zellen (Abb. 24 B) zeigten keine Zinkfreisetzung. HS bzw. HS + Auranofin behandelte Zellen zeigten nach 1 Stunde eine intrazelluläre Zinkfreisetzung (Abb. 24 C, D). Die Zinkfreisetzung war bei HS-behandelten Zellen nach 15 Stunden vollständig reversibel (Abb. 24 E).

Auranofin-behandelte Zellen zeigten dagegen nach 15 Stunden noch eine Zinquinfluoreszens (Abb.24 F). Nach 24 Stunden war die Zinkfreisetzung auch bei HS + Auranofin behandelten Zellen beinahe vollständig reversibel (Abb. 24 H).

Durch Hemmung der Trx-R wurde ein verzögerter Einbau des intrazellulär freigesetzten Zinks wie bei nitrosativem Stress auch bei Hitze-Schock behandelten HDF beobachtet.

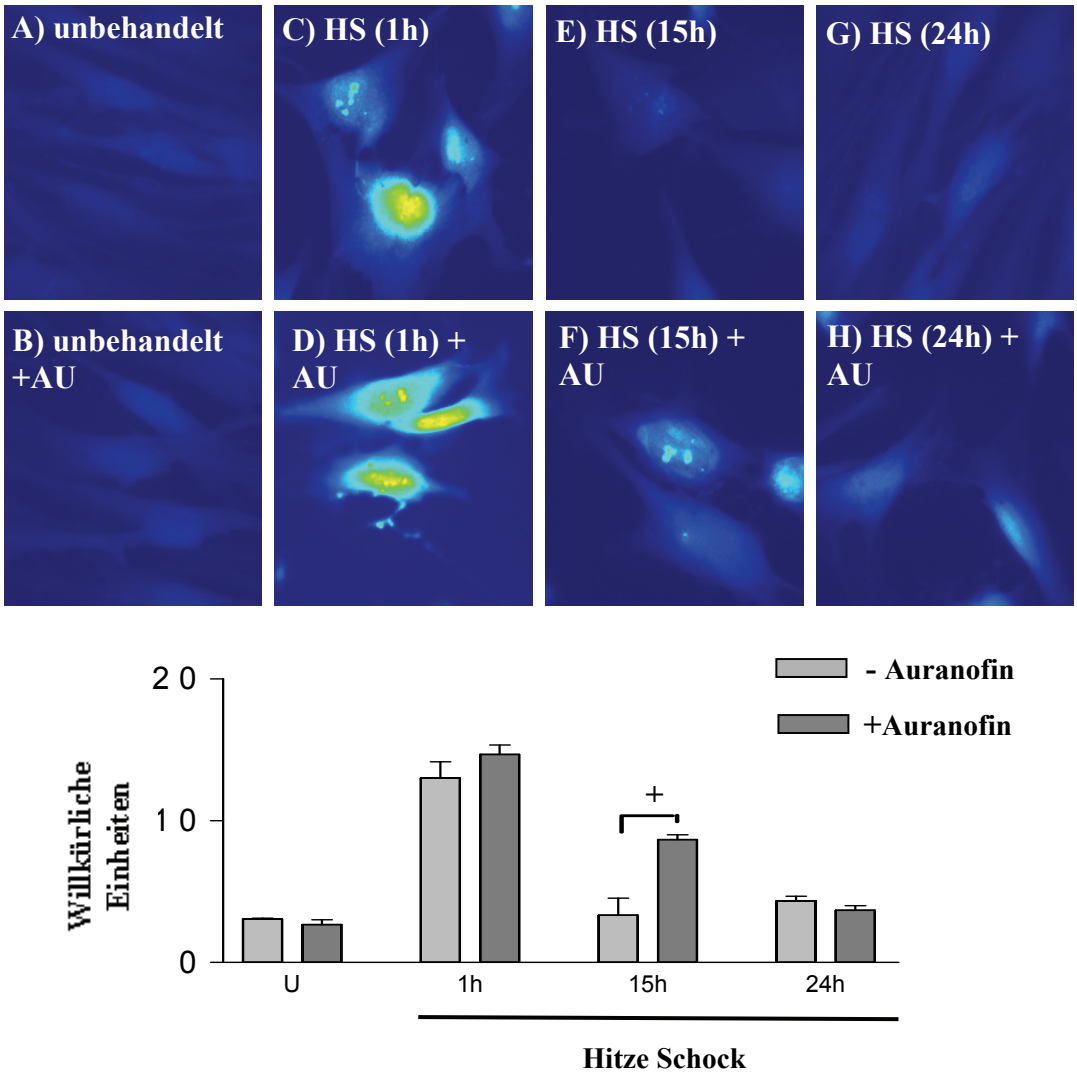



**Abbildung 24: Auranofin-Wirkung auf die Zinkfreisetzung nach Hitze-Schock-Behandlung**

HDF wurden 24 Stunden mit 0,5 µM Auranofin vorinkubiert und anschließend mit HS behandelt. Danach wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Zinquin gefärbt. Keine Zinkfreisetzung war bei unbehandelten **(A)** bzw. nur mit Auranofin behandelten Zellen zu beobachten **(B)**. 1 h nach HS-Behandlung **(C)** und bei HS + Auranofin behandelten Zellen **(D)** zeigte sich eine starke Zinkfreisetzung vorwiegend im Zellkernbereich. Nach 15 Stunden ist die Zinkfreisetzung bei HS-behandelten Zellen reversibel **(E)**, eine gleichzeitige Behandlung mit Auranofin bewirkte dagegen einen verzögerten Wiedereinbau des intrazellulär freigesetzten Zinks **(F)**. Nach 24 Stunden war eine vollständige Reversibilität bei HS **(G)** und eine fast vollständige bei HS + Auranofin behandelten Zellen **(H)** zu sehen.
Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren eines von drei unabhängigen Experimenten. + $p < 0{,}01$
U = unbehandelte Zellen

# 4. Diskussion

## 4.1 Nitrosativer Stress

Bei Entzündungsreaktionen wird durch eine erhöhte induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS)-Aktivität lokal NO in großen Mengen synthetisiert; man spricht dann von "nitrosativem Stress". Die iNOS ist zuerst in Makrophagen charakterisiert worden, die mit Lipopolysacchariden (LPS) und Interferon-gamma (IFN-γ) aktiviert wurden (Hibbs, Jr. *et al.*, 1987; Stuehr *et al.*, 1990). Die iNOS-Aktivierung kann der Infektabwehr durch Zellen des Immunsystems wie Makrophagen oder neutrophile Granulozyten dienen. Anschließend wurde entdeckt, dass sich die iNOS in einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen induzieren lässt (Kröncke, 1995). Das durch die induzierte iNOS-Aktivität erzeugte NO verursacht durch Tyrosin-Nitrierung die Entstehung von Nitrotyrosinen (Kröncke, 2000). NO besitzt ein ungepaartes Elektron, ist somit ein Radikal und kann durch Reaktion mit dem Eisen der Häm-Gruppe-Enzyme den Energiestoffwechsel hemmen (Henry *et al.*, 1993). Die Reaktion mit dem Superoxid-Anion ergibt Peroxynitrit, ein starkes Oxidationsmittel, welches zur Tötung von Mikroorganismen, aber auch zur Gewebesschädigung führt (Beckman *et al.*, 1990). Peroxynitrit nitriert Tyrsoin zu Nitrotyrosin (Abb. 1) (Ischiropoulos *et al*., 1998). Deshalb werden die Nitrotyrosine als Marker für nitrosativen Stress angesehen.

Die Wirkungen von NO auf die Tumorentwicklung sind unterschiedlich, es kann sowohl stimulierende als auch hemmende Effekte haben. NO in niedrigen Konzentrationen, synthetisiert durch die eNOS (endothelial) oder die nNOS (neuronal), wirkt als Signalmolekül, fördert die Tumor-Angiogenese und stimuliert das Tumorwachstum. In hohen Konzentrationen dagegen, meistens synthetisiert durch die iNOS, induziert es zytostatische oder zytotoxische Effekte und hemmt das Tumorwachstum (Thomsen & Miles, 1998; Ekmekcioglu *et al.*, 2005).

Bei nitrosativem Stress sind Proteine mit SH-Gruppen, sowie Proteine, die Metallionen wie Eisen, Zink oder Kupfer mittels Schwefelatomen komplexieren, die Zielmoleküle von NO in den Zellen. Nach S-Nitrosierung werden die komplexierenden Metallionen freigesetzt (Abb. 25). Durch nitrosativen Stress können Signalübertragungswege oder die Expression von Genen beeinflusst werden.

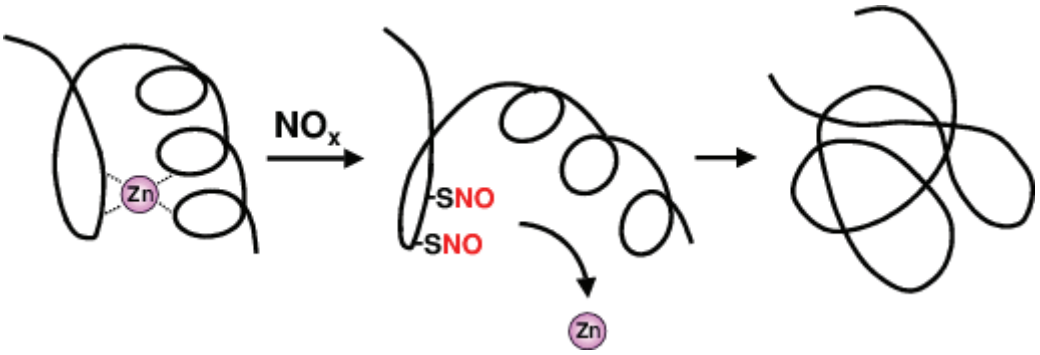



**Abb. 25:** NO setzt Zinkionen aus Zinkfingerstrukturen frei. Nach S-Nitrosierung von Cysteinen in Zinkfingern kann das Zinkion nicht mehr komplexiert werden. Eine Änderung der Proteinkonformation und der Funktion des Proteins ist die Folge (Kröncke *et al*., 1994).

## 4.2 Erhöhte iNOS-Expression und Nitrotyrosin-Bildung in Prostatatumor-Geweben und Prostatakarzinom-Zellen

Nach epidemiologischen Untersuchungen korreliert ein erhöhtes Prostatakrebs-Risiko mit einer Prostatitis und mit durch Geschlechtsverkehr verursachten Infektionen. Umgekehrt sinkt mit Einnahme von anti-inflammatorischen Medikamenten und Antioxidantien das Prostatakrebs-Risiko (Nelson *et al.*, 2004). Somit kann man schlussfolgern, dass chronische oder immer wieder auftretende akute entzündliche Reaktionen die Prostatakrebs-Entstehung begünstigen bzw. die Prostatakrebs-Entwicklung fördern.

Die iNOS ist ein Enzym, dessen Expression durch proinflammatorische Zytokine und/oder bakterielle Produkte induziert wird (Kröncke, 2000). Es wurde gezeigt, dass *in vivo* Prostatakarzinom-Zellen eine erhöhte iNOS-Expression aufweisen (Klotz *et al.*, 1998; Aaltoma *et al.*, 2001; Baltaci *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003; Bronte *et al.*, 2005). Gleichzeitig wurde eine signifikante Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine Interleukin (IL)-6 und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-α im Serum von Prostatakarzinom-Patienten entdeckt (Michalaki *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit wird durch *in vivo* immunhistochemische-Untersuchungen gezeigt, dass die iNOS in Prostatatumor-Geweben induziert ist und mit einer Nitrotyrosin-Färbung korreliert (s. Abb. 3). In Prostatakarzinom-Zellen wurde *in vitro* bestätigt, dass exogen in Form eines NO-Donors zugefügtes NO eine intrazelluläre Nitrotyrosin-Bildung bewirkt (s. Abb. 4). So konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von Prostatakarzinom-Zellen mit einem NO-Donor dieselbe Nitrotyrosin-Bildung aufweist, wie sie in Biopsien von Prostata-Tumorpatienten gefunden wurde.

### 4.3 Einfluss von NO auf den Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Androgen-Rezeptor

Eine bekannte Zielgruppe von Molekülen nach nitrosativem Stress sind Transkriptionsfaktoren, die auf bestimmte Signale reagieren, spezifisch an DNA-Abschnitte binden und anschließend die Transkription regulieren. Das häufigste Strukturelement von DNA-Bindungsdomänen sind sogenannten Zinkfinger mit einem Zinkion, das von Schwefelatomen des Cysteins oder auch von Stickstoffatomen des Histidins komplexiert wird. Diese Cysteine werden unter nitrosativem Stress S-nitrosiert. Anschließend folgt die Freisetzung des Zinkions, was wiederum zu einer Konformationsänderung des Proteins führt (Kröncke *et al*., 2001). So wurde nachgewiesen, daß NO die DNA-Bindungsaktivität der Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren LAC9 (Kröncke *et al*., 1994), Sp1 (Berendji *et al*., 1999) und Vitamin $D_3$-Rezeptor (Kröncke *et al*., 2000) hemmt, während ein Transkriptionsfaktor ohne Zinkfinger nach NO-Behandlung in seiner DNA-Bindungskapazität nicht beeinträchtigt ist. Auf diese Weise kann die Bindungsfähigkeit von Transkriptionsfaktoren an die DNA beeinflusst werden, was zu einer veränderten Genexpression führen kann. Bisher war bekannt, dass durch NO-Behandlung von Prostatakarzinom-Zellen die Bindungsaktivität des Zinkfinger-Transkriptionsrepressors Yin-Yang 1 gehemmt wird. Yin-Yang 1 bindet an die Promotorregion von Fas und verhindert dadurch die Fas-Genexpression. Eine erhöhte NO-Konzentration verhindert die Bindung von Yin-Yang 1 an die Fas-Promotorregion. Dadurch wird die Fas-Expression induziert und die hierdurch bedingte Überexpression ermöglicht eine Fas-induzierte Apoptose (Garban & Bonavida, 2001; Hongo *et al.*, 2005).

Zur Klärung, welche Wirkung eine iNOS-Aktivität bei der Prostatatumor-Entstehung hat, wurde in dieser Arbeit der Androgen-Rezeptor (AR) in Prostatakarzinom-Zellen untersucht. Der AR ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor, der die intrazelluläre Wirkung der Androgene vermittelt und zwei $Cys_4$-Typ Zinkfinger-Strukturen hat. In Abwesenheit der Androgen-Hormons residiert der AR inaktiv gebunden an Hitze-Schock-Proteine im Zytoplasma, bei Anwesenheit von Androgen dagegen dissoziiert er von den Hitze-Schock-Proteine und wandert vom Zytoplasma in den Zellkern, wo er an das Androgen-Response-Element (ARE) von Androgen-Response-Genen, z.B. Probasin, Prostata-spezifisches Antigen etc., bindet. Das Prostatakarzinom ist das häufigste Krebsleiden beim Mann in Deutschland. Bei fortgeschrittenem Prostatakarzinom ist eine radikale Entfernung der Prostata nicht immer möglich. In

diesen Fällen wird auf eine palliative endokrine Behandlung zurückgegriffen. Mit einer Antiandrogentherapie wird versucht, die Konzentration von freizirkulierenden Androgenen herabzusetzen und damit die transkriptionelle Aktivität des AR zu blockieren. Da primäre Prostatakarzinome in ihrem Wachstum meist androgenabhängig sind, ist die Ansprechrate auf eine Antiandrogentherapie entsprechend hoch und liegt bei ca. 75 %. Die Gefahr dieser Therapieform liegt darin, dass die Tumorzellen nach etwa zwei Jahren trotzdem ihr Wachstum fortsetzen. Einige Prostatakarzinome besitzen jedoch die Fähigkeit, trotz eines Mangels an männlichen Hormonen weiterzuwachsen oder erlangen diese Fähigkeit im Laufe der Zeit.

Die Wirkung von NO auf die durch Androgen induzierte DNA-Bindungsaktivität des Androgen-Rezeptors wurde mit Hilfe der Gel-Shift-Methode (EMSA) nachgewiesen.

Eine Behandlung mit DETA/NO zeigte bei Prostatakarzinom-Zellen, dass die AR-Bindungsaktivität NO-konzentrationsabhängig gehemmt wird (s. Abb. 5 A). Dies bestätigt die Vermutung, dass NO die Zinkfingerstruktur das AR angreift, die Cystein-Reste S-nitrosiert und dadurch die Bindungsaktivität des AR hemmt. Dieses Ergebnis wurde auch durch die Behandlung von Zellkernextrakten von Prostatakarzinom-Zellen mit dem schnellwirkenden NO-Donor DEA/NO bestätigt (s. Abb. 5 C).

In Prostatakarzinom-Zellen hat eine NO behandlung weder einen hemmenden Effekte auf die AR-Proteinexpression noch auf die Translokation des AR (Cronauer *et. al.,* 2007). Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die AR-Bindungsaktivität in Prostatakarzinom-Zellen konzentrationsabhängig durch NO gehemmt wird. Dazu passen Befunde, die zeigen, dass NO die Proliferation von AR-exprimierenden Prostatakarzinom-Zellen signifikant stärker hemmt als die Proliferation von AR-negativen Protatakarzinom-Zellen (Cronauer *et al*., 2007). Durch iNOS gebildetes NO könnte ein Faktor sein, der Selektionsdruck auf die klonale Expansion von Prostatatumor-Zellen ausübt, die in der Lage sind, unabhängig von AR zu wachsen. Diese Ergebnisse eröffnen die Möglichkeit, dass das als Chemoprävention geeignete NO für Prostatakarzinom-Patienten in Zukunft zur alternativen oder zusätzlichen Therapie-Methode werden könnte.

### 4.4 Nitrosativer Stress beeinflußt die intrazelluläre Zinkhomöostase

Die Rolle von NO bei Entzündungsreaktionen ist Gegenstand intensiver Forschung. Unter aeroben Bedingungen, d.h. wahrscheinlich nach Reaktion zu $N_2O_3$, bewirkt NO eine S-Nitrosierung von Cysteinen im Zinkspeicherprotein MT mit nachfolgender $Zn^{2+}$-Freisetzung (Kröncke *et al.*, 1994; Misra *et al.*, 1996; Aravindakumar *et al.*, 1999). Diese Zn-S Cluster kommen in vielen Proteinen vor und dienen u.a. der Aufrechterhaltung ihrer Tertiärstruktur und Funktion. So ermöglichen sie die Bildung von Zinkfingern in Transkriptionsfaktoren, die für eine spezifische Bindung an DNA oder RNA essentiell bzw. für Protein-Protein Interaktionen verantwortlich sind (Klug & Schwabe, 1995). In Abb. 5 wurde gezeigt, dass die DNA-Bindungsaktivität des AR NO-konzentrationsabhängig gehemmt wird. Es wird vermutet, dass gebundenes Zink in Zinkfingerstrukturen durch S-Nitrosierung aus Cystein-Resten freigesetzt wird. Erstmals wurde 1997 von Berendji nachgewiesen, dass durch NO-Behandlung erzeugter nitrosativer Stress in Maus-Fibroblasten (L929) zu einer intrazellulären Zinkfreisetzung führt. Dies wurde mit Hilfe des Fluoreszens-Farbstoffs Zinquin nachgewiesen. Um den Einfluß von nitrosativem Stress auf die Zinkhomöostase untersuchen zu können, wurden Prostatazellen mit Zinquin gefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskop untersucht. Aufgrund des hohen freien Zinkgehalts in den Prostatazellen konnte die Zinkhomöostase in diesen Zellen jedoch nicht untersucht werden. Der hohe Zinkgehalt beruht darauf, dass in der Prostata die Samenflüssigkeit produziert wird und diese viel freies Zink enthält. Daher wurden humane dermale Fibroblasten (HDF) als Modell für alle weiteren Versuche verwendet, da sie kaum intrazellulär freies Zink enthalten. Eine Behandlung mit dem NO-Donor SNOC dagegen erzeugte eine transiente intrazelluläre Zinkfreisetzung, die nach 8 Stunden nicht mehr zu sehen war (s. Abb 6). Um zu zeigen, dass das freigesetzte Zink nicht aus der Zelle exportiert wird, wurde mittels Atomabsorbtions-Spektroskopie (AAS) Zink in den Zellkulturüberständen gemessen. Diese Methode ermöglicht, den Zinkgehalt in HDF-Zellkulturüberständen vor und nach nitrosativem Stress nachzuweisen. Die Messungen haben gezeigt, dass 30 Minuten nach SNOC-Behandlung die Konzentration von Zink in den Zellkulturüberständen deutlich ansteigt, verglichen mit unbehandelten Zellen. Die Zinkkonzentration in den Zellkulturüberständen war 12 Stunden nach NO-Behandlung jedoch wieder auf den Anfangswert gesunken (s. Abb. 7). Dies bedeutet, dass nitrosativer Stress eine intrazelluläre Zinkfreisetzung bewirkt, ein Teil des Zinks zunächst aus der Zelle

exportiert wird, dann jedoch von der Zelle wieder aufgenommen und in Zinkfingerstrukturen eingebaut wird.

### 4.5 Wirkungen von nitrosativem Stress auf das Trx/Trx-R-System

Das Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase-System besteht aus der Thioredoxin-Reduktase (Trx-R), ihrem Substrat Thioredoxin (Trx) und NADPH. Thioredoxin, wird in einer NADPH-abhängigen Reaktion zu Trx-$(SH)_2$ reduziert (s. Abb.2).

Es ist bekannt, dass sowohl nach nitrosativem (Arai *et al*., 2006) als auch nach oxidativem Stress reduziertes Thioredoxin vom Zytoplasma in den Zellkern wandert und zur Reduzierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. von NFκB, AP-1 und Nrf-2 dient (Akamatsu *et al.*, 1997; Saitoh *et al.*, 1998; Hirota *et al.*, 1999; Makino *et al.*, 1999). Wie Trx kann die Trx-R Proteine reduzieren, z.B. Insulin (Mustacich *et al*., 2000 Nordberg *et al*., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde in HDF nach nitrosativem Stress eine Erhöhung der Expression (s. Abb 9) sowie eine erhöhte Lokalisation von reduziertem Trx im Zellkern (s. Abb. 8) beobachtet. Bei unbehandelten Zellen war eine Expression von reduziertem Trx nicht nachweisbar. Eine Trx-R-Proteinexpression konnte nach nitrosativem Stress dagegen in HDF weder mit der Western-Blot-Methode noch immunzytochemisch nachgewiesen werden. Dies kann daran liegen, dass die Trx-R in HDF nur in geringen Mengen exprimiert wird und nach NO-Behandlung nicht induzierbar ist. Bisher ist gezeigt worden, dass eine Trx-R-Proteinexpression in HUVEC nach eine Behandlung mit dem Peroxynitrit-Donor SIN-1 induziert wird (Park *et al*., 2002). Bisher ist bekannt, dass bei oxidativem Stress die Trx-R-Aktivität erhöht wird, um Trx reduzieren zu können (Rundlöf & Arner 2004). Um die Wirkungen von nitrosativem Stress auf die Trx-R untersuchen zu können, wurde daher als nächstes die Trx-R-Aktivität gemessen. Mit dieser Methode gelang es, nach nitrosativem Stress eine erhöhte Trx-R-Aktivität nachzuweisen. Nach NO-Behandlung wurde innerhalb von 24 Stunden eine etwa siebenfache Erhöhung der Trx-R-Aktivität beobachtet (s. Abb. 13).

Es ist gezeigt worden, dass Trx nach nitrosativem Stress als ROS scavenger wirkt (Haendeler *et al*., 2002). Trx dient als Elektron-Donor für die Thioredoxinperoxidase und für Peroxiredoxin und ermöglichet dadurch die Reduktion von $H_2O_2$ zu $H_2O$ (Kang

*et al*., 2002). Die Trx-R Aktivität ist abhängig vom Redox-Zustand der Zelle. Nach oxidativem Stress wird die TrxR-Aktivität induziert (Nordberg *et al*., 2001).
Um mögliche Effekte von freigesetztem Zink auf die Trx-R-Aktivität untersuchen zu können, wurden mit dem NO-Donor SNOC behandelte HDF gleichzeitig mit spezifischen Zellmembran-permeablen Zinkchelator TPEN behandelt. Die Chelatisierung des freigesetzten Zinks mit TPEN zeigte jedoch keinen Effekt auf die durch NO-Behandlung erhöhte Trx-R-Aktivität. Es ist anzunehmen, dass NO die Trx-R-Aktivität erhöht um in der Zelle entstandene S-S-Gruppen mittels Trx wieder zu reduzieren. Über den molekularen Mechanismus, wie nitrosativer Stress zu einer Erhöhung der Trx-R-Aktivität führt, ist bisher nichts bekannt.

## 4.6 Einfluß des Trx/Trx-R-Systems auf die Reversibilität der intrazellulären Zinkfreisetzung nach nitrosativem Stress

Nitrosativer Stress verursacht eine transiente intrazelluläre Zinkfreisetzung, eine Erhöhung der Expression von reduziertem Trx und eine Erhöhung der Trx-R-Aktivität. Nach diesen Ergebnissen wurde die durch nitrosativen Stress erhöhte Trx-R-Aktivität mittels des spezifischen Trx-R-Hemmstoffs Auranofin (Kaim *et al.*, 1991; Zhong *et al.*, 1998; Gromer *et al.*, 1998) gehemmt und mögliche Wirkungen auf den Wiedereinbau von nach nitrosativem Stress intrazellulär freigesetztem Zink analysiert. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine Auranofin-Vorinkubation eine erhöhte Trx-R-Aktivität in HDF trotz NO-Behandlung hemmen kann (s. Abb 13). Anschließend wurde das Trx-R-Substrat Trx untersucht. Mit WB-Analysen konnte nach der NO-Behandlung eine erhöhte Proteinexpression von reduziertem Trx nachgewiesen werden. Die nach einer Auranofin-Behandlung gehemmte Trx-R-Aktivität bewirkt, dass weniger Trx reduziert wird, was mittels der WB-Analysen auch gefunden wurde (s. Abb 14).
Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass durch eine spezifische Hemmung der Trx-R in den NO-behandelten HDF einen verzögerten Wiedereinbau von intrazellulär freigesetztem Zink im Vergleich zu nur mit NO-behandelten Zellen stattfindet (s. Abb 14). Die Hemmung der Trx-R-Aktivität bewirkt, dass weniger Trx reduziert wird und dadurch zu S-S-Gruppen oxidierte Cysteine von Zinkfingern wieder zu SH-Gruppen reduziert werden und $Zn^{2+}$ in diese Strukturen wieder eingebaut werden kann.

Bisher wurde gezeigt, dass nitrosativer Stress die Zinkhomöostase verändert und die Expression von reduziertem Trx sowie die Trx-R-Aktivität erhöht, um freigesetztes Zink wieder in Proteine einzubauen. Um die Effekte nach nitrosativem Stress besser einordnen zu können, wurde als zusätzliche Stressart der Hitze-Schock untersucht.

### 4.7 Hitze-Schock

Die durchschnittliche Temperatur des menschlichen Körpers beträgt normalerweise selbst bei äußerlichen Temperaturschwankungen etwa 37°C. Bei Fieber, Entzündungsreaktionen, Infektionen, Ischämien oder Krebs erhöht sich die Temperatur auf bis zu 43°C oder sogar noch höher. Steigt die Körpertemperatur über diesen Wert an, so denaturieren Proteine der Körperzellen in einigen Organen, was zu einem multiplen Organversagen führen kann. HS-behandelte Zellen reagieren normalerweise auf Wärmeeinwirkung, indem sie die Transkription und die Translation der meisten Gene einstellen. Es werden jedoch Hitzeschockgene angeschaltet und „Heat-Shock"-Proteine synthetisiert. Diese „Heat-Shock"-Proteine helfen anderen Proteinen bei der Faltung oder bei der Erhaltung ihrer Sekundärstruktur unter HS.
In HDF wurde ein Hitze-Schock (HS) durch 40 Minuten langes Erwärmung der Zellen auf 43°C erzeugt. Nach HS-Behandlung wurde eine transiente intrazelluläre Zinkfreisetzung beobachtet (s. Abb. 16). Im Unterschied zur SNOC-Behandlung wurde erst eine Stunde nach der HS-Behandlung der Höhepunkt der Zinquinfluoreszenz beobachtet, beim nitrosativen Stress war dies breits etwa 30 Minuten nach Behandlung mit 1 mM SNOC der Fall. Eine Reversibilität der Zinkfreisetzung wurde etwa 15 Stunden nach der HS-Behandlung beobachtet im Vergleich zur Reversibilität nach etwa 8 Stunden bei nitrosativem Stress. Der einzige Unterschied zu nitrosativem Stress war also, dass der HS später und länger wirkte. Die gleichen Effekte wurden auch beim Trx/Trx-R-System beobachtet. Auch nach HS-Behandlung wurde eine Erhöhung der Expression von reduziertem Trx (s. Abb 19) und Trx-R-Aktivität (s. Abb. 22) beobachtet. Eine Auranofin-Vorinkubation hemmte bei HS-behandelten HDF genauso wie beim nitrosativen Stress sowohl die Trx-R-Aktivität (s. Abb. 22) als auch die Expression von reduzierten Trx stark (s. Abb 23). Eine Hemmung der Trx-R-Aktivität mit Auranofin verursachte bei mit HS-behandelten HDF erst nach 24 Stunden einen Wiedereinbau des intrazellulär freigesetzten Zinks, während bei nur mit HS-

behandelten Zellen Zink breits nach etwa 15 Stunden wieder eingebaut worden war (s. Abb. 24). Dies zeigt, dass die Trx-R in HS-behandelten Zellen wie nach nitrosativem Stress am Wiedereinbau von freigesetztem Zink in Proteine beteiligt ist.
Insgesamt zeigten die Hitze-Schock-Versuche, dass eine intrazelluläre Zinkfreisetzung im Vergleich zu nitrosativem Stress später eintritt, dafür aber länger wirkt. Gemeinsamkeiten bestehen darin, dass sowohl nitrosativer Stress als auch Hitze-Schock zu einer Veränderung der Zinkhomöostase führen. Beide Stressarten verursachen eine transiente Zinkfreisetzung. Beim nitrosativem Stress werden vermutlich die Cystein-Reste S-nitrosiert und dadurch Zink aus Proteinen freigesetzt. Warum es nach einem HS zu einer vorübergehenden intrazellulären Zinkfreisetzung kommt ist unbekannt. Eine erhöhte Temperatur denaturiert Proteine, was zu einer transienten intazelluläre Freisetzung von Zink aus Proteine führen könnte. Bisher ist nichts publiziert, dass eine HS-Behandlung in Zellen einen oxidativen Stress verursacht.

Als Zusammenfassung können drei Effekte durch nitrosativen Stress aufgelistet werden: ein hemmender Effekt auf die Bindungsaktivität von Zinkfingerstrukturen, eine transiente intrazelluläre Zinkfreisetzung und eine Erhöhung der Expression von reduziertem Trx und der Trx-R-Aktivität. Diese Effekte wurden mit denen einer anderen Stressart, dem Hitze-Schock, verglichen. Dabei wurde beobachtet, dass die Zellen auf Hitze-Schock ähnlich wie auf nitrosativen Stress reagieren. Vermutet wurde auch eine Korrelation zwischen Zinkfreisetzung und dem Trx/Trx-R-System. Dies wurde gezeigt durch die Hemmung der Trx-R-Aktivität, die einen verzögerten Einbau von intrazellulär freigesetztem Zink verursacht. Um eine Korrelation zwischen Zinkfreisetzung und Trx/Trx-R-System weiter untersuchen zu können, sollte die Trx in HDF über exprimiert und beobachtet werden, ob diese Trx-Überexpression den Wiedereinbau von intrazellulär freigesetztem Zink nach Stresssituation beschleunigt.

## 5. Zusammenfassung

Beim Prostatakrebs findet man eine erhöhte iNOS-Proteinexpression in Prostatatumorzellen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine iNOS-Proteinexpression in Prostatatumor-Geweben mit einer Nitrotyrosin-Färbung als einem Marker für nitrosativen Stress korreliert. Dies zeigt, dass die iNOS aktiv war und in Prostatatumorgeweben nitrosativer Stress herrschte. Für *in vitro* Untersuchungen wurde ein Zellkultur-Modell entwickelt, um Wirkungen von nitrosativem Stress auf Prostatatumorzellen untersuchen zu können.

Der Einfluss von nitrosativem Stress auf die DNA-Bindungsaktivität des Androgen-Rezeptors wurde in Prostatakarzinomzellen untersucht. Es zeigte sich, dass NO die DNA-Bindung des Androgen-Rezeptors konzentrationsabhängig hemmt. Da NO die Proliferation von Androgen-Rezeptor-positiven Prostatatumorzellen stärker hemmt als die Proliferation von Androgen-Rezeptor-negativen Prostatatumorzellen, wird die Hypothese aufgestellt, dass nitrosativer Stress einen Selektionsdruck auf Prostatazellen ausübt, Androgen-unabhängig zu proliferieren.

In primären humanen dermalen Fibroblasten wurden Effekte von nitrosativem Stress bzw. von einem Hitze-Schock auf das zelluläre Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase-System untersucht. Beide Stressarten verursachten eine transiente intrazelluläre Zinkfreisetzung, eine erhöhte Expression und nukleäre Translokation von Thioredoxin und eine erhöhte Aktivität der Thioredoxin-Reduktase 1. Eine Hemmung der Thioredoxin-Reduktase-Aktivität bewirkte sowohl nach nitrosativem Stress als auch nach einem Hitze-Schock einen verzögerten Wiedereinbau von intrazellulär freigesetztem Zink. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase-System an der Reparatur intrazellulärer Zinkfinger beteiligt ist.

## 6. Summary

The iNOS protein is expressed in many human cancers. This study shows that staining for iNOS in human prostate cancer biopsies correlates with staining for nitrotyrosine, a marker for nitrosative stress, suggesting that the iNOS was active. In addition, treatment of prostate cancer cells with a NO donor also leads to intracellular nitrotyrosine formation showing that this *in vitro* cell culture system is a model to investigate effects of nitrosative stress in prostate tumors.

*In vitro* NO inhibits the androgen-dependent DNA-binding activity of the androgen receptor in prostate tumor cells in a concentration-dependent manner. As NO inhibits the proliferation of androgen receptor-positive prostate tumor cells much more than the proliferation of androgen receptor-negative prostate tumor cells, these findings suggest that intratumoral iNOS activity supports the development of prostate cancer cells that are able to proliferate androgen receptor-independently, thereby promoting prostate tumor progression.

In primary human dermal fibroblasts effects of nitrosative stress as well as of a heat shock on the cellular thioredoxin/thioredoxin-reductase system were investigated. Both types of stress induced a transient intracellular zinc release, an increased expression and nuclear translocation of thioredoxin and an enhanced activity of the thioredoxin-reductase 1. Inhibition of the thioredoxin-reductase was found to induce a delayed built-in of intracellular zinc. These results suggest that the thioredoxin/thioredoxin-reductase system is involved in the repair of destroyed intracellular zincfingers.

## 7. Literaturverzeichnes

**Aaltoma SH**, **Lipponen PK**, **Kosma VM**. **(2001)** Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and its prognostic value in prostate cancer. Anticancer Res;21(4B):3101-6.

**Akamatsu Y, Ohno T, Hirota K, Kagoshima H, Yodoi J, Shigesada K (1997)** Redox regulation of the DNA binding activity in transcription factor PEBP2. The roles of two conserved cysteine residues.J Biol Chem; 272(23):14497-500

**Ambs S**, **Merriam WG**, **Bennett WP**, **Felley-Bosco E**, **Ogunfusika MO**, **Oser SM**, **Klein S**, **Shields PG**, **Billiar TR**, **Harris CC**. **(1998)** Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. Cancer Res;58(2):334

**Andersson M**, **Gunne H**, **Agerberth B**, **Boman A**, **Bergman T**, **Olsson B**, **Dagerlind A**, **Wigzell H**, **Boman HG**, **Gudmundsson GH**. **(1996)** NK-lysin, structure and function of a novel effector molecule of porcine T and NK cells.Vet Immunol Immunopathol;54(1-4):123-6.

**Appleton I, Tomlinson A, Willoughby DA**. **(1996)** Induction of cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. Adv Pharmacol;35:27-78. Review.

**Arai MH**, **Duarte AJ**, **Natale VM**. **(2006)** Nitrit oxide induces thioredoxin-1 nuclear translocation: Possible association with the p21 Ras survival pathway. Biochem.Biophys;6;348(4):1254-60

**Aravindakumar,CT, Ceulemans,J. & De Ley,M. (1999)** Nitric oxide induces $Zn^{2+}$ 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 bylipopolysaccharide. Res.Commun.Mol.Pathol.Pharmacol; 90, 49-58.

**Arnér,ES. (1999)** Superoxide production by dinitrophenyl-derivatized thioredoxin reductase--a model for the mechanism and correlation to immunostimulation by dinitrohalobenzenes. Biofactors;10(2-3):219-26.

**Baker A, Payne CM, Briehl MM, Powis G. (1997)** Thioredoxin, a gene found overexpressed in human cancer, inhibits apoptosis in vitro and in vivo. Cancer Res;57(22):5162-7.

**Baltaci S, Orhan D, Gögüs C, Türkölmez K, Tulunay O, Gögüs O**. **(2001)** Inducible nitric oxide synthase expression in benign prostatic hyperplasia, low- and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. BJU Int.(1):100-103

**Bayreuther K, Francz PI, Gogol J, Kontermann K**. **(1992)** Terminal differentiation, aging, apoptosis, and spontaneous transformation in fibroblast stemm cell systems in vivo and in vitro. Ann. N.Y. Acad. Sci. 663: 167-179.

**Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA & Freeman BA. (1990)** Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 87, 1620-1624.

**Berendji-Grün D, Kolb-Bachofen V & Kroncke KD. (2001)** Nitric oxide inhibits endothelial IL-1[beta]-induced ICAM-1 gene expression at the transcriptional level decreasing Sp1 and AP-1 activity**.** Mol.Med., 7, 748-754.

**Berendji D, Kolb-Bachofen V, Meyer KL, Grapenthin O, Weber H, Wahn V & Kroncke KD. (1997)** Nitric oxide mediates intracytoplasmic and intranuclear zinc release. FEBS Lett., 405, 37-41.

**Berendji D, Kolb-Bachofen V, Zipfel PF, Skerka C, Carlberg C & Kroncke KD. ( 1999)** Zinc finger transcription factors as molecular targets for nitric oxide- mediated immunosuppression: inhibition of IL-2 gene expression in murine lymphocytes. Mol.Med. 1999, 5, 721-730.

**Berg JM & Godwin HA. (1997)** Lessons from zinc-binding peptides. Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct., 26, 357-371.

**Bertini R. (1999)** Thioredoxin, a redox enzyme released in infection and inflammation, is a unique chemoattractant for neutrophils, monocytes, and T cells. J. Exp. Med.;189(11):1783-9

**Bouchama A. (2002)** Heat stroke. N Engl J Med.;346(25):1978-88. Review.

**Bronte V**, **Kasic T**, **Gri G**, **Gallana K**, **Borsellino G**, **Marigo I**, **Battistini L**, **Iafrate M**, **Prayer-Galetti T**, **Pagano F**, **Viola A**. **(2005)** Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. J Exp Med.;201(8):1257-68.

**Brown KH, Peerson JM, Rivera J & Allen LH. (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.

**Buchner J. (2002)** Introduction: the cellular protein folding machinery. Cell Mol. Life Sci 59., 1587-1588

**Burnette, WM. (1981)** "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal. Biochem.;112(2):195-203

**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. Journal of Biological Chemistry, 269; 24878-24882.

**Coleman JE. (1992)** Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. Annu.Rev.Biochem., 61, 897-946.

**Cooke JP & Tsao PS. (1993)** Cytoprotective effects of nitric oxide. Circulation, 88; 2451-2454.

**Cronauer MV**, **Ince Y**, **Engers R**, **Rinnab L**, **Weidemann W**, **Suschek CV**, **Burchardt M, Kleinert H, Wiedenmann J**, **Sies H**, **Ackermann R**, **Kröncke KD**. **(2006)** Nitric oxide-mediated inhibition of androgen receptor activity: possible implications for prostate cancer progression. Oncogene.;26(13):1875-84.

**Dardenne M. (2002)** Zinc and immune function. Eur.J.Clin.Nutr., 56 Suppl 3, S20-S23.

**Das UN. (1999)** Essential fatty acids, lipid peroxidation and apoptosis. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.;61(3):157-63. Review

**Dematte JE**, **del Cerro M**, **Grover DA**, **Monjan AA**, **Pfau CJ**. **(1982)** Chronic retinitis in rats infected as neonates with lymphocytic choriomeningitis virus: a clinical, histopathologic, and electroretinographic study. Invest Ophthalmol Vis Sci. (6):697-714

**Didier C**, **Kerblat I**, **Drouet C**, **Favier A**, **Béani JC**, **Richard MJ**. **(2001)** Induction of thioredoxin by ultraviolet-A radiation prevents oxidative-mediated cell death in human skin fibroblasts. Free Radic Biol Med. 1;31(5):585-98.

**Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM**. **(1997)** Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. Circ Res.;81(6):970-6.

**Ekmekcioglu S, Tang CH, Grimm EA**. **(2005)** NO news is not necessarily good news in cancer. Curr Cancer Drug Targets.;5(2):103-15. Review

**Fleischmajer R, Perlish JS, Burgeson RE, Shaikh-Bahai F, Timpl R (1992)** Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 580: 161-175.

**Endre L, Beck FW & Prasad AS**. **(1990)** The role of zinc in human health. J.Trace Elem.Exp.Med., 3, 337.

**Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I & Kleinert H. (1994)** Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. Hypertension 23: 1121-1131.

**Fraker PJ & King LE. (2001)** A distinct role for apoptosis in the changes in lymphopoiesis and myelopoiesis created by deficiencies in zinc. FASEB J., 15, 2572-2578.

**Fraker PJ, King LE, Laakko T & Vollmer TL. (2000)** The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. Journal of Nutrition, 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.

**Gaither LA**, **Eide DJ**. **(2001)** The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erythroleukemia cells. J Biol Chem: 276(25):22258-64.

**Gaither,L.A, Eide, D.J. (2000)** Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. J Biol Chem. 25;275

**Garbán HJ, Bonavida B. (2001)** Nitric oxide inhibits the transcription repressor Yin-Yang 1 binding activity at the silencer region of the Fas promoter: a pivotal role for nitric oxide in the up-regulation of Fas gene expression in human tumor cells.
J Immunol.;167(1):75-81.

**Garbán HJ, Márquez-Garbán DC, Pietras RJ, Ignarro LJ. (2005)** Rapid nitric oxide-mediated S-nitrosylation of estrogen receptor: regulation of estrogen-dependent gene transcription. Proc Natl Acad Sci U S A.;102(7):2632-6.

**Gasdaska PY. (1999)** Cloning, sequencing and functional expression of a novel human thioredoxin reductase. FEBS Lett.;442(1):105-11.

**Gitan RS, Luo H, Rodgers J, Broderius M, Eide D. (1998)** Zinc-induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. J Biol Chem;273(44):28617-24

**Gopalakrishna R, Chen ZH & Gundimeda U. (1993)** Nitric oxide and nitric oxide-generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol ester binding. Journal of Biological Chemistry**,** 268, 27180-27185.

**Gromer S**, **Wissing J**, **Behne D**, **Ashman K**, **Schirmer RH**, **Flohé L**, **Becker K**. **(1998)** A hypothesis on the catalytic mechanism of the selenoenzyme thioredoxin reductase. Biochem J.,1;332 ( Pt 2):591-2. No abstract available.

**Grotz N**, **Fox T**, **Connolly E**, **Park W**, **Guerinot ML**, **Eide D**. **(1998)** Identification of a family of zinc transporter genes from Arabidopsis that respond to zinc deficiency.
Proc Natl Acad Sci U S A.;95(12):7220-4.

**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.

**Haendeler J, Weiland U, Zeiher AM, Dimmeler S. (1997)** Effects of redox-related congeners of NO on apoptosis and caspase-3 activity. Nitric Oxide.;1(4):282-93.

**Haendeler J, Hoffmann J, Tischler V, Berk BC, Zeiher AM, Dimmeler S. (2002)**
Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. Nat Cell Biol. 4(10):743-9.

**Haendeler J. (2006)** Thioredoxin-1 and posttranslational modifications.
Antioxid Redox Signal. (9-10):1723-8. Review.

**Henry Y, Lepoivre M, Drapier JC, Ducrocq C, Boucher JL & Guissani A. (1993)** EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. FASEB J., 7, 1124-1134.

**Hibbs JB, Jr Taintor RR & Vavrin Z. (1987)** Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. Science, 235, 473-476.

**Hibbs JB, Jr Taintor RR, Vavrin Z & Rachlin EM. (1998)** Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. Biochem.Biophys.Res.Commun., 157,87-94.

**Hirota K, Murata M, Sachi Y, Nakamura H, Takeuchi J, Mori K, Yodoi J. (1999)** Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB.J. Biol. Chem;274(39):27891-7

**Hirota K. (1997)** AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1.Proc Natl Acad Sci U S A.;94(8):3633-8.

**Hoffman RA, Langrehr JM, Wren SM, Dull KE, Ildstad ST, McCarthy SA & Simmons RL. (1993)** Characterization of the immunosuppressive effects of nitric oxide in graft vs host disease. **J.Immunol., 151**, 1508-1518.

**Holmgren A. (1996)** Antiangiogenis restricted tumor dormancy. Cancer Metastasis Rev.;15(2):241-5. Review. No abstract available.

**Holmgren A. (1989)** Thioredoxin and glutaredoxin systems. J Biol Chem.;264(24):13963-6. Review. No abstract available

**Holmgren M. (1998)** The activation gate of a voltage-gated K+ channel can be trapped in the open state by an intersubunit metal bridge. Neuron.;21(3):617-21.

**Hongo F, Garban H, Huerta-Yepez S, Vega M, Jazirehi AR, Mizutani Y, Miki T, Bonavida B. (2005)** Inhibition of the transcription factor Yin Yang 1 activity by S-nitrosation. Biochem Biophys Res Commun.;336(2):692-701.

**Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, & 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.

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

**Jaiswal M, LaRusso NF, Gores GJ. (2001)** Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.

**Jirakularpon T & Muslin AJ. (2004)** Cation diffusion facilitator proteins modulate Raf-1 activity. J. Biol. Chem.;279(26):27807-15.

**Kagi JH. (1991)** Overview of metallothionein. Methods Enzymol., 205, 613-626.

**Kagi JH & Kojima Y. (1987)** Chemistry and biochemistry of metallothionein. Experientia Suppl: 52, 25-61.

**Kagi JH & Schaffer A. (1998)** Biochemistry of metallothionein. Biochemistry: 27, 8509-8515.
**Kahlos K, Zhang J, Block ER, Patel JM. (2003)** Thioredoxin restores nitric oxide-induced inhibition of protein kinase C activity in lung endothelial cells. Mol Cell Biochem.;254(1-2):47-54

**Kambe T**, **Narita H**, **Yamaguchi-Iwai Y**, **Hirose J**, **Amano T**, **Sugiura N**, **Sasaki R**, **Mori K**, **Iwanaga T**, **Nagao M**. **(2002)** Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic beta cells. J Biol Chem;277(21):19049-55.

**Kang SI, Bae YH. (2003)** A sulfonamide based glucose-responsive hydrogel with covalently immobilized glucose oxidase and catalase. J Control Release.;86(1):115-21.

**Keefer LK, Wink DA. (1996)** Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer.Biol Reprod. 54(1):100-10.

**Kim HY, Gladyshev VN. (2004)** Methionine sulfoxide reduction in mammals: characterization of methionine-R-sulfoxide reductases. Mol Biol Cell. (3):1055-64. Epub 2003 Dec

**King JC. (1990)** Assessment of zinc status. Journal of Nutrition, 120 Suppl 11, 1474-1479.

**King JC, Shames DM & Woodhouse LR (2000)** Zinc homeostasis in humans. Journal of Nutrition, 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. Journal of Nutrition, 132, 974-979.

**Kirschke CP, Huang L. (2003)** A novel mammalian zinc transporter, accumulates zinc in the Golgi apparatus. J. Biol. Chem. 278, 4096-4102

**Klotz T, Bloch W, Volberg C, Engelmann U, Addicks K. (1998)** Selective expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate carcinoma.Cancer.;82(10):1897-903.

**Klug A & Schwabe JW. (1995)** Protein motifs 5. Zinc fingers. FASEB J., 9, 597-604.

**Knochel W. (1994)** Induction of erythropoiesis in the amphibian embryo. Ann N Y Acad Sci.;718:125-39. Review

**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.

**Kröncke KD. (1998)** Inducible nitric oxide synthase in human diseases. Clin Exp Immunol.;113(2):147-56. Review

**Kröncke KD. (2001a)** Cystein-$Zn^{2+}$ complexes: unique molecular switches for inducible nitric oxide synthase-derived NO. FASEB J 15(13):2503-7.

**Kröncke KD. (2001b)** Zinc finger proteins as molecular targets for nitric oxide-mediated gene regulation. Antioxid.Redox.Signal., 3, 565-575.

**Kröncke KD & 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 KD, 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 KD, Fehsel K & Kolb-Bachofen V. (1997)** Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where? Nitric.Oxide., 1, 107-120.

**Kröncke KD, Fehsel K & Kolb-Bachofen V. (1998)** Inducible nitric oxide synthase in human diseases. Clin.Exp.Immunol., 113, 147-156.

**Kröncke KD, Fehsel K, Schmidt T, Zenke FT, Dasting I, Wesener JR, Bettermann H, Breunig KD & 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 KD, Klotz LO, Suschek CV & Sies H. (2002)** Comparing nitrosative versus oxidative stress toward zinc finger- dependent transcription. Unique role for NO. Journal of Biological Chemistry: 277, 13294-13301.

**Kubes P, Suzuki M & Granger DN. (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.

**Kury S, Devilder MC, Avet-Loiseau H, Dreno B & Moisan JP. (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 JP. (2002)** Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica. Nat.Genet.: 31, 239-240.

**Landino LM, Iwig JS, Kennett KL, Moynihan KL. (2004)** Repair of peroxynitrite damage to tubulin by the thioredoxin reductase system.Free Radic Biol Med.;36(4):497-506.

**Landino LM, Skreslet TE, Alston JA. (2004)** Cysteine oxidation of tau and microtubule-associated protein-2 by peroxynitrite: modulation of microtubule assembly kinetics by the thioredoxin reductase system.J Biol Chem.;279(33):35101-5. Epub 2004 Jun 7.

**Laurent M, Lepoivre M & Tenu JP. (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.

**Loscalzo J & Welch G. (1995)** Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. Prog.Cardiovasc.Dis.: 38 , 87-104.

**Lowenstein CJ, Dinerman JL & Snyder SH. (1994)** Nitric oxide: a physiologic messenger. Ann.Intern.Med.: 120, 227-237.

**Lundström-Ljung J, Holmgren A. (1995)** Glutaredoxin accelerates glutathione-dependent folding of reduced ribonuclease A together with protein disulfide-isomerase. J Biol Chem.;270(14):7822-8.

**Luthman M, Holmgren A. (1982)** Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. Biochemistry.;21(26):6628-33

**MacDonald RS. (2000)** The role of zinc in growth and cell proliferation. Journal of Nutrition, 2000: 130, 1500S-1508S.

**Makino Y, Yoshikawa N, Okamoto K, Hirota K, Yodoi J, Makino I, Tanaka H. (1999)** Direct association with thioredoxin allows redox regulation of glucocorticoid receptor function.J Biol Chem.;274(5):3182-8.

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

**Maret W, Jacob C, Vallee BL & Fischer EH. (1999)** Inhibitory sites in enzymes: zinc removal and reactivation by thionein. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A,: 96, 1936-1940.

**Maret W, Larsen KS & Vallee BL. (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 BL. (1998)** Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A,: 95, 3478-3482.

**Marletta MA, Hurshman AR & Rusche KM (1998)** Catalysis by nitric oxide synthase. Curr.Opin.Chem.Biol.: 2, 656-663.

**Marnett LJ. (2003)** Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. J Clin Invest.;111(5):583-93. Review. No abstract

**Marshall HE, Merchant K & Stamler JS. (2000)** Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. FASEB J.: 14, 1889-1900.

**McMahon RS und Cousins RJ. (1998)** Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc. Proc Natl Acad Sci U S A.;95(9):4841-6.

**Michalaki V, Syrigos K, Charles P, Waxman J. (2004)** Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. Br J Cancer.;90(12):2312-6.

**Misra RR, Hochadel JF, Smith GT, Cook JC, Waalkes MP & Wink DA. (1999)** Evidence that nitric oxide enhances cadmium toxicity by displacing the metal from metallothionein. Chem.Res.Toxicol.: 9, 326-332.

**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.

**Mustacich D. (2000)** Thioredoxin reductase. Biochem J.;346 Pt 1:1-8. Review.

**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.

**Nelson WG, De Marzo AM, DeWeese TL, Isaacs WB. (2004)** The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer. J Urol.;172(5 Pt 2):S6-11; discussion S11-2. Review

**Nies DH. (2003)** Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FEMS Microbiol Rev.;27(2-3):313-39. Review

**Nordberg J, Arnér ES. (2001)** Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system.Free Radic Biol Med.;31(11):1287-312. Review.

**Oblong JE, Powis G. (1993)** A comment on the absence of calcium regulation of human thioredoxin reductase.FEBS Lett.;334(1):1-2.

**Osborne SA, Tonissen KF. (2001)** Genomic organisation and alternative splicing of mouse and human thioredoxin reductase 1 genes.BMC Genomics.;2(1):10.

**Palmiter RD. (2004)** Protection against zinc toxicity by metallothionein and zinc transporter 1. Proc Natl Acad Sci U S A.;101(14):4918-23.

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

**Palmiter RD, Sandgren EP, Koeller DM & Brinster RL (1993)** Distal regulatory elements from the mouse metallothionein locus stimulate gene expression in transgenic mice. Mol.Cell Biol.,: 13, 5266-5275.

**Park HS, Huh SH, Kim MS, Lee SH, Choi EJ. (2000)** Nitric oxide negatively regulates c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase by means of S-nitrosylation. Proc Natl Acad Sci U S A.;97(26):14382-7.

**Patenaude AF**, **Guttmacher AE**, **Collins FS**. **(2003)** Psychologists' contributions to the genetic revolution. Am Psychol.;58(4):319-20. No abstract available

**Paulsen IT, Saier MH Jr. (1997)** A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. J Membr Biol.;156(2):99-103. Review

**Peng HB, Spiecker M & Liao JK. (1998)** Inducible nitric oxide: an autoregulatory feedback inhibitor of vascular inflammation. J.Immunol: 161, 1970-1976.

**Persans MW. (2000)** Possible molecular mechanisms involved in nickel, zinc and selenium hyperaccumulation in plants. Biotechnol Genet Eng Rev.;17:389-413. Review.

**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.

**Pinna K, Kelley DS, Taylor PC & King JC. (2002)** Immune functions are maintained in healthy men with low zinc intake. Journal of Nutrition: 132, 2033-2036.

**Powell SR. (2000)** The antioxidant properties of zinc. Journal of Nutrition: 130, 1447S-1454S.

**Powis G, Mustacich D, Coon A. (2000)** The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer.Free Radic Biol Med.;29(3-4):312-22. Review.

**Radja N & Charles-Holmes R. (2002)** Acrodermatitis enteropathica - lifelong follow-up and zinc monitoring. Clin.Exp.Dermatol.: 27, 62-63.

**Richards MP. (1989)** Recent developments in trace element metabolism and function: role of metallothionein in copper and zinc metabolism. Journal of Nutrition: 119, 1062-1070.

**Richards MP & Cousins RJ. (1975)** Mammalian zinc homeostasis: requirement for RNA and metallothionein synthesis. Biochem.Biophys.Res.Commun.: 64, 1215-1223.

**Richards RI, 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.

**Rogers KR. (2000)** Principles of affinity-based biosensors. Mol Biotechnol.;14(2):109-29. Review

**Roth HP & Kirchgessner M (1999)** Diagnosis of zinc deficiency. Z.Gerontol.Geriatr: 32 Suppl 1, I55-I63.

**Rundlöf AK, Arnér ES. (2004)** Regulation of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 in relation to cellular phenotype, growth, and signaling events. Antioxid Redox Signal.;6(1):41-52. Review

**Rundlöf AK, Carlsten M, Arnér ES. (2001)** The core promoter of human thioredoxin reductase 1: cloning, transcriptional activity, and Oct-1, Sp1, and Sp3 binding reveal a housekeeping-type promoter for the AU-rich element-regulated gene. J Biol Chem. ;276(32):30542-51.

**Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, Ichijo H. (1998)** Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. EMBO J.;17(9):2596-606.

**Salvemini D, Settle SL, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG & Needleman P. (1995)** Regulation of prostaglandin production by nitric oxide; an in vivo analysis. Br.J.Pharmacol.: 114, 1171-1178.

**Schenk,H. (1996)** Thioredoxin as a potent costimulus of cytokine expression. J Immunol.;156(2):765-71.

**Schmidt HH, Walter U & Kochsiek K. (1997)** Formation and effects of nitrogen monoxide (NO) in the vascular system. Internist (Berl): 38, 406-410.

**Sehgal VN & Jain S. (2000)** Acrodermatitis enteropathica. Clin.Dermatol.: 18, 745-748.

**Seve M, Chimienti F, Devergnas S, Favier A. (2004)** In silico identification and expression of SLC30 family genes: an expressed sequence tag data mining strategy for the characterization of zinc transporters' tissue expression. BMC Genomics.;5(1):32.

**Snitsarev V, Budde T, Stricker TP, Cox JM, Krupa DJ, Geng L, Kay AR. (2001)** Fluorescent detection of Zn(2+)-rich vesicles with Zinquin: mechanism of action in lipid environments. Biophys J.;80(3):1538-46

**Steinbrenner H, Bilgic E, Alili L, Sies H, Brenneisen P. (2006)** Selenoprotein P protects endothelial cells from oxidative damage by stimulation of glutathione peroxidase expression and activity. Free Radic Res.;40(9):936-43.

**Stuehr DJ, Kwon NS & Nathan CF. (1990)** FAD and GSH participate in macrophage synthesis of nitric oxide. Biochem.Biophys.Res.Commun.: 168, 558-565.

**Stuehr DJ & Nathan CF. (1998)** Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. J.Exp.Med.: 169, 1543-1555.

**Tamir,S. und Tannebaum, S.R. (1996)** The role of nitric oxide (NO.) in the carcinogenic process.Biochim Biophys Acta.;1288(2):F31-6. Review.

**Tamura T, Shirai T, Kosaka N, Ohmori K, Takafumi N. (2002)** Pharmacological studies of diacerein in animal models of inflammation, arthritis and bone resorption. Eur J Pharmacol.;448(1):81-7.

**Thomsen LL, Miles DW. (1998)** Role of nitric oxide in tumour progression: lessons from human tumours. Cancer Metastasis Rev.;17(1):107-18. Review.

**Wang J, Torbenson M, Wang Q, Ro JY, Becich M. (2003)** Expression of inducible nitric oxide synthase in paired neoplastic and non-neoplastic primary prostate cell cultures and prostatectomy specimen. Urol Oncol.;21(2):117-22.

**Wang K, Zhou B, Kuo YM, 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 RA & Danner RL. (1999)** A Sp1 binding site of the tumor necrosis factor alpha promoter functions as a nitric oxide response element. Journal of Biological Chemistry: 274, 33190-33193.

**Wegele H. (2004)** Hsp70 and Hsp90 - a relay team for protein folding. Rev Physiol. Biochem. Pharmacol. 151, 1-44

**Weiland U, Haendeler J, Ihling C, Albus U, Scholz W, Ruetten H, Zeiher AM, Dimmeler S. (2000)** Inhibition of endogenous nitric oxide synthase potentiates ischemia-reperfusion-induced myocardial apoptosis via a caspase-3 dependent pathway. Cardiovasc Res.;45(3):671-8.

**Wink DA & Mitchell JB. (1998)** Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. Free Radic.Biol.Med.: 25, 434-456.

**Wink DA, Nims RW, Darbyshire JF, Christodoulou D, Hanbauer I, Cox GW, Laval F, Laval J, Cook JA, Krishna MC. (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.

**Wu FY, Huang,WJ, Sinclair RB & Powers L. (1996)** The structure of the zinc sites of Escherichia coli DNA-dependent RNA polymerase. Journal of Biological Chemistry: 267, 25560-25567.

**Wu FY & Wu CW. (1987)** Zinc in DNA replication and transcription. Annu.Rev.Nutr.: 7, 251-272.

**Zamora R, Vodovotz Y & Billiar TR. (2000)** Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. Mol.Med.: 6, 347-373.

**Zeng J, Vallee BL & Kagi JH (1991)** Zinc transfer from transcription factor IIIA fingers to thionein clusters. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.: 88, 9984-9988.

**Zhao H & Eide (a) (1996)** The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem.: 271(38):23203-10.

**Zhao H & Eide D. (b) (1996)** The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. Proc Natl Acad Sci U S A.: 93(6):2454-8.

**Zhong L, Arnér ES, Ljung J, Aslund F, Holmgren A. (1998)** Rat and calf thioredoxin reductase are homologous to glutathione reductase with a carboxyl-terminal elongation containing a conserved catalytically active penultimate selenocysteine residue. J Biol Chem.;273(15):8581-91.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| **Abb.** | Abbildung |
| **AK** | Antikörper |
| **APS** | Ammoniumpersulfat |
| **AR** | Androgen-Rezeptor |
| **ARE** | Androgen-Response-Element |
| **AU** | Auranofin |
| **BHT** | 2, 6-butyliertes Hydroxytoluen |
| **bp** | Basenpaare |
| **BSA** | Bovine serum albumine |
| **DAPI** | Bisbenzimid |
| **DEA/NO** | Natrium (Z)-1-(N,N-Diethylamino)diazen-1-ium-1,2-diolat |
| **DETA** | Diethylenetriamine |
| **DETA/NO** | (Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammoniumethyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolat (NO-Donor) |
| **DETA/NO$_{-NO}$** | denitrosiertes DETA/NO |
| **DMEM** | Eagle´s Medium, nach Dublecco`s Modifikation |
| **DMSO** | Dimethylsulfoxid |
| **DPI** | Diphenyliodonium |
| **DTT** | Dithiothreitol |
| **EDTA** | Ethylendiamintetraacetat |
| **eNOS** | endothelial Stickstoffmonoxid-Synthase |
| **FCS** | fötales Kälberserun |
| **HDF** | humane dermale Fibroblasten |
| **HEPES** | N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N´-(2-ethylsulfonsäure) |
| **HS** | Hitze Shock |
| **IFN- γ** | Interferon-γ |
| **IL-1ß** | Interleukin-1β |
| **iNOS** | induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase |
| **KCL** | Kaliumchlorid |
| **MeOH** | Methanol |
| **$MgCl_2$** | Magnesiumchlorid |
| **mM** | mMol/L |

| | |
|---|---|
| **mm** | Millimeter |
| **NAC** | N-acetyl-L-cystein |
| **NaCl** | Natriumchlorid |
| **$Na_2HPO_4$** | Natriumhydrogenphosphat |
| **nM** | nmol/L |
| **nm** | Nanometer |
| **µm** | Mikrometer |
| **µM** | µMol/L |
| **NO** | Stickstoffmonoxid |
| **nNOS** | neuronal Stickstoffmonoxid-Synthase |
| **PBS** | Phosphate buffered saline |
| **ROS** | Reaktive Sauerstoffspezies |
| **rpm** | Rotationen pro Minute |
| **s.** | siehe |
| **SC** | Solution control (Lösungsmittelkontrolle) |
| **SDS** | Natriumdodecylsulfat |
| **SN** | Supernatant (Zellüberstand) |
| **SNOC** | S-nitrosocysteine |
| **Tab.** | Tabelle |
| **TBST** | Tris-gepufferte isotonische Salzlösung mit 0,1% (v/v) TritonX100 |
| **TEMED** | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| **TF** | Transkriptionsfaktor |
| **TPEN** | N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine |
| **Trx** | Thioredoxin |
| **Trx-R** | Thioredoxin-Reduktase |
| **TNF-α** | Tumornekrosefaktor-α |

## Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Professor Dr. Klaus Dietrich Kröncke für die Überlassung des überaus interessanten Themas bedanken. Er hat mir nicht nur die Möglichkeit gegeben, diese Arbeit in seinem Labor anzufertigen, sondern stand mir stets unterstützend zur Seite und hatte immer gute und interessante Anregungen, die mir bei der Durchführung meiner Arbeit sehr hilfreich waren. In seinem Labor habe ich gelernt, was wissenschaftliches Arbeiten heißt. Vielen Dank für die hervorragende Betreuung.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Universitätsprofessor Dr. Dr. Helmut Sies für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut durchführen zu können.

Herrn Universitätsprofessor Dr. Frank Wunderlich (Institut für Molekulare Parasitologie) danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Bei Herr Dr. Erich Jermann möchte ich mich ganz herzlich für die angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Elvis Pirev, Dr. Bahar Cat, Dr. Lirija Alili, Dr. Dragana Mitic und Dr. Holger Steinbrenner, für die kreativen Diskussionen und fachlichen Hinweise.

Ein sehr herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die mich während des Studiums und der Doktorarbeit die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinem Freund Gunnar Mengel danke ich von ganzem Herzen, dass er mit seiner unendlichen Liebe und Geduld besonders in schwierigen Phasen unterstützt hat. Ohne Dich hätte ich es nicht geschafft!

## Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst habe, keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe. Alle Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, wurden als Entlehnung kenntlich gemacht.

Düsseldorf, 16. Dezember 2007

_____

Yasemin Ince