

Diplomarbeit

Titel der Diplomarbeit

Zink-induzierte Signaltransduktion innerhalb des MAPK-Signalweges in unterschiedlichen Differenzierungsstadien humaner CaCo2-Zellen

Angestrebter akademischer Grad

Magister/Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Verfasser/in:	Elena Patricia Ponath
Matrikelnummer:	0402543
Studienrichtung:	Ernährungswissenschaften
Betreuer:	Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. Manfred Hüttinger

Wien, am 22.5.2009

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen Menschen bedanken, die mir das Studium der Ernährungswissenschaften ermöglicht und mich im weiteren Sinne motiviert und unterstützt haben.

In erster Linie gilt mein Dank meinem Betreuer, Prof. Manfred Hüttinger, welcher mir den Laborplatz zur Verfügung stellte und durch dessen Hilfe meine Powerpoint-Präsentationen guten Anklang beim Publikum fanden.

Weiters danke ich Dr. Nina Brandl und Mag. Adolf Zemann für die nette und motivierende Betreuung während meines Aufenthalts im Labor und für die Geduld, die sie mir im Zuge scheinbar unlösbarer rechnerischer und anderwärtiger Probleme entgegen brachten.

Privat möchte ich meinen Eltern, MMag. Karl und Mag. Paula Ponath, für die finanzielle Ermöglichung des Studiums und die immerwährende seelische Unterstützung bis hin zu einem erfolgreichen Abschluss (in Mindeststudienzeit) bedanken.

Die Motivation und der gute Zuspruch seitens meiner Freunde und Freundinnen, sowie das Lob von Verwandten und Bekannten haben mich dazu angespornt meine Grenzen zu überschreiten und alles „aus mir heraus zu holen“.

Der positive Zuspruch von allen Seiten beflügelt mich, tiefer in die Wissenschaft vorzudringen und dabei die Freude an der Arbeit zu bewahren.

I. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung

2. Literaturübersicht

2.1. Zink

2.1.1. Aufgaben von Zink in der Zelle

2.1.2. Aufrechterhaltung der Zinkhomöostase durch Zinktransporter und intrazelluläre Speichermöglichkeiten

2.1.3. Signalübermittlung vom Extrazellulärraum in die Zelle

2.1.4. Zink und Zellzyklus

2.2. MAPK-Pathway

2.2.1. Ras/MEK/ERK

2.2.2. MLK/MEKK/MKK/SAPK-JNK

2.2.3. MLK/MKK/p38

2.3. Zellmotilität

2.4. Zell-Zell-Kontakt

3. Material und Methoden

3.1. Zellkultur

3.1.1. Zelllinie

3.1.2. Sterile Arbeitsbedingungen

3.1.3. Herstellung des Kulturmediums

3.1.4. Zellzüchtung

3.1.5. Bestimmung der Zellzahl

3.1.6. Inkubation der CaCo2-Zellen mit Zink

3.2. Probenvorbereitung

3.2.1. Zellyse

3.3. Proteinbestimmung mittels Photometer

3.4. Western Blot

3.4.1. SDS-Gel Elektrophorese

3.4.2. Western Blot Transfer

3.4.3. Immunodetektion

3.5. Kristallviolett-Färbung

3.5.1. Inkubation mit Zink

3.5.2. Färbung der CaCo2-Zellen

3.5.3. Photometrische Messung der Farbintensität

4. Ergebnisse

4.1. Signaltransduktion

4.1.1. Präkonfluente, undifferenzierte CaCo2-Zellen

4.1.2. Postkonfluente, differenzierte CaCo2-Zellen

4.2. Adäsionstests mit Kristallviolett

4.2.1. Undifferenzierte, präkonfluente CaCo2-Zellen nach 4-Stunden-Inkubation

4.2.2. Undifferenzierte, präkonfluente CaCo2-Zellen nach 12-Stunden-Inkubation

4.2.3. Undifferenzierte, präkonfluente CaCo2-Zellen nach 24-Stunden-Inkubation

4.2.4. Differenzierte, postkonfluente CaCo2-Zellen nach 24-Stunden-Inkubation

4.2.5. Differenzierte, postkonfluente CaCo2-Zellen nach 72-Stunden-
Inkubation

5. Diskussion

6. Zusammenfassung

7. Abstract

8. Literaturverzeichnis

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Abbildung des MAPK-Pathways	15
Abbildung 2: Darstellung des Zell-Zell-Kontaktes	19
Abbildung 3a: Western Blot Signale von undifferenzierten CaCo2-Zellen nach einer einstündigen Inkubation mit ansteigenden Zinkkonzentrationen	38
Abbildung 3b: Relative Aktivierung von ERK1 und ERK2 nach einer einstündigen Inkubation mit ansteigenden Zinkkonzentrationen	38
Abbildung 4a: Western Blot Signale von undifferenzierten CaCo2-Zellen nach einer vierstündigen Inkubation mit ansteigenden Zinkkonzentrationen	39
Abbildung 4b: Relative Aktivierung von ERK1 und ERK2 nach einer vierstündigen Inkubation mit ansteigenden Zinkkonzentrationen	40
Abbildung 5a: Western Blot Signale von differenzierten CaCo2-Zellen nach einer einstündigen Inkubation mit ansteigenden Zinkkonzentrationen	41
Abbildung 5b: Relative Aktivierung von ERK1 und ERK2 nach einer einstündigen Inkubation mit ansteigenden Zinkkonzentrationen	42
Abbildung 6a: Western Blot Signale von differenzierten CaCo2-Zellen nach einer vierstündigen Inkubation mit ansteigenden Zinkkonzentrationen	43
Abbildung 6b: Relative Aktivierung von ERK1 und ERK2 nach einer vierstündigen Inkubation mit ansteigenden Zinkkonzentrationen	43
Abbildung 7: Western Blot Ergebnis von β -Catenin nach einer 4-Stunden- Inkubation von differenzierten CaCo2-Zellen mit ansteigenden Zinkkonzentrationen	44

Abbildung 8a: Western Blot Signale von differenzierten CaCo2-Zellen nach einer 72-stündigen Inkubation mit ansteigenden Zinkkonzentrationen	45
Abbildung 8b: Relative Aktivierung von ERK1 und ERK2 nach einer 72-stündigen Inkubation mit ansteigenden Zinkkonzentrationen	45
Abbildung 9a: Vergleich der Kontrollbanden von ERK1 und ERK2 anhand von Western Blot Ergebnissen bei undifferenzierten CaCo2-Zellen	46
Abbildung 9b: Vergleich der Kontrollbanden von ERK1 und ERK2 anhand von Western Blot Ergebnissen bei differenzierten CaCo2-Zellen	46
Abbildung 9c: Vergleich der Kontrollbanden von ERK1 und ERK2 von undifferenzierten bzw. differenzierten CaCo2-Zellen	46
Abbildung 10a: Mikroskopische Abbildungen von undifferenzierten CaCo2-Zellen nach einer vierstündigen Inkubation mit ansteigenden Zinkkonzentrationen und Färbung mit Kristallviolett	48
Abbildung 10b: Relative Farbintensität nach 4-stündiger Inkubation von undifferenzierten CaCo2-Zellen mit ansteigenden Zinkkonzentrationen und Färbung mit Kristallviolett	49
Abbildung 11a: Mikroskopische Abbildungen von undifferenzierten CaCo2-Zellen nach einer 12-stündigen Inkubation mit ansteigenden Zinkkonzentrationen und Färbung mit Kristallviolett	50
Abbildung 11b: Relative Farbintensität nach 12-stündiger Inkubation von undifferenzierten CaCo2-Zellen mit ansteigenden Zinkkonzentrationen und Färbung mit Kristallviolett	51
Abbildung 12a: Mikroskopische Abbildungen von undifferenzierten CaCo2-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit ansteigenden Zinkkonzentrationen und Färbung mit Kristallviolett	52
Abbildung 12b: Relative Farbintensität nach 24-stündiger Inkubation von undifferenzierten CaCo2-Zellen mit ansteigenden Zinkkonzentrationen und Färbung mit Kristallviolett	53

Abbildung 13a: Makroskopische Abbildungen von differenzierten CaCo ₂ -Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit ansteigenden Zinkkonzentrationen und Färbung mit Kristallviolett	54
Abbildung 13b: Relative Farbintensität nach 24-stündiger Inkubation von differenzierten CaCo ₂ -Zellen mit ansteigenden Zinkkonzentrationen und Färbung mit Kristallviolett	55
Abbildung 14a: Makroskopische Abbildungen von differenzierten CaCo ₂ -Zellen nach einer 72-stündigen Inkubation mit ansteigenden Zinkkonzentrationen und Färbung mit Kristallviolett	56
Abbildung 14b: Relative Farbintensität nach 72-stündiger Inkubation von differenzierten CaCo ₂ -Zellen mit ansteigenden Zinkkonzentrationen und Färbung mit Kristallviolett	57

III. Abkürzungsverzeichnis

AP-1 – Aktivatorprotein-1

APS – Ammoniumpersulfat

BSA – bovines Serumalbumin

CDC – cell-division cycle (Protein)

CRAC – Ca²⁺-aktivierter Kanal

DAG – Diacylglycerol

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

EGFR – Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor

EMT – Epitheliale-mesenchymale Transition

ERK – Extrazellulär Signal-regulierte Kinase

FCS – fetales Kälberserum

GDP – Guanosin-Diphosphat

GPCR – G-Protein gekoppelter Rezeptor

GTP – Guanosin-Triphosphat

IgG – Immunglobulin G

ID – Integrated Density

IP₃ – Inositol-1,4,5-Trisphosphat

JAK – Janus-Kinase

JNK/SAPK – c-Jun N-terminale Kinase/Stress-aktivierte Proteinkinase

MAPKKK (MEKK, MKKK) – Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase

MAPKK (MEK, MKK) – Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase

MAPK – Mitogen-aktivierte Protein Kinase

MLK – mixed-lineage kinase

MT-1 – Metallothionein-1

MTF-1 – metal-response element-binding transcription factor-1

NHE1 – Natrium-Kalium Exchanger Isoform 1

PAK-3 – p21-aktivierende Kinase 3

PBS – phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)

PI3K – Phosphoinositol-3-Kinase

PIP₂ – Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat

PLC – Phospholipase C

PPAR – Peroxisomen-Proliferator-aktivierter nukleärer Rezeptor

ROS – Reaktive Sauerstoffspezies

RTK – Rezeptor-Tyrosinkinase

SDS – Sodiumdodecylsulfat

TBS – Tris-buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)

TEMED – Tetramethylethyldiamin

Tris – Trishydroxymethylaminoethan

Tween – Polyoxyethylensorbitanmonolaurat

ZIP – Zink- und Eisen-reguliertes Transporterprotein

ZnR – Zinkrezeptor

ZnT – Zinktransporter

1. Einleitung und Fragestellung

Zink spielt eine essentielle Rolle in der menschlichen Ernährung. Als Spurenelement hat es vielfältige Wirkungen im Körper: Es erfüllt Funktionen im Protein-, Kohlenhydrat- sowie Fettstoffwechsel als Bestandteil von Enzymen, ist jedoch ebenso am Aufbau und der Erneuerung der DNA beteiligt.

Auf Zellebene wird eine Zinkhomöostase aufrechterhalten, da sowohl eine exzessive Aufnahme wie auch eine Verarmung an Zink negative Folgen für die Zellintegrität haben. Für den Import bzw. Export von Zink sind diverse Zinktransporter verantwortlich, welche überschüssiges Zink entweder aus der Zelle exportieren oder in Speichervesikel einschließen. Metallothioneine dienen zusätzlich als intrazelluläre „Puffer“ und können bei Bedarf Zinkionen aufnehmen oder abgeben.

Im ersten Teil dieser Diplomarbeit wird die Auswirkung von Zink auf den Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) Signaltransduktionsweg in CaCo2-Zellen, Vertretern einer Kolonkarzinom-Zelllinie, beschrieben. Der MAPK-Pathway wird durch extrazelluläre Stimuli wie Mitogene, Cytokine oder physikalische Reize aktiviert und beeinflusst über diverse Proteinkinasen, welche als Signalübermittler innerhalb der Zellen fungieren, den Zellzyklus, die Zellproliferation und -differenzierung sowie den Zelltod. Bei den nachfolgenden Betrachtungen wird die Auswirkung von Kurz- und Langzeitinkubationen mit unterschiedlich hohen Zinkkonzentrationen auf die Signalstärke von drei markanten Proteinkinasen pERK1, pERK2 und p-p38 innerhalb der MAPK-Signaltransduktionskaskade genauer betrachtet. Durch die Signalstärke kann auf den Grad der Stimulierung durch Zink rückgeschlossen werden. Die Untersuchungen werden anhand zweier Differenzierungsgrade der CaCo2-Zellen durchgeführt.

Präkonfluente, undifferenzierte CaCo2-Zellen weisen Merkmale von Dickdarmzellen auf und haben eine relativ geringe Toleranz gegenüber hohen Zinkkonzentrationen. Postkonfluente, differenzierte CaCo2-Zellen hingegen bleiben nach Konfluenz drei Wochen lang in Kultur. Im Laufe der Differenzierung kommt es zur Ausprägung von Merkmalen von oberen Dünndarmzellen. Sie haben im Vergleich zu präkonfluenten CaCo2-Zellen eine höhere Zinktoleranz.

Der zweite Teil befasst sich mit der Adhäsion der CaCo2-Zellen an der Unterlage nach einer Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an Zink. Dabei spielen Proteine, wie β -Catenin und E-Cadherin, die den Zell-Zell-Kontakt bestimmen, eine entscheidende Rolle. Mittels Färbeversuchen mit Kristallviolett werden die Unterschiede der Zinktoleranz zwischen den Inkubationszeitpunkten sowie zwischen den beiden Differenzierungsstadien anhand der Farbintensität der an der Unterlage anhaftenden gefärbten Zellen verdeutlicht.

2. Literaturübersicht

2.1. Zink

2.1.1. Aufgaben von Zink in der Zelle

Das Spurenelement Zink hat vielfältige Wirkungen im menschlichen Körper. Es ist in strukturelle sowie regulatorische Zellfunktionen involviert und moduliert die Aktivität von Enzymen, Membranrezeptoren und Signalmolekülen. Zink beeinflusst Funktionen des Gastrointestinaltraktes sowie des Immunsystems und spielt eine große Rolle bei der synaptischen Signalweiterleitung im Gehirn und Rückenmark. In Form von Zinkfingerproteinen bestimmt es die Konformation von Proteinen und Enzymen [BERG und SHI, 1996].

Zink induziert zudem die Expression von Metallothioneinen, welche toxische Metallionen wie Cadmium komplexieren und verfügt außerdem über antioxidative Eigenschaften. Als Bestandteil der Cu/Zn-Superoxiddismutase schützt es die Zelle vor oxidativem Stress [TAYLOR et al., 1988].

Je nach Zelltyp und Signaldauer bzw. -stärke induziert Zink über bestimmte Signalwege entweder eine Wachstumsstimulierung oder eine Wachstumshemmung von Darmzellen [OH et al., 2001].

Aus Untersuchungen an Darmkrebszellen der Linie IEC-6 geht hervor, dass Zink bei physiologischen Konzentrationen bis 50µM das Zellwachstum sowie die Zellerneuerung unterstützt [CARIO et al., 2000]. Bei alimentärem Zinkmangel sind die Zellproliferation sowie die Erneuerung des Epithels im Gastrointestinaltrakt eingeschränkt. Dies kann zu Diarrhoe aufgrund einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber bakteriellen Infektionen führen [AZRIEL-TAMIR, 2004].

Finamore et al stellten fest, dass Zinkdefizienz die Membranintegrität von CaCo2-Zellen negativ beeinflusst und folglich deren Durchlässigkeit für Neutrophile erhöht [FINAMORE et al., 2008].

Auf der anderen Seite verursachen hohe intrazelluläre Zinkkonzentrationen Zellschäden und stehen in Verbindung mit zahlreichen Krankheiten, wie etwa Myokardinfarkt, Nierenversagen, Alzheimer und mit der Entstehung von Neoplasien [HERSHFINKEL et al., 2001] [RUDOLF et al., 2003].

Die genaue Ursache dieser Zinktoxizität konnte noch nicht ermittelt werden, es bestehen jedoch einige Ansätze bezüglich der Effekte von Zink auf Prozesse innerhalb der Zelle.

Extrazelluläre Zinkkonzentrationen von $150\mu\text{M}$ für die Dauer von 72 Stunden werden sowohl von HT-29 Zellen als auch von CaCo2-Zellen toleriert. Für laryngeale Epithelzellen der Linie HEp-2 hingegen ist bereits eine Zinkkonzentration von $100\mu\text{M}$ toxisch, da irreversible Zellstrukturveränderungen auftreten [KINDERMANN et al., 2005].

Zum einen veranlasst eine konstant erhöhte extrazelluläre Zinkkonzentration, welche möglicherweise durch die Einnahme von Zinksupplementen bedingt sein kann, die Ausschüttung von Zink aus intrazellulären Speichern und dadurch eine Akkumulierung von freien Zinkionen im Zytosol. Diese bewirken über die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine verstärkte Stimulierung von Proteinkinasen innerhalb des Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK)-Signalwegs (siehe 2.2.). Über diesen Pathway werden in diesem Falle Signale einer Zellschädigung an den Zellkern übermittelt und eine Wachstumshemmung oder der Zelltod eingeleitet [SEO et al., 2001].

Analysen von Kindermann et al zeigen, dass freies intrazelluläres Zink außerdem in den Energiemetabolismus der Zelle eingreift und in Wechselwirkung mit Enzymen der Glykolyse, des Tricarbonsäurezyklus sowie der Atmungskette tritt. Dies führt zu Veränderungen der Konformation dieser Enzymstrukturen und ist möglicherweise für deren Funktionshemmung verantwortlich [KINDERMANN et al., 2005].

2.1.2. Aufrechterhaltung der Zinkhomöostase durch Zinktransporter und intrazelluläre Speichermöglichkeiten

Intrazelluläres Zink liegt in einer proteingebundenen Form vor, freie Zinkionen sind im Normalfall nur in sehr geringen (picomolaren) Konzentrationen vorhanden.

Um eine intrazelluläre Zinkhomöostase aufrecht zu erhalten, verfügt die Zelle sowohl über aktive Import- bzw. Exportmechanismen als auch über intrazelluläre Speichermöglichkeiten (in Zellorganellen wie etwa dem Golgi Apparat, sekretorischen und synaptischen Vesikeln etc.). Weiters kann die zytoplasmatische Zinkkonzentration auch mittels Zink-bindenden Proteinen (Metallothioneinen, anderen cysteinreichen Proteinen) reguliert werden [HERSHFINKEL et al., 2007] [KINDERMANN et al., 2005].

Die Aufrechterhaltung der Zinkhomöostase mittels Transportern erfolgt über die ZnT-Familie sowie ZIP-Familie.

Man kennt bis dato zehn ZnT, welche in unterschiedlichem Ausmaß im Organismus verteilt sind. Ihre Funktion besteht in der Verringerung der intrazellulären Zinkkonzentration, indem sie Zink exportieren oder in Speichervesikel schleusen.

ZnT-1 wird vor allem an der basolateralen Membran von intestinalen, renalen sowie hepatischen Zellen exprimiert und ist für den aktiven Zinkexport in den Extrazellulärraum verantwortlich. Aus diversen Studien geht hervor, dass die Expression von ZnT-1 mit der intrazellulären Zinkkonzentration korreliert. Kurzzeitige supraphysiologische Zinkkonzentrationen im Darm bewirken folglich eine Erhöhung der Expression des ZnT-1. Die homozygote Genausschaltung des ZnT-1-Genes in der Maus hingegen führt zum Absterben des Embryos [COUSINS und McMAHOR, 2000] [LANGMADE et al., 2000].

Andere Vertreter der ZnT (ZnT2-7) befördern überschüssiges Zink in intrazelluläre Speicher, wie sekretorische bzw. synaptische Vesikel oder den Golgi Apparat. Ihre „Gegenspieler“ sind die Transporter der ZIP-Familie, welche 14 Vertreter umfassen. Sie erhöhen die intrazelluläre Zinkkonzentration mittels Import von extrazellulärem Zink bzw. Abgabe von Zinkionen aus Speichervesikeln [BOBO, 2004].

Neuere Untersuchungen von Valentine et al demonstrieren, entgegen der bisherigen Annahmen, einen bidirektionalen Transportmechanismus von ZnT5B in CaCo2-Zellen. Dieser Transporter wird an der Plasmamembran exprimiert und ist sowohl in der Lage die zytoplasmatische Zinkkonzentration zu erhöhen als auch zu verringern. Bei der Einnahme von Zinksupplementen konnte eine verringerte Expression dieser Spleißvariante des ZnT5-Transporters festgestellt werden [VALENTINE et al., 2007].

Genetische Mutationen sind verantwortlich für diverse Störungen der Zinkhomöostase: Defekte im Slc39A-Gen, welches für den Transporter ZIP4 kodiert, gelten als Auslöser der Zink-Mangelkrankheit Acrodermatitis enteropathica. Nach dem Abstillen des Säuglings entwickeln sich folgende Symptome: Diarrhoe, Störungen der Immunfunktion, Dermatitis, neurologische Defekte usw. welche nur durch Zinksupplementierung gelindert werden können. Durch eine hoch dosierte Einnahme von Zink kann ein Zinkmangel ausgeglichen werden, da eine mögliche Restaktivität des ZIP4 oder die Übernahme des Zinkimports durch andere Transporter angenommen wird [WANG et al., 2002].

Am Mausmodell wurde eine Punktmutation im Gen für den Zinktransporter ZnT-4 demonstriert, die das „lethale Milchsyndrom“ verursacht. Das fehlende Zink in der Muttermilch ist für den frühen Tod der neugeborenen Mäuse verantwortlich [MURGIA et al., 2006].

Ohana et al beschreiben ein $\text{Na}^+/\text{Zn}^{2+}$ -Transportersystem anhand von HEK293 Zellen, bei dem Zink möglicherweise über einen sekundär aktiven Transport gegen einen Na^+ -Gradienten in den Extrazellulärraum exportiert wird. Dies dient dem Schutz der Zelle vor exzessiven intrazellulären Zinkkonzentrationen.

Vergleiche mit Zinktransportern von Pflanzen und Hefen lassen andererseits auch die Möglichkeit eines Protonengradienten zu, da pH-Wertänderungen einen messbaren Effekt auf die Funktion der ZnT haben [OHANA et al., 2004].

Neuere Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe erbrachten einen Hinweis auf einen H^+/Zn^{2+} -Austauschmechanismus des Zinktransporters ZnT5. Dieser wird unter anderem an der Membran des Golgi Apparates exprimiert und ist für die Speicherung der Zinkionen in diesem Organell verantwortlich [OHANA et al., 2009].

Es scheint plausibel, dass die Zinkhomöostase durch die Zinktransporter der ZnT- und ZIP-Familie geregelt wird. Anhand von bakteriellen und pflanzlichen Organismen wurden diverse Ionenpumpen, wie etwa ein ATP-getriebener Zn^{2+} -Transport und Na^+/Zn^{2+} -Austauscher, beschrieben. Beim Menschen wird neben den genannten Zinktransportern auch ein Natrium-abhängiger sekundär aktiver Transport von Zinkionen diskutiert. Seine genaue Funktion konnte jedoch bislang noch nicht hinreichend erforscht werden [SEKLER et al., 2008].

Auch Metallothioneine sind an der Zinkhomöostase und der Verteilung von Zink in der Zelle beteiligt, wobei ihre Expression mit der Höhe der Zinkkonzentration einhergeht. Sie werden jedoch auch durch andere Metallionen, Cytokine und Hormone induziert und vermitteln eine erhöhte Resistenz der Zellen gegenüber externen Stressfaktoren. Durch ihre Pufferfunktion wirken sie einem Überangebot an Zink, Cadmium und Kupfer entgegen [DAVIS et al., 1998].

Strukturanalysen von Metallothioneinen lassen eine Anordnung von sieben Zinkionen auf zwei dimeren Domänen annehmen. Ein Zinkion wird am C-terminalen Abschnitt von einer der beiden Domänen fest gebunden, während die restlichen Zinkionen locker gebunden vorliegen. Durch die Aufnahme bzw. Abgabe von Zinkionen tragen Metallothioneine zur Aufrechterhaltung der Zinkhomöostase bei [ZANGGER und ARMITAGE, 2002].

In Mäusen wurde ein Transkriptionsfaktor charakterisiert, welcher bei Anstieg der intrazellulären Zinkkonzentration die erhöhte Expression von Metallothionein und ZnT1 veranlasst. Dieser metal-response element-binding transcription factor-1 (MTF-1) verändert seine Konformation nach Bindung von Zinkionen und wandert in den Zellkern, wo er über metal-response elements die Transkription der entsprechenden Gene beeinflusst.

Auf diese Weise können der Bildung von ROS sowie einer Überladung der Zelle mit Zink entgegengewirkt werden [LANGMADE et al., 2000].

2.1.3. Signalübermittlung vom Extrazellulärraum in die Zelle

Die Übermittlung von extrazellulären Signalen erfolgt im Regelfall an der Membran der Zielzelle über Rezeptor-Tyrosinkinasen, Integrine, heterotrimere G-Proteine, Serpentin- oder Cytokin-Rezeptoren.

Mehreren Studien zufolge wird die Existenz eines heterotrimeren Gq-Protein-Rezeptors (GPCR) an der Zellmembran von Kolonozyten angenommen, welcher eine Selektivität für Zinkionen aufweist. Extrazelluläre Zinkkonzentrationen im physiologischen Bereich zwischen 10 und 100µM werden bereits von diesem Rezeptor registriert und lösen proportional zur Konzentrationshöhe einen intrazellulären Anstieg an Calcium aus, wodurch weitere Signalkaskaden initiiert werden [DUBI et al., 2008] [HERSHFINKEL et al., 2007] [SHARIR und HERSHFINKEL, 2005].

Die Stimulierung des G-Proteins durch extrazelluläres Zink bewirkt eine Ablösung seiner α -Untereinheit, welche folglich das Enzym Phospholipase-C (PLC) aktiviert. Dadurch kommt es zur Bildung von Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) aus dem Vorläufermolekül Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂). IP₃ bindet an den IP₃-Rezeptor, einen ligandengesteuerten Calciumkanal, und veranlasst die Ausschüttung von Calcium aus intrazellulären Speichern. Ein Ca²⁺-sensitives Kanalprotein (calcium release activated channel, CRAC) ist verantwortlich für die verlängerte Dauer des Signals und stellt eine wichtige Regulationsstelle für die Zellproliferation dar [HERSHFINKEL et al., 2001].

Infolge der erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration werden MAPK- und IP_3 -Signaltransduktionswege aktiviert, welche den Zellzyklus beeinflussen [DUBI et al., 2008].

Durch erhöhtes Ca^{2+} im Intrazellulärraum von Kolonozyten wird ebenso die Aktivität des membranständigen Na^+/H^+ -Austauschers NHE1 beeinflusst. NHE1 reguliert den pH-Wert und das Volumen dieser Zellen, ist jedoch auch am Apoptosegeschehen beteiligt [AZRIEL-TAMIR et al., 2004].

Die Aktivierung des membranständigen Na^+/H^+ -Austauschers durch intrazelluläres Calcium verursacht einen verstärkten H^+ -Ionen-Ausstrom aus der Zelle und konsequenterweise einen erhöhten Influx von Na^+ . Der Einstrom von Na^+ -Ionen bewirkt eine Zunahme des Wassertransports über die Zellmembran, der mit dem Transport von gelösten Substanzen in die Zelle einhergeht [HERSHFINKEL et al., 2001].

Die Signalübermittlung von Zink wird über cross-talk mit anderen Signalwegen modifiziert. Diesbezüglich wird eine Interaktion zwischen dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR), einem Rezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität, und dem GPCR angenommen.

Die Transaktivierung von EGFR durch GPCR involviert Src-Kinasen, welche EGFR an Tyrosinresten phosphorylieren; EGFR aktiviert den Ras/MEK/ERK-Signalweg (siehe 2.2.1.). Diese Vernetzung von mehreren Signalwegen ermöglicht eine Integration von unterschiedlichen extrazellulären Signalen. Auf diese Weise können zelluläre Prozesse genauer reguliert werden [HERSHFINKEL et al., 2007] [WU et al., 2002].

2.1.4. Zink und Zellzyklus

Aus Untersuchungen von Lavoie et al geht hervor, dass MAPK den Zellzyklus über die Expression von Cyclin D1 regulieren. Cyclin D1 veranlasst den Übergang von der G_0/G_1 -Phase in die S-Phase und ist daher für den normalen Ablauf des Zellzyklus von entscheidender Bedeutung [LAVOIE et al., 1996].

Bei einer verstärkten Aktivierung der MAPK, welche beispielsweise durch erhöhte Zinkkonzentrationen ausgelöst wird, kommt es zu einer Inhibierung des Zellzyklus in der G₁-Phase am Übergang zur S-Phase. Dies ist möglicherweise die Ursache für den anti-proliferativen Effekt von Zink in Konzentrationen ab 100µM [PARK et al., 2002].

Neben Cyclin D1 greifen einige andere Proteine in die Kontrolle des Zyklusablaufs ein. Eines davon ist der Tumorsuppressor p53, ein Transkriptionsfaktor der bei DNA-Schädigung aktiviert wird. P53 reguliert die Expression von Proteinen, welche eine Wachstumshemmung oder Apoptose einleiten, unter anderem p21 [MIYASHITA und REED, 1995].

Eine erhöhte Aktivität der Proteinkinasen des Ras/MEK/ERK-Signalweges (siehe 2.2.1.) trägt entscheidend zur Aktivierung von p53 bei [BROWN und BENCHIMOL, 2005] [LASSUS et al., 2000].

Der cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor p21^{WAF1/CIP1} wird durch p53, sowie diverse Signalwege stimuliert und ruft durch seine Aktivierung eine Hemmung des Zellzyklus hervor. Dies geschieht dadurch, dass Cyclinkomplexe, die für die Aufrechterhaltung des Zellzyklus notwendig wären, gehemmt werden. Bei einer länger andauernden Aktivierung durch Zink kommt es zur Induktion von p21 [PARK et al., 2002] [PARK et al., 2004]. Bei starker Zellschädigung werden über diesen Mechanismus die Apoptose und folglich der Proteinabbau durch Caspasen eingeleitet [KIM et al., 2005].

Anhand von Analysen mittels unterschiedlicher Darmkrebszelllinien konnte gezeigt werden, dass p21 in direkter Verbindung mit der Expression des Transkriptionsfaktors p53 steht, er kann jedoch auch unabhängig davon durch Raf-1 aktiviert werden [OH et al., 2001]. Bei der Behandlung von HT29-Zellen mit 100µM Zink beobachtete man eine Wanderung des zytoplasmaständigen p21 in den Zellkern. Eine länger anhaltende Stimulierung des MAPK-Signalweges veranlasst eine Inhibierung des Zellzyklus. Aus diesen Analysen kann geschlossen werden, dass Zink ab höheren Konzentrationen eine Hemmung des Zellwachstums bewirkt [PARK et al., 2002].

2.2. MAPK-Pathway

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) sind Komponenten innerhalb eines Signaltransduktionssystems, die unter anderem durch Mitogene, Hitze, UV-Strahlung und osmotischen Schock stimuliert werden.

MAPK haben eine Molekülmasse zwischen 40 und 45 kDa und umfassen eine Familie von zytoplasmatischen Serin/Threonin-, sowie Tyrosin-Kinasen, die Signale über unterschiedliche Signaltransduktionswege in den Zellkern übermitteln. Die Bezeichnung stammt von ihrer Fähigkeit, andere Proteine dieser Signalkaskade an spezifischen Serin- bzw. Threonin- und/oder Tyrosinresten zu phosphorylieren und damit zu aktivieren. Über den MAPK-Signalweg werden Vorgänge wie Zellwachstum, -differenzierung, -proliferation, Zellzyklusregulation und Zelltod gesteuert [SHIRAKABE et al., 1992].

Zink aktiviert den Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK)-Pathway. Dabei folgt der Rezeptoraktivierung eine kaskadenartige Phosphorylierung von Proteinkinasen, ausgehend von einer Mitogen-aktivierten Protein Kinase Kinase Kinase (MAPKKK/MEKK), über eine Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase (MAPKK/MEK), welche wiederum eine Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) aktiviert. Die Letztere vermittelt eine Zellantwort [SEGER et al., 1994].

2.2.1. Ras/MEK/ERK

Im Falle der Ras/MEK/ERK-Kaskade erfolgt die Aktivierung an einer Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) über das GTP-bindende Protein Ras, unter der Beteiligung eines Adaptermoleküls, Grb2, und eines Guanin-Nukleotid Austauschfaktors, SOS-1. Es kommt zu einer Interaktion des Guanin-Nukleotid Austauschfaktors mit membranständigen Ras-Proteinen, was zu einem Austausch von GDP durch GTP führt. Durch die Hydrolyse von GTP zu GDP wird die Signalweiterleitung beendet.

Eine Reihe von Proteinen mit GTPase-Aktivität (NF-1, p120) unterbinden die exzessive Stimulierung von Ras [SEGER et al., 1994].

Ras mit seinen Isoformen H-Ras, N-Ras und K-Ras kann Proteinkinasen der Raf-Familie phosphorylieren, ist jedoch selbst keine Proteinkinase. Vertreter der Raf-Familie sind A-Raf, B-Raf und Raf-1, wobei der letztgenannte am häufigsten untersucht wurde.

Raf-1 ist eine Serin/Threonin-Kinase mit einer Größe von 70 bis 75 kDa. Die Aktivierung von Raf-1 erfolgt über die Bindung an Ras und einer gleichzeitigen Phosphorylierung durch Proteinkinase C, Tyrosinkinase Src, JAK2 oder PAK-3. Proteinkinasen der Raf-Familie fungieren als MAPKKK. Alle drei Vertreter der Raf-Familie können die MAPKK (MEK) MEK1 und MEK2 spezifisch an Serin-Resten phosphorylieren.

Im Verlauf der Signalkaskade stellen Extracellular Regulated Kinase 1 und 2 (ERK1/2) die bevorzugten Substrate von MEK1 und MEK2 dar.

Die physiologische Inaktivierung der genannten Proteinkinasen erfolgt durch Proteinphosphatasen [reviewed in AVRUCH et al., 2001].

ERK1 (44 kDa) und ERK2 (42 kDa) sind „dual spezifische“ Proteinkinasen, die nachgeschaltete Proteine in der Signalkaskade sowohl an Tyrosin- als auch an Serin/Threonin-Resten phosphorylieren. Sie werden durch eine große Anzahl von Wachstumsfaktoren, wie auch durch Zink, aktiviert.

Die beiden Isoformen sind ca. zu 90% ident, unterscheiden sich jedoch in ihrer Substratspezifität. Im Falle von ERK1 und ERK2 erfolgt die Phosphorylierung durch MEK1 und MEK2 an den Bindungsstellen der Aminosäuren Tyrosin und Threonin, wobei diese durch eine variable Aminosäure getrennt sind. Für die Funktion der Kinasen müssen beide Reste phosphoryliert sein [SEGER et al., 1991].

Die Phosphorylierung der beiden regulatorischen Einheiten ist notwendig für die Translokation von ERK in den Zellkern, wo die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren erfolgt.

Bevorzugte Substrate von ERK sind, unter anderem, die Transkriptionsfaktoren c-Jun, c-Fos (Bestandteile des Aktivatorproteins AP-1), Elk-1, ATF-2, c-Myc, c-Myb, c-Ets1, c-Ets2, NF-IL6, TAL-1, p53 sowie die RNA-Polymerase II. Als weitere Substrate für ERK dienen RSK und MAPKAP-Kinase-2.

ERK1 und ERK2 beeinflussen auch Proteine des Zytoskeletts, wie MAP-1, MAP-2, MAP-4 und Tau, und spielen daher eine große Rolle in der Regulation der Zellmorphologie sowie des Zellzyklus [reviewed in SEGER und KREBS, 1995].

2.2.2. *MLK/MEKK/MKK/ SAPK-JNK*

Die c-Jun N-terminalen Kinasen/Stress-aktivierten Proteinkinasen (JNK/SAPK) werden unter anderem durch Cytokine stimuliert, welche durch externe Reize wie Hitze, Ischämie, UV-Licht und DNA-Schäden aktiviert werden. Bei JNK/SAPK erfolgt die Aktivierung über die Proteinkinasen MKK4 und MKK7 durch Phosphorylierung an den Aminosäuren Tyrosin und Threonin [LAWLER et al., 1998].

Proteine der MLK-Familie (mixed-lineage kinases) fungieren als MKK-Kinasen und sind daher im JNK/SAPK-Signalweg involviert. JNK/SAPK spielt eine Rolle bei der Phosphorylierung von den Jun-Proteinen, etwa dem Protoonkogen c-Jun [LAVOIE et al., 1996].

Untersuchungen zufolge aktivieren JNK/SAPK eine Reihe von weiteren Transkriptionsfaktoren wie Elk-1, p53, c-Myc und ATF2, als Zellantwort auf Stresstimuli [WESSELBORG et al., 1997].

Anhand von verschiedenen Zellmodellen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von JNK/SAPK die Apoptose über die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien induziert [TOURNIER et al., 2000].

2.2.3. *MLK/MKK/p38*

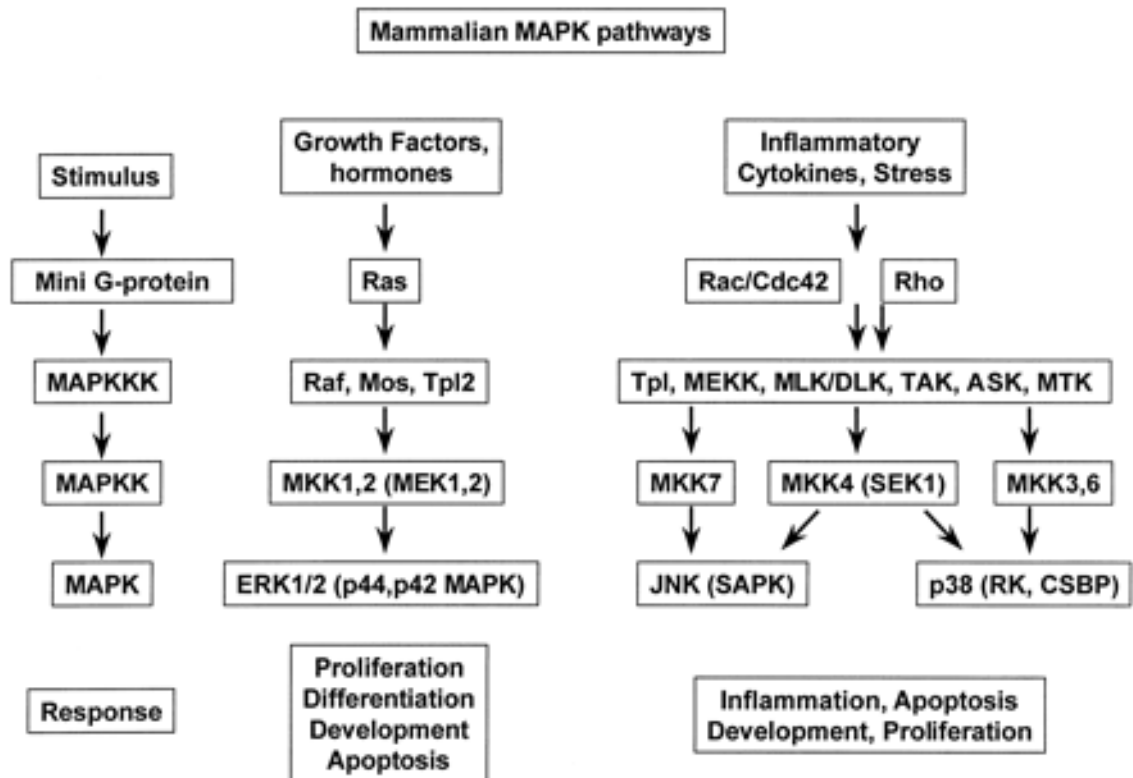
p38 α sowie die Isoformen p38 β , p38 γ und p38 δ reagieren auf Cytokine, Hitze, osmotischen Schock, Hormone und etliche andere Reize.

Die Signalkaskade wird durch Stimulierung von Rho/Rac-GTPasen initiiert, welche mixed lineage Kinasen (MLK) aktivieren. Deren bevorzugte Substrate sind MEK3 und MEK6. Letztere haben eine hohe Affinität gegenüber p38 MAPK, phosphorylieren jedoch auch Isoformen der JNK/SAPK [reviewed in PEARSON et al., 2001] [WESSELBORG et al., 1997].

p38 MAPK regulieren die Aktivität von diversen Phosphatasen, Kinasen und Transkriptionsfaktoren. Untersuchungen von Wesselborg et al deuten darauf hin, dass p38 infolge von Stresssignalen die Aktivierung von AP-1 begünstigt, welches in die Genexpression eingreift und zelluläre Prozesse steuert [WESSELBORG et al., 1997].

Lassus et al zufolge sind sowohl JNK/SAPK als auch p38 MAPK überwiegend als Auslöser des programmierten Zelltodes zu betrachten, obgleich p38 der Zelle in einigen Fällen Überlebenssignale vermittelt [LASSUS et al., 2000].

Es wird vermutet, dass die Aktivierung von p38, unter anderem, durch oxidativen Stress hervorgerufen wird [PORRAS et al., 2004].



[Abbildung 1: Schematische Darstellung des MAPK-Pathways; aus HOUSLAY und KOLCH, 2000]

Die drei präsentierten Signalwege sind untereinander sowie mit anderen Signalkaskaden vernetzt und können durch „cross talk“ das ursprüngliche Signal in seiner Intensität auf unterschiedliche Weise beeinflussen.

2.3. Zellmotilität, physiologische Zellabstoßung im Darm

Als essentieller Bestandteil der DNA Bindungsdomäne des Peroxisomen-Proliferator-aktivierten nukleären Rezeptors (PPAR) γ 1 spielt Zink eine entscheidende Rolle in dessen Aktivierung und Funktion. Der Rezeptor ist beteiligt an der Erneuerung von Zellen des Darmepithels. PPAR γ reguliert Gene, die den Aufbau des Zytoskeletts und die Zellmotilität kontrollieren und hat Einfluss auf Migration und Adhäsion von Darmkryptenzellen. PPAR γ wird vor allem am Übergang zwischen Zotten und Krypten exprimiert und bewirkt eine verstärkte Migration der differenzierten murinen Villus-Zellen. Die Proliferation in diesen Zellen ist eingeschränkt. Experimenten zufolge

beeinflusst PPAR γ die intestinale Morphologie, im Besonderen die Transformation von epithelialen zu mesenchymalen Zellen (epitheliale-mesenchymale Transition, EMT).

Bei der EMT verlieren Epithelzellen ihre Eigenschaften und dedifferenzieren zu mesenchymalen Zellen. Sie lösen ihre Zellkontakte auf, indem sie Zellkontaktmoleküle wie die Cadherine herunterregulieren und erlangen die Fähigkeit zur Migration. Am Zielort erfolgt eine Rückdifferenzierung zu Epithelzellen. Die EMT kann sowohl bei der Embryonalentwicklung, als auch bei der Tumormetastasierung beobachtet werden.

Die Aktivierung von PPAR γ geht einher mit einer Lockerung der Zellverbände und einer verringerten Zelladhäsion. Dadurch entwickeln intestinale Zellen die Eigenschaft, ihre Zellkontakte aufzulösen und werden nach erfolgter Apoptose in das Darmlumen abgestoßen [CHEN et al., 2006] [MEERARANI et al., 2003].

Analysen von Fujisawa et al demonstrieren eine Interaktion von β -Catenin mit PPAR γ . Durch die Aktivierung von PPAR γ kommt es zu einer Hemmung von β -Catenin-abhängigen Signalwegen, welche die Zellproliferation fördern. Weiters wird die Translokation von β -Catenin in den Zellkern verhindert. Über diese Mechanismen vermindert PPAR γ den Turnover von Darmepithelzellen [FUJISAWA et al., 2008].

PPAR γ greift ebenso in die Organisation des Zytoskeletts ein und steuert den Zellzyklus sowie die zelluläre Motilität. Diese molekularen Ereignisse werden vorwiegend durch CDC42, einer GTPase der Rho-Familie, über eine Phosphoinositol-3-Kinase-(PI3K)-abhängige Kaskade vermittelt. CDC42 stimuliert die Aktivierung von p21 (siehe 2.1.4.) und leitet auf diese Weise den Zellzyklusarrest ein. Die Aktivierung des PI3K-Signalweges bewirkt die Kinase-abhängige Phosphorylierung von MEK1/2, welche im Folgenden die Signalkinasen ERK1/2 aktivieren [CHEN et al., 2006].

Es konnte gezeigt werden, dass Zink bereits bei physiologischen Konzentrationen von etwa 100 μ M eine Apoptose initiiert [PARK et al., 2002] und möglicherweise Einfluss auf die physiologische Abstoßung von Darmzellen hat.

2.4. Zell-Zell-Kontakt, Loslösung vom Zellverband, Apoptose

Wie bereits in 2.3. angedeutet wurde, kommt es im Intestinum unter physiologischen Bedingungen zu einer Ablösung von murinen Villus-Zellen von den darunter liegenden Zellen und folglich zur Einleitung der Apoptose.

Der Prozess der Zellabstoßung wird durch Veränderungen des Zell-Zell-Kontaktes sowie durch die Expression von pro-apoptotischen Faktoren (z.B. Bak, Bax) reguliert [MIYASHITA und REED, 1995].

Die Ablösung vom Zellverband (Anoikis) und der damit verbundene programmierte Zelltod stellt unter physiologischen Bedingungen eine notwendige Maßnahme zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichts von Zellabbau und Zellerneuerung von Enterozyten dar [GROSSMANN et al., 2001].

Studien von Harnois et al demonstrieren eine Beteiligung des ERK- und des p38-Signalwegs am Vorgang der Anoikis [HARNOIS et al., 2004].

Das Überleben bzw. Sterben von Zellen hängt von extrinsischen und intrinsischen Signalen ab, beispielsweise von der An- oder Abwesenheit von Wachstumsfaktoren, Cytokinen oder Faktoren der Zelladhäsion, aber auch wesentlich von der überwiegenden Aktivierung von wachstumsfördernden oder wachstumshemmenden Signalwegen [HARNOIS et al., 2004].

Der Entzug von Wachstumsfaktoren initiiert die Apoptose [BROWN und BENCHIMOL, 2005] [RE et al., 1994].

Der programmierte Zelltod wird außerdem durch den Verlust von Kontakt zum Zellverband sowie durch das Ausbleiben von Überlebenssignalen ausgelöst. Die Induktion der Apoptose ist notwendig, um eine Zellregeneration zu ermöglichen [FRISCH und FRANCIS, 1994] [RE et al., 1994].

Die Apoptose wird unter anderem durch Proteine der Bcl-2-Familie reguliert. Durch die Aktivierung von pro-apoptotischen Faktoren wie Bax, Bad und Bak wird Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt und der programmierte Zelltod durch Caspasen (vor allem Caspase-3 und Caspase-9) eingeleitet.

Man vermutet, dass p53 die Genexpression von Bax steuert und auf diese Weise die Apoptose induziert [MIYASHITA und REED, 1995].

Anti-apoptotische Faktoren, d.h. Gegenspieler der erwähnten Proteine, stellen Bcl-2, Bcl-X_L und Mcl-1 dar. Überlebenssignale bewirken eine Phosphorylierung des pro-apoptotischen Faktors Bad und dessen Loslösung von Bcl-2 und Bcl-X. Diese beiden Vorgänge bewirken eine Sequestrierung von Bad im Cytosol und verhindern auf diese Weise die Apoptose [BROWN und BENCHIMOL, 2005]. Dadurch sowie durch die Komplexbildung von pro-apoptotischen Faktoren wie CDC25 im Cytosol werden die Zellproliferation und –differenzierung gefördert [reviewed in KOLCH, 2000].

Der Zell-Zellkontakt wird von Matrixproteinen der Integrin-Familie gesteuert, umfasst jedoch mehrere modulierende Komponenten, darunter jene der Cadherin-Superfamilie. Cadherine sind transmembranständige epitheliale Glykoproteine mit den bekanntesten Vertretern E-Cadherin, N-Cadherin und P-Cadherin, wobei E-Cadherin vorwiegend im Darmepithel vorhanden ist.

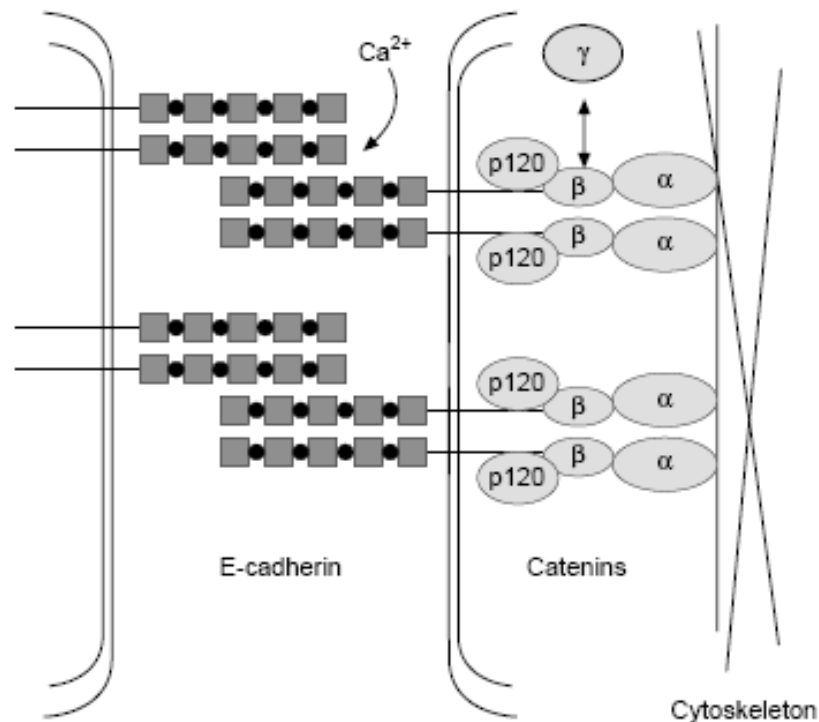
Die Funktion von Cadherinen basiert auf ihrer calciumabhängigen Komplexbildung mit anderen Membranproteinen, den Cateninen. Diese dienen – durch die Interaktion von β - oder γ -Catenin (Plakoglobin) mit α -Catenin – als Vermittler zwischen Cadherinen und dem Actin-Zytoskelett [REYNOLDS et al., 1994].

β -Catenin spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zellmembranintegrität und der Vermittlung der Zell-Zell-Kontakte.

Weiters ist β -Catenin auch an Signaltransduktionswege, wie den Wnt-Signalweg, gekoppelt. Bei der Aktivierung des Wnt-Proteins werden bestimmte Proteinkomplexe, welche β -Catenin normalerweise abbauen, inhibiert, sodass sich dieses im Zellkern sowie im Zytoplasma anreichert und die Transkription gewisser Zielgene fördert.

β -Catenin fungiert jedoch ebenso als Zellstrukturmodulator und beeinflusst über die Steuerung der Mikrofilamente die Zellmotilität [TAO et al., 1996] [HINCK et al., 1994].

Ein weiteres Catenin, p120 (δ -Catenin), bindet ebenso an β -Catenin und E-Cadherin und moduliert den Zell-Zell-Kontakt über die Assoziation der E-Cadherin-Moleküle. Neben dieser Funktion dient es auch als Substrat für einige Kinasen (z.B. GTPasen), unter anderem im Signalweg ausgehend vom EGFR (siehe 2.1.3.) [reviewed in WIJNHOFEN et al., 2000].



[Abbildung 2: Darstellung des Zell-Zell-Kontaktes, vermittelt durch das Zusammenspiel von intrazellulären Cateninen und E-Cadherin im Extrazellulärraum; aus WIJNHOFEN et al., 2000]

Cadherine verhindern durch ihre Eigenschaft Zellkontakte zu bilden, unter anderem die Invasion von Tumorzellen. Fehler in der Interaktion von E-Cadherin mit α -Catenin können auf Mutationen von β -Catenin basieren und die Integrität der Zellmembran schwächen.

Dies kann ein Grund für eine erleichterte Invasion von Tumormetastasen in andere Gewebe sein [OYAMA et al., 1994] [ODA et al., 1993].

Auch ein fehlerhaftes „Selbstmordprogramm“ der Zelle führt zum Ausbleiben der oben dargestellten Anoikis und ist verantwortlich für die Verbreitung der Tumorzellen im Körper [GROSSMANN et al., 2001].

Bei Verlust der Zellverankerung kommt es zu einem Abbau von E-Cadherin über Lysosomen sowie den Proteasom-Komplex, was auch bei der physiologischen Zellabstoßung beobachtet werden kann. Dadurch steigt die Anzahl der apoptotischen Zellen, wobei Differenzierung und Migration eingeschränkt sind [FOUQUET et al., 2004].

Anhand von Schilddrüsenkarzinomzellen (MTC) wurde der Zusammenhang zwischen dem Raf/MEK/ERK-Signalweg und der Expression von Zellkontaktmolekülen eingehend betrachtet. Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aktivierung des genannten Signalweges die Expression von β -Catenin, E-Cadherin und Occludin verringert. Durch die Phosphorylierung von Raf-1 wird zudem die Zelladhäsion verhindert [NING et al., 2008].

3. Material und Methoden

3.1. Zellkultur

3.1.1. Zelllinie

Zur Durchführung aller im Folgenden beschriebenen Experimente werden Dickdarmkrebszellen der Zelllinie CaCo2 verwendet. Bei Differenzierung erlangen sie Eigenschaften von oberen Dünndarmzellen und bilden so genannte „Domes“, Strukturen für die bessere Aufnahme von Nährstoffen.

3.1.2. Sterile Arbeitsbedingungen

Das Arbeiten mit den Zellen erfolgt unter sterilen Bedingungen in der Arbeitsbank Biosafe2 der Firma Ehret, welche nach dem Prinzip des Laminar Flow funktioniert. Dabei strömt gefilterte Luft innerhalb des Arbeitsraumes durch Öffnungen von unten nach oben. Für die Keimabtötung wird dieser Arbeitsplatz über Nacht mit UV-Licht bestrahlt. Alle Utensilien, wie Glaspipetten, Pasteur-Pipetten und Pipettenspitzen, werden vor Benützung sterilisiert (180°C) bzw. autoklaviert (120°C) und anschließend bei 70°C im Trockenschrank getrocknet.

3.1.3. Verwendung des Zellkulturmediums

Als Kulturmedium kommt Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Biochrom) zum Einsatz, welches bei 4°C aufbewahrt wird.

Zur Zellkultivierung wird das Medium (500 ml) mit folgenden Substanzen komplementiert:

50 ml fötales Kälberserum (FCS, BioWhittaker, Lonza)
5 ml 200mM Glutamin in 0,25% NaCl (BioWhittaker, Lonza)
5 ml (10000 U/ml) Penicillin/Streptomycin (BioWhittaker, Lonza)

Für die Inkubation der CaCo2-Zellen in FCS-freiem Medium wird eine Mediumflasche mit 5 ml Penicillin/Streptomycin versetzt.

3.1.4. Zellzüchtung

Die CaCo2-Zellen werden im Brutschrank (Sanova) bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre gezüchtet. Die Kultivierung erfolgt in sterilen Gewebekulturflaschen (Greiner) in 5 ml komplementiertem Medium. Alle drei bis vier Tage wird das Nährmedium gewechselt. Bei Konfluenz werden die Zellen 1:8 gesplittet und auf 6-well- oder 12-well-Platten ausgesetzt.

3.1.5. Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl wird mittels einer Einmal-Zählkammer (C-Chip DHC-N01, Peqlab) durchgeführt. Sie erfolgt unmittelbar nach dem Splitten einer Zellkulturflasche, wobei 10 µl der Zellsuspension in die Injektionsöffnung pipettiert werden.

Anhand einer Quadratvorlage kann die Zellzahl im Lichtmikroskop bestimmt werden (Angaben nach Multiplikation des Durchschnittswerts pro Quadrat, dem Verdünnungsfaktor und dem Volumenfaktor in Zellzahl pro ml).

Die mittlere Zellzahl der CaCo2-Zellen im konfluenten Zustand beträgt zwischen 100.000 und 200.000 Zellen/ml.

3.1.6. Inkubation der CaCo2-Zellen mit Zink

Benötigte Lösungen

- Stocklösung Zinkchlorid (ZnCl₂) in 30mM HCl: 200 mM
- Lösungsmittel HCl: 30 mM

Die Zellen werden mit einem 1:2-Gemisch von komplementiertem und unkomplementiertem Medium inkubiert.

Dazu werden jeweils 2 ml dieses Gemisches in sterile 15 ml Falcons pipettiert und anhand des folgenden Pipettierschemas mit Zinkchlorid (ZnCl₂) und dem Lösungsmittel (HCl) versetzt.

Präkonfluente CaCo₂-Zellen:

μM	30mM HCl	200mM ZnCl ₂
K	2,5	0
50	2	0,5
100	1,5	1
150	1	1,5
200	0,5	2
250	0	2,5

Postkonfluente CaCo₂-Zellen:

μM	30mM HCl	200mM ZnCl ₂
K	16	0
200	14	2
400	12	4
600	10	6
800	8	8
1000	6	10
1200	4	12
1400	2	14
1600	0	16

Nach Absaugen des Kulturmediums werden die 6-well-Platten mit 2 ml/well bzw. die 12-well-Platten mit 1 ml/well Zinkchlorid-Medium versetzt und für 1 Stunde, 4 Stunden, 24 Stunden oder 72 Stunden im Brutschrank aufbewahrt.

3.2. Probenvorbereitung

3.2.1. Zellyse

Benötigte Reagentien

- 5 x PBS-Puffer
- Lysis-Puffer
- Protease-Inhibitor Cocktail

Zur Herstellung des 5 x PBS-Puffers werden 1 g KCl (Merck), 1 g KH_2PO_4 (Merck), 14,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (Merck) und 40 g NaCl (Merck) in 800 ml destilliertem Wasser gelöst. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 wird mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Im weiteren Verlauf wird mit einem 1 x PBS-Puffer gearbeitet. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

Der Lysis-Puffer setzt sich aus 121 mg Tris-Base (Merck), 876,6 mg NaCl (Merck) 74,4 mg EDTA (Merck), 0,5 ml 0,5% Nonidet P-40 (United States Biochemical Corp.), 50 mM NaF (210 mg) und 0,2 mM Sodiumorthovandate (8,7 mg) zusammen. Der pH-Wert wird mittels HCl (37%, Merck) eingestellt und anschließend auf 100 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Ablauf

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellplatten aus dem Brutschrank heraus genommen und unmittelbar auf Eis gesetzt, um alle Stoffwechselfvorgänge zu stoppen. Danach wird das Medium abgesaugt und drei Mal mit 4°C kaltem 1 x PBS gewaschen.

Um die Zellen aufzulösen wird ein Gemisch aus Lysis-Puffer und Protease-Inhibitor Cocktail im Verhältnis 100:1 aufgetragen (100 bzw. 200µl/well). Nach etwa 15 Minuten werden die Zellen in Epruvetten gefüllt und in flüssigen Stickstoff getaucht. Nach dem Auftauen auf Eis werden die Epruvetten bei 13500 rpm für 15 Minuten zentrifugiert (5417 Eppendorf) und der Überstand in neue Epruvetten überführt. Die Lagerung der Proben erfolgt bei -20°C.

3.3. Proteinbestimmung mittels Photometer

Detektionslösung

- BCA Protein Assay Solution A
- BCA Protein Assay Solution B (beide Lösungen von Pierce)

Die beiden Lösungen werden kurz vor Verwendung im Verhältnis 50:1 gemischt.

Mittels des Proteinstandards Bovines Serum Albumin (BSA) und 6 Verdünnungen (1:2) wird eine Standardreihe erstellt. Das Schema besteht aus 8 Verdünnungsschritten, wobei als Anfangskonzentration 2 mg/ml BSA und als Endkonzentration destilliertes Wasser gewählt wird.

Die Proben werden 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. Jeweils 10 µl Standard und 10 µl Probe werden im Dreifachansatz in 96-well Platten pipettiert und anschließend mit 200 µl der Detektionslösung versetzt.

Daraufhin wird die 96-well Platte mit Parafilm bedeckt und für 30 Minuten in den Brutschrank gestellt. Nach Abkühlen der Platte für weitere 30 Minuten, kann die Extinktion am Photometer (Plattenreader 550, Bio-Rad) bei 550 nm gemessen werden.

Die Auswertung erfolgt mittels Prism 3.02 (GraphPad).

3.4. Western Blot

3.4.1. SDS-Gel Elektrophorese

Verwendete Reagentien

- 4 x Sample Buffer: 0,5 M Tris-HCl (8% SDS; pH=6,8)
Glycerin (Merck)
2-Mercaptoethanol (Sigma)
Bromphenolblau (Merck)
- 10% SDS-Lösung
- 10 x Tris-Glycin-Lösung
- 3 M Tris-HCl, pH 8,45 / 0,3% SDS
- 30% Acrylamid-Lösung
- Polymerisationsstarter: 10% APS
TEMED (Gerbu)

Für die Herstellung von 4 x Sample Buffer benötigt man 45 µl 0,5 M Tris-HCl (8% SDS; pH=6,8), 50 µl Glycerin, 5 µl 2-Mercaptoethanol und eine Spatelspitze Bromphenolblau. Der Sample Buffer wird vor jeder Verwendung erneut hergestellt.

10 g Sodium-dodecyl-sulfate (SDS Ultrapure, Roth) werden in 100 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Der Elektrophorese Puffer 10 x Tris-Glycin enthält 30 g Tris-Base (Tris-hydroxymethyl-aminoethan, Roth), 144 g Glycin (Merck) und 100 ml einer 10% SDS-Lösung. Diese Substanzen werden vermengt, mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und bei Raumtemperatur gelagert.

Um 3 M Tris-HCl, pH 8,45 / 0,3% SDS herzustellen, wird 182 g Tris-Base in 400 ml destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit HCl (37%, Merck) auf 8,45 eingestellt. Danach wird 1,5 g SDS-Pulver zugegeben und auf 500 ml aufgefüllt. Die Lagerung erfolgt ebenfalls bei Raumtemperatur.

Die Acrylamid-Lösung wird hergestellt, indem 1 g Bis und 29 g Acrylamid-Pulver in 100 ml destilliertem Wasser, unter ständigem Rühren auf dem Magnetrührer, aufgelöst werden.

Zur Herstellung von 10% APS wird 0,1 g Ammoniumpersulfat-Pulver (APS, Gerbu) in 1 ml destilliertem Wasser gelöst und zu je 50 µl aliquotiert. Die Aliquote werden bei -20°C gelagert.

TEMED (Gerbu) liegt bereits als gebrauchsfertige Lösung vor.

Ablauf

Zur Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wird ein 10% Polyacrylamidgel hergestellt. Der Prozess der Auftrennung erfolgt unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen.

Herstellung eines Gels

Anfangs werden zwei Glasplatten (7x9cm) vorbereitet, wobei die Seitenteile der dickeren Platte eine Stärke von 0,75 mm aufweisen. Vor Fixierung der beiden Platten in einer dafür vorgesehenen Halterung müssen diese gereinigt und mittels 70% Ethanol fettfrei gemacht werden.

Für ein Trenngel benötigt man folgende Substanzen:

Polyacrylamid-Trenngel 10%
2ml Aqua dest.
2ml Tris/HCl pH=8,45/0,3% SDS
2ml 30% Acrylamid/Bis (29:1, Bio Rad)
30µl 10% APS
3µl N,N,N,N-Tetramethyl-Ethylen (TEMED)

Zur Herstellung eines Gels vermischt man die ersten drei Lösungen. Erst vor dem Gebrauch werden APS und TEMED hinzugefügt und am Vortex gut durchmischt. Danach wird das flüssige Gel bis zur Markierung zwischen die Glasplatten pipettiert. Darüber wird eine Schicht 30% Isopropanol aufgetragen, um Luftblasen im Gel zu vermeiden. Die Dauer der Polymerisation beträgt etwa 30 Minuten.

Nach Festwerden des Trenngels kann das Sammelgel vorbereitet werden. Zuvor wird das Isopropanol aus der Glasapparatur entfernt und mit destilliertem Wasser nachgespült. Zum Entfernen der Flüssigkeitsreste verwendet man dünnes Filterpapier.

Für ein 4% Sammelgel benötigt man:

Sammelgel 4%
1,54ml Aqua dest.
620µl Tris/HCl pH=8,45/0,3% SDS
340µl 30% Acrylamid
20µl 10% APS
2µl TEMED

Das Sammelgel wird aus den aufgelisteten Reagentien hergestellt und auf das bereits fest gewordene Trenngel aufgetragen. 0,75mm dicke Kämme mit 10 Taschen werden in das noch flüssige Sammelgel gesteckt; diese entfernt man erst im späteren Verlauf. Die Polymerisation dauert etwa 30 Minuten.

Probenvorbereitung

Die Proben werden zunächst auf Eis aufgetaut. Das Auftragsvolumen setzt sich aus der Probe, 1x PBS und Sample Buffer zusammen, wobei der letztgenannte ein Viertel des gesamten Volumens ausmacht. Die Komponenten werden vor Verwendung am Vortex kurz durchmischt.

Beladung des Gels und Elektrophorese

Nach abgeschlossener Polymerisation des Sammelgels werden die Glasplatten aus der Halterung entfernt und in die Elektrophoresekammer (Mini PROTEAN 3, Bio Rad) eingespannt. Diese wird mit einem 1x Tris-Glycin-Puffer aufgefüllt. Nachdem der Kamm vorsichtig herausgezogen und die Geltaschen mit einer Spritze gereinigt wurden, kann man das zuvor errechnete Probenvolumen mit speziellen Gelbeladungsspitzen auftragen.

Zur Orientierung anhand der Proteingröße werden 3µl einer Proteinleiter (Prestained Protein Ladder, Fermentas) in eine freie Geltasche pipettiert.

Die Elektrophorese läuft bei 180V (konstant) bei 4°C etwa 90 Minuten. Danach wird der 1x Tris-Glycin-Puffer weggeleert und die Glasplatten aus der Apparatur entnommen. Das Gel wird nun von den Platten getrennt und für den nächsten Schritt weiter verwendet.

3.4.2. Western Blot Transfer

Benötigte Puffersubstanzen

- Transferpuffer

Um einen Transferpuffer zu erhalten, werden 100 ml des 10 x Tris-Glycin-Puffers, 200 ml Methanol (Merck) und 10 ml einer 10% SDS-Lösung zusammen mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Dieser Puffer kann öfters verwendet werden. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

Ablauf

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden vom Gel auf ein Nitrocellulosepapier transferiert („geblottet“) und anschließend immunologisch detektiert.

Das „Sandwich“ wird nach folgendem Schema aufgebaut (von unten nach oben):

Weißer Platte
Schwamm
Filterpapier
Nitrocellulose
Gel
Filterpapier
Schwamm
Schwarze Platte

Vor dem Zusammenbau des Sandwich werden die Schwämme, das Filterpapier und die Nitrocellulose in Transferpuffer getränkt. Um Störungen des Transfers durch Luftblasen zwischen den Schichten zu vermeiden, wird die Filterpapierschicht auf dem Gel mit einer Glaseprouvette vorsichtig gewalzt.

Das fertige Sandwich wird mit Ausrichtung des schwarzen Teils der Transferkassette zum schwarzen Teil der Transferapparatur in die Transferkammer gestellt. Diese wird anschließend mit Transferpuffer aufgefüllt und zur Kühlung mit einem Eisblock versehen.

Der Transfer wird, ebenso wie die Elektrophorese, im Kühlschrank bei 4°C durchgeführt und läuft bei 400mA (konstant) 45 Minuten.

Ponceau S Färbung

Die Ponceau-Lösung wird folgendermaßen hergestellt:

10 g Ponceau S (Merck), 300 g Trichloressigsäure und 300 g Sulfosalicylsäure werden vermengt und anschließend mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur. Die fertige Lösung eignet sich zur mehrmaligen Verwendung.

Die Nitrocellulose wird aus der Kammer entnommen und mit Ponceau-Rot ca. 5 Minuten gefärbt. Nach einigen Waschvorgängen mit destilliertem Wasser werden alle Proteinbanden sichtbar. Mit Hilfe dieser Färbung werden die Effizienz des Transfers und die Gleichmäßigkeit der Proteinmengen überprüft.

3.4.3. Immunodetektion

Verwendete Reagentien

- 10 x TBS-Puffer
- Washing Buffer
- Blocking Buffer

Zur Herstellung von 10 x TBS-Puffer werden 24,4 g Tris-Base und 84,8 g NaCl (Merck) in etwa 900 ml destilliertem Wasser gelöst und anschließend der pH-Wert mit rauchender HCl (37%) auf 7,4 eingestellt. Danach wird auf 1000 ml aufgefüllt. 10 x TBS wird bei 4°C gelagert.

Um Washing Buffer zu erhalten, wird 1 ml Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween20, Merck) in 1000 ml 1 x TBS gelöst.

Beim Blocking Buffer wird Magermilchpulver (Fettgehalt < 1,5%; Instant Fixmilch, Maresi) in der Menge mit Washing Buffer vermischt, dass man eine 5%-ige Lösung erhält. Die Lösung wird immer kurz vor Gebrauch hergestellt.

First Antikörper

- Pan-ERK Primary-Antikörper-Lösung (1:5000)
2 µl mouse-anti-panERK-IgG (Bioscience Pharmigen) werden in 10 ml einer 5% BSA-Lösung (in Washing Buffer) gelöst.
- Phospho-ERK1/2 (pERK1/2) Primary-Antikörper-Lösung (1:5000)
2 µl rabbit-anti-pERK1/2-IgG (Cell Signaling Technology) werden in 10 ml einer 5% BSA-Lösung (in Washing Buffer) gelöst.
- Phospho-p38 (p-p38) Primary-Antikörper-Lösung (1:2500)
4 µl rabbit-anti-p-p38-IgG (Cell Signaling Technology) werden in 10 ml einer 5% BSA-Lösung (in Washing Buffer) gelöst.
- β-Catenin Primary-Antikörper-Lösung (1:5000)
2 µl mouse-anti-β-Catenin-IgG (Cell Signaling Technology) werden in 10 ml einer 5% BSA-Lösung (in Washing Buffer) gelöst.

Allen Primary-Antikörper-Lösungen wird ein Körnchen Natriumazid hinzugefügt, um Infektionen zu vermeiden. Die Lösungen werden mehrmals verwendet und bei 4°C gelagert.

Secondary Antikörper

- 1 µl Goat Anti-rabbit-IgG (H+L)-HRP Conjugate (Bio Rad)
- 1 µl Goat Anti-mouse-IgG (H+L)-HRP Conjugate (Bio Rad)

Die Secondary Antikörper werden jeweils in 10 ml Blocking Buffer gelöst und sofort verwendet.

Ablauf

Nach der Ponceau Färbung wird der Blot mittels Blocking-Buffer für eine Stunde am Belly Dancer geblockt. Dabei werden unspezifische Bindungen des Antikörpers inhibiert.

Nach zwei darauf folgenden Waschschrritten (jeweils 10 Minuten) mit Washing Buffer wird der Blot mit AK-Lösung versetzt und über Nacht am Belly Dancer im Kühlschrank inkubiert.

Der folgende Schritt wird am nächsten Tag durchgeführt. Er beinhaltet die Inkubation mit dem Second-AK, welcher spezifisch den ersten AK erkennt und bindet. Dafür wird der Blot dreimal für 10 Minuten mit Washing Buffer gewaschen und danach eine Stunde lang am Belly Dancer bei Raumtemperatur mit Second-Antikörper-Lösung inkubiert. Am Ende wird abermals dreimal für 10 Minuten gewaschen. Alle Waschschrritte erfolgen unter Bewegung am Belly Dancer bei mittlerer Stufe.

Anschließend erfolgt die Sichtbarmachung der Banden am ChemImager 7.0 (Biozym).

Dabei wird der Blot mit insgesamt 500 µl eines 1:1-Gemisches aus Super Signal-ECL-Lösung (Enhancer Solution, Peroxidase Solution) bedeckt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Als niedrigste Belichtungsstufe wurde in Abhängigkeit des jeweiligen Proteins 30 Sekunden und als höchste Belichtungsstufe 40 Minuten eingestellt.

Die semi-quantitative Auswertung der Banden erfolgt mittels AlphaEaseFC-Chemilmager 4400 von Alpha Innotech und wird als Integrated Density (ID) angegeben.

Die Programme Prism 3.02 und Microsoft Excel dienen der statistischen Auswertung.

3.5. Kristallviolett-Färbung

3.5.1. Inkubation mit Zink

Benötigte Lösungen

- Stocklösung Zinkchlorid (ZnCl_2) in 30mM HCl: 200 mM
- Lösungsmittel HCl: 30 mM

Ablauf

Wie bei der Inkubation der CaCo_2 -Zellen mit Zink für die Western Blot Analyse, werden die Zellen mit einer steigenden Konzentration an ZnCl_2 behandelt. Die Vorgehensweise entspricht jener von Punkt 3.1.6.

In Vorbereitung auf die Kristallviolett-Färbung wird folgendes Pipettierschema angewandt:

μM	30mM HCl	200mM ZnCl_2
K	16	0
50	15,5	0,5
100	15	1
150	14,5	1,5
200	14	2
250	13,5	2,5
400	12	4
600	10	6
800	8	8
1000	6	10
1200	4	12
1600	0	16

3.5.2. Färbung der CaCo_2 -Zellen

Benötigte Reagentien

- 1 x PBS
- Glutaraldehyde Solution (0,25% in PBS) - Merck
- Kristallviolett: Stock solution (2% in 20% Ethanol), 1:10 in 1 x PBS verdünnt – Sigma C0755

Ablauf

Nach Entnahme der zu färbenden Platte aus dem Brutschrank, werden die Wells zweimal zu je 1 ml mit 1 x PBS gewaschen. Danach pipettiert man in jedes Well 0,5 ml der Glutaraldehyd-Lösung und lässt die Platte bei 4°C für 10 Minuten inkubieren. Dieser Schritt dient zur Fixierung der Farbe in der nachfolgenden Behandlung der Zellen mit Kristallviolett.

Nach Ablauf der 10 Minuten werden die Wells dreimal mit Leitungswasser gewaschen (jeweils 1 ml) und mit 0,5 ml/Well mit Kristallviolett versetzt. Die Inkubation dauert bei Raumtemperatur 10 Minuten.

Nachher folgen drei weitere Waschschrte mit Leitungswasser, bis die überschüssige Farbe gänzlich abgewaschen werden konnte.

Die Betrachtung der CaCo₂-Zellen im Verlauf der Behandlung mit steigenden Zinkkonzentrationen erfolgt am Lichtmikroskop (Axionray 335) bei 10-facher Vergrößerung, wobei einzelne gefärbte Zellen im Zellverband erkennbar werden.

3.5.3. Photometrische Messung der Farbintensität

- 50% Ethanol
- 100% Isopropanol

Die Wells werden mit einem 1:2-Gemisch aus Ethanol und Isopropanol versetzt (1 ml/Well) und so lange unter Bewegung am Belly Dancer inkubiert, bis sich die Farbe vollständig von den Zellen gelöst hat.

Aus den jeweiligen Wells werden 100 µl entnommen und im Dreieransatz in eine 96-well-Platte pipettiert.

Die Extinktion wird am Plattenphotometer (Plattenreader 550, Bio Rad) bei 550 nm gemessen.

4. Ergebnisse

4.1. Signaltransduktion

4.1.1. Präkonfluente, undifferenzierte CaCo2-Zellen

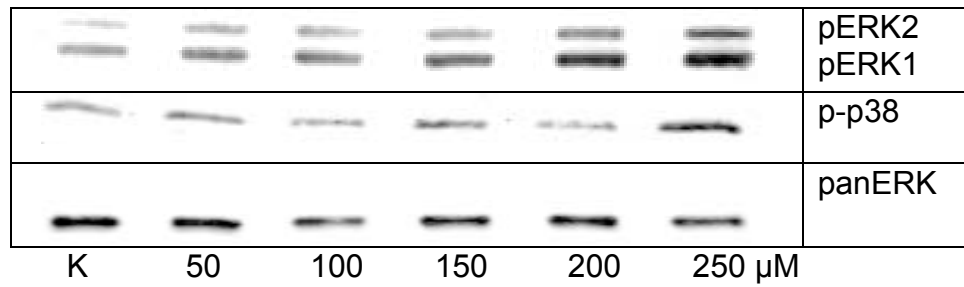
CaCo2-Zellen wurden nach einer Proliferationsphase von 6 Tagen im präkonfluenten, undifferenzierten Zustand mit unterschiedlichen Konzentrationen an Zinkchlorid für jeweils eine Stunde bzw. vier Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zinkkonzentrationen lagen im Bereich von 50µM bis 250µM. Nach der Zellyse und der elektrophoretischen Trennung der Gesamtproteine konnte der Grad der Stimulierung der Proteinkinasen pERK1 und pERK2 sowie p-p38 mittels der Western Blot Methode ermittelt werden. Als Ladekontrolle wurde aufgrund seiner konstitutiven Expression in CaCo2-Zellen das Protein panERK zugezogen. Alle Ergebnisse der Auswertung von pERK 1/2 sowie panERK wurden auf den jeweiligen Kontrollwert, welcher auf 1 gesetzt wurde, bezogen.

Der Grad der Stimulierung von p-p38 wurde in diesem Zusammenhang ebenso dargestellt, jedoch nicht ausgewertet.

1-Stunden-Inkubation mit Zink

Nach einstündiger Inkubation undifferenzierter CaCo2-Zellen mit Zink kann anhand von drei unabhängigen Proben gezeigt werden, dass der Grad der Stimulierung von pERK1 proportional zu der Zinkkonzentration zunimmt. Eine signifikante relative Aktivierung erfolgt bei Konzentrationen ab 150µM Zink. Die Stimulierung beläuft sich auf das Fünffache des Kontrollwertes. Bei einer Zinkkonzentration von 200µM kommt es zu einer 20-fachen Stimulierung, bei Inkubation mit 250µM Zink werden Durchschnittswerte einer 45-fachen Stimulierung erreicht. pERK2 wird ebenso bei einer Konzentration von 150µM statistisch signifikant stimuliert. Bei 150µM wird pERK2 im Vergleich zum Kontrollwert etwa dreifach stimuliert, bei 200µM ca. sechsfach. P-p38 zeigt erst bei 250µM eine Stimulierung.

(A)



(B)

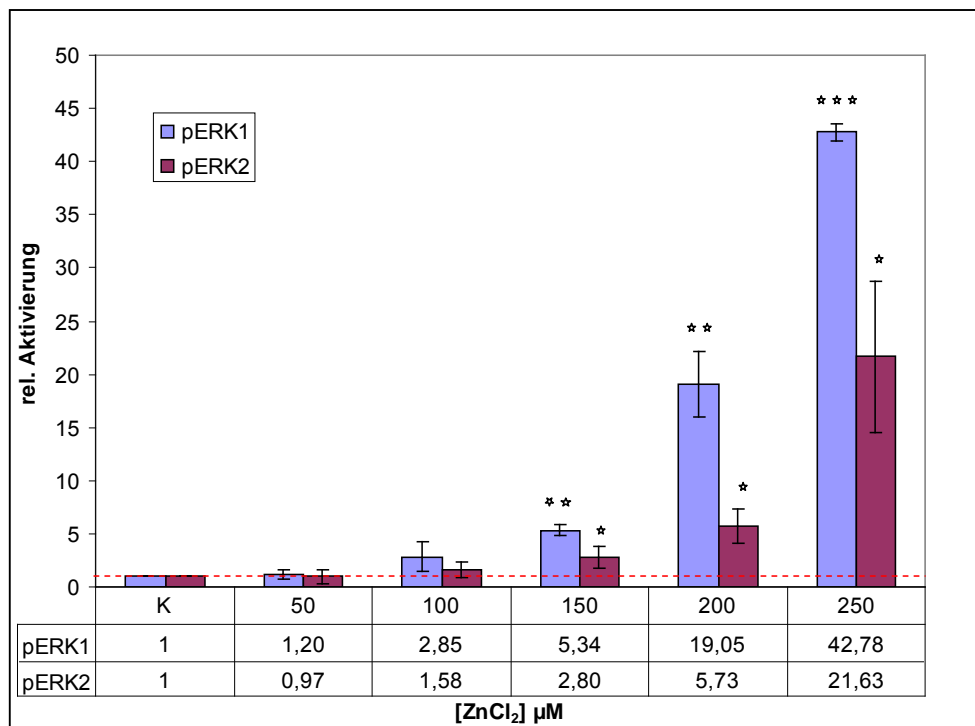


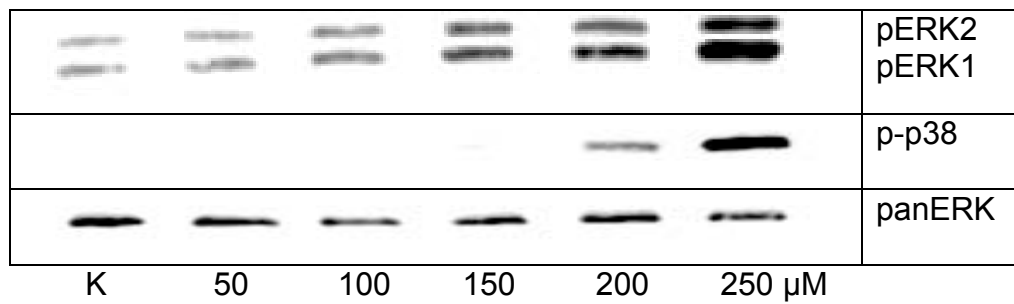
Abbildung 3a: Repräsentatives Western Blot Ergebnis von einem aus jeweils drei unabhängigen Versuchen, nach einer einstündigen Inkubation von undifferenzierten CaCo₂-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen an ZnCl₂

Abbildung 3b: Relative Aktivierung von ERK1 und ERK2 im Vergleich zur Kontrolle bei einer einstündigen Inkubation von undifferenzierten CaCo₂-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen an ZnCl₂, untersucht mittels Western Blot in drei unabhängigen Versuchen. Die dargestellten Balken zeigen Mittelwert ± Standardabweichung der drei Ergebnisse. Als Signifikanztest wurde der one sample t-test zugezogen, mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***)

4-Stunden-Inkubation mit Zinkchlorid

Nach vierstündiger Inkubation mit Zink ist bereits ab einer Konzentration von 150 μ M eine Stimulierung von pERK1 um das 20-fache ersichtlich. Bei 200 μ M kann eine 30-fache Stimulierung von pERK1 im Vergleich zum Kontrollwert beobachtet werden. Die Behandlung der Zellen mit 250 μ M Zink zeigt eine um 45-fach gesteigerte Stimulierung von pERK1. pERK2 wird bei 100 μ M bereits signifikant stimuliert, ab 150 μ M kommt es zu einer weiteren Steigerung um das 15-fache verglichen mit dem Kontrollwert. Der Grad der Stimulierung von pERK2 nimmt auch bei 200 μ M und 250 μ M weiter zu, erreicht jedoch nicht die Werte von pERK1. P-p38 wird hierbei schon ab einer Konzentration von 200 μ M Zink stimuliert.

(A)



(B)

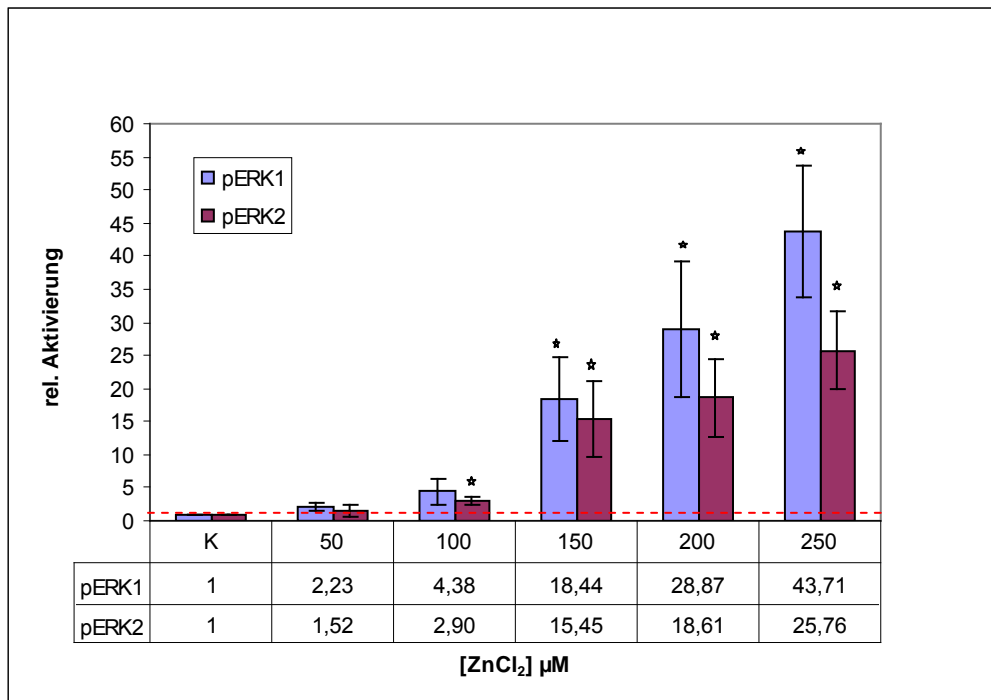


Abbildung 4a: Repräsentatives Western Blot Ergebnis von einem aus jeweils drei unabhängigen Versuchen, nach einer vierstündigen Inkubation von undifferenzierten CaCo2-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen an ZnCl₂

Abbildung 4b: Relative Aktivierung von ERK1 und ERK2 im Vergleich zur Kontrolle bei einer vierstündigen Inkubation von undifferenzierten CaCo2-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen an ZnCl₂, untersucht mittels Western Blot in drei unabhängigen Versuchen. Die dargestellten Balken zeigen Mittelwert ± Standardabweichung der drei Ergebnisse. Als Signifikanztest wurde der one sample t-test zugezogen, mit $p < 0,05$ (*)

4.1.2. Postkonfluente, differenzierte CaCo2-Zellen

CaCo2-Zellen im postkonfluenten, differenzierten Zustand bilden ein durchgehendes Monolayer. Sie unterscheiden sich von undifferenzierten Zellen dadurch, dass sie unter anderem eine höhere Toleranz gegenüber Zink aufweisen [ZÖDL et al., 2003]. Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen mit Zinkkonzentrationen von 200μM bis 1600μM durchgeführt, sowie längere Inkubationszeitpunkte betrachtet.

Vergleiche zwischen den 1-, 4- sowie 72-Stunden-Inkubationen zeigten merkbare Unterschiede im Grad der Stimulierung der Signalproteine pERK1 sowie pERK2 und p-p38.

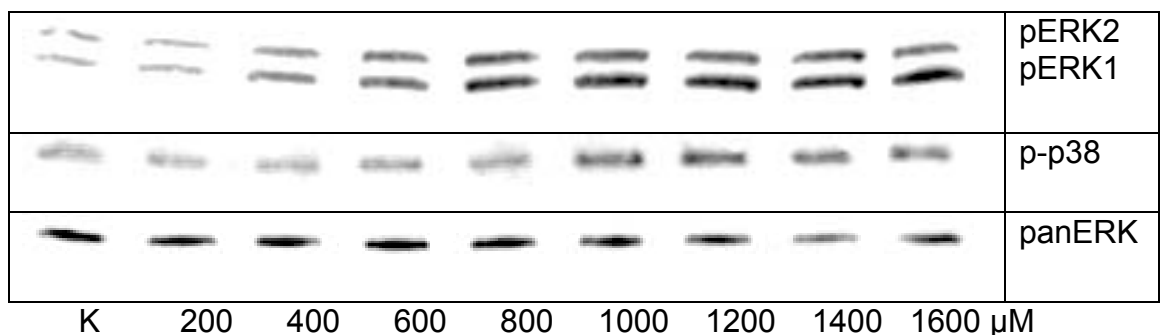
1-Stunden-Inkubation mit Zink

Die 1-stündige Behandlung von differenzierten CaCo2 Zellen mit Zink bewirkt eine signifikante Stimulierung von pERK1 ab 600µM um das 15-fache im Vergleich zum Kontrollsignal. Bei einem weiteren Anstieg der Zinkkonzentrationen erfolgt eine kontinuierliche Signalverstärkung bis 1400µM. Bei dieser Zinkkonzentration beträgt der Grad der Stimulierung das 28-fache des Ausgangswertes. Ab einer Konzentration von 1600µM Zink nimmt die Signalstärke wiederum geringfügig ab und ist mit jener bei 1000µM gemessenen, 23-fachen Stimulierung vergleichbar.

pERK2 wird ebenso ab 600µM signifikant stimuliert. Im weiteren Verlauf ist ersichtlich, dass pERK2 jeweils nur 2/3 der Signalstärke von pERK1 erreicht. Bei einer Zinkkonzentration von 1600µM sinkt der Signalwert von pERK2 auf das 10-fache vom Kontrollwert.

P38 wird erst ab einer Konzentration von 1000µM Zink stimuliert, wobei die Signalstärke bei Konzentrationserhöhung unverändert bleibt.

(A)



(B)

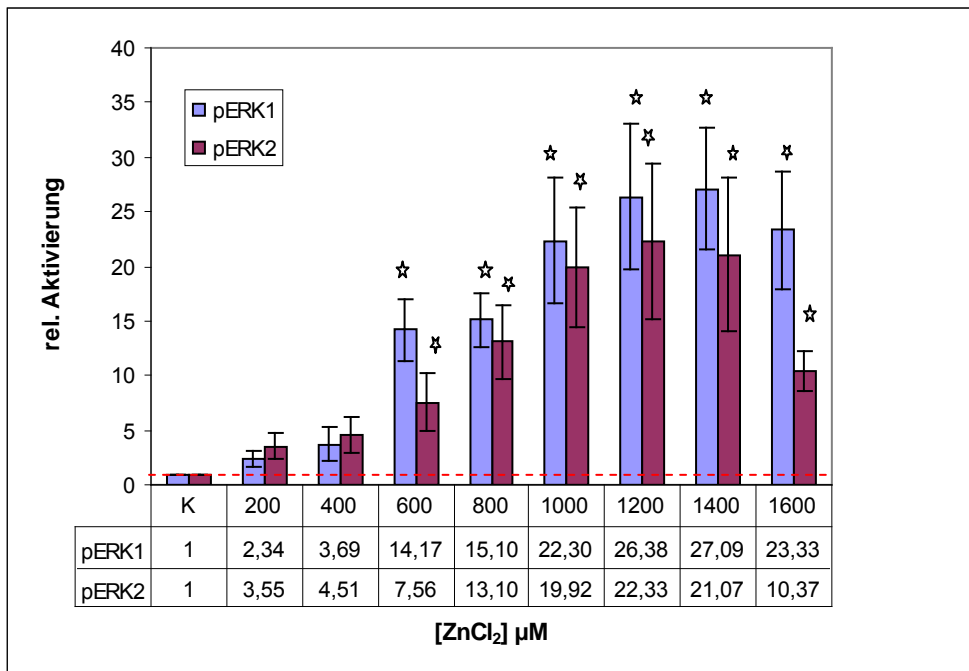


Abbildung 5a: Repräsentatives Western Blot Ergebnis von einem aus jeweils drei unabhängigen Versuchen, nach einer einstündigen Inkubation von differenzierten CaCo2-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen an ZnCl₂

Abbildung 5b: Relative Aktivierung von ERK1 und ERK2 im Vergleich zur Kontrolle bei einer einstündigen Inkubation von differenzierten CaCo2-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen an ZnCl₂, untersucht mittels Western Blot in drei unabhängigen Versuchen. Die dargestellten Balken zeigen Mittelwert ± Standardabweichung der drei Ergebnisse. Als Signifikanztest wurde der one sample t-test zugezogen, mit $p < 0,05$ (*)

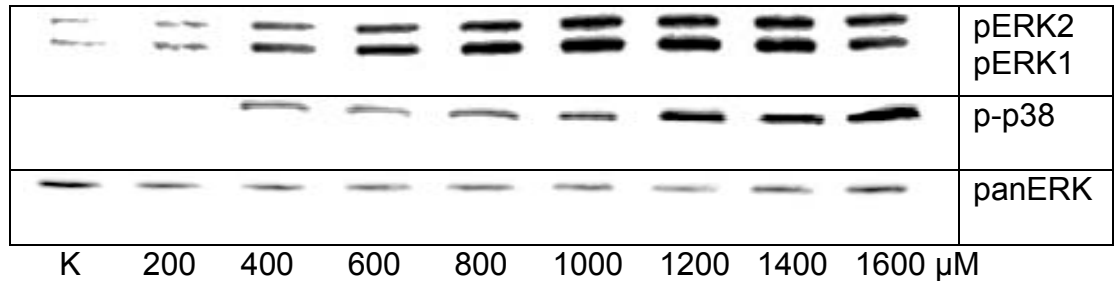
4-Stunden-Inkubation mit Zink

Bei der 4-Stunden-Inkubation von differenzierten CaCo2-Zellen mit Zink kann bereits ab einer Konzentration von 400µM ein deutlicher Anstieg des pERK1-Signals beobachtet werden. Im Vergleich zu pERK1-Signalwerten der 1-Stunden-Inkubation ist bei der 4-Stunden-Inkubation die jeweilige pERK1-Signalstärke um das 2- bis 3-fache erhöht.

Western Blot Ergebnisse zeigen eine etwa 70-fache Stimulierung von pERK1 bei einer Zinkkonzentration von 1200µM und eine 80-fache Stimulierung nach der Inkubation mit 1400µM Zink. Diese fällt jedoch bei 1600µM wieder um die Hälfte ab.

P38 wird ab etwa 400 μ M Zink stimuliert. Ab einer Konzentration von 1200 μ M kommt es zu einer weiteren signifikanten Signalverstärkung.

(A)



(B)

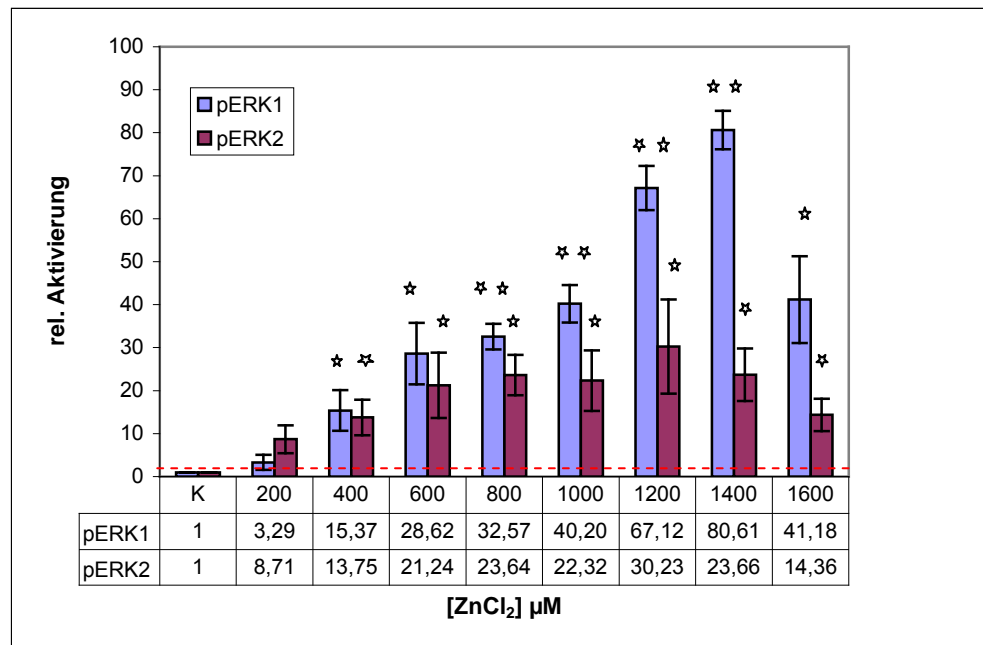


Abbildung 6a: Repräsentatives Western Blot Ergebnis von einem aus jeweils drei unabhängigen Versuchen, nach einer vierstündigen Inkubation von differenzierten CaCo2-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen an ZnCl₂

Abbildung 6b: Relative Aktivierung von ERK1 und ERK2 im Vergleich zur Kontrolle bei einer vierstündigen Inkubation von differenzierten CaCo2-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen an ZnCl₂, untersucht mittels der Western Blot Methode in drei unabhängigen Versuchen. Die dargestellten Banden zeigen Mittelwert \pm Standardabweichung der drei Ergebnisse. Als Signifikanztest wurde der one sample t-test zugezogen, mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**)

Im Zuge der 4-Stunden-Inkubation von differenzierten CaCo2-Zellen wurden die Signalstärken des Membranproteins β -Catenin untersucht. Die Analyse von mehreren unabhängigen Proben zeigt eine Signalverstärkung von β -Catenin im Laufe der Konzentrationserhöhung von Zink.

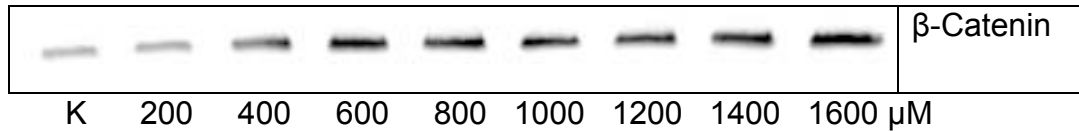


Abbildung 7: Repräsentative Abbildung von einem von drei unabhängigen Western Blot Ergebnissen von β -Catenin nach einer 4-Stunden-Inkubation von differenzierten CaCo2-Zellen mit ansteigenden Zinkkonzentrationen

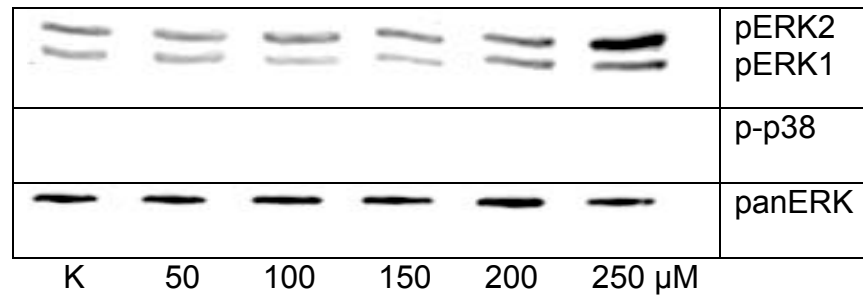
72-Stunden-Inkubation mit Zink

Bei den 72-Stunden-Inkubationen von differenzierten CaCo2-Zellen mit ansteigenden Zinkkonzentrationen wurden Konzentrationen von 50µM bis 250µM betrachtet, denn darüber hinaus kommt es zum Zelltod.

Die Ergebnisse zeigen nur eine sehr geringfügige Stimulierung der Proteinkinasen pERK1 und pERK2 im Vergleich zu kürzeren Inkubationszeitpunkten.

Ab 200µM steigt der Grad der Stimulierung von pERK1 auf das Zweifache verglichen mit dem Kontrollsignal. Dieser Wert verdoppelt sich bei einer Konzentration von 250µM Zink. pERK2 wird ab 100µM zweifach stimuliert. Erst ab 200µM kann eine signifikante Stimulierung um das etwa 6-fache beobachtet werden. Bei 250µM steigt der Grad der Stimulierung von pERK2 auf das 12-fache zum Ausgangswert. P-p38 zeigt nach 72 Stunden Inkubation kein Signal.

(A)



(B)

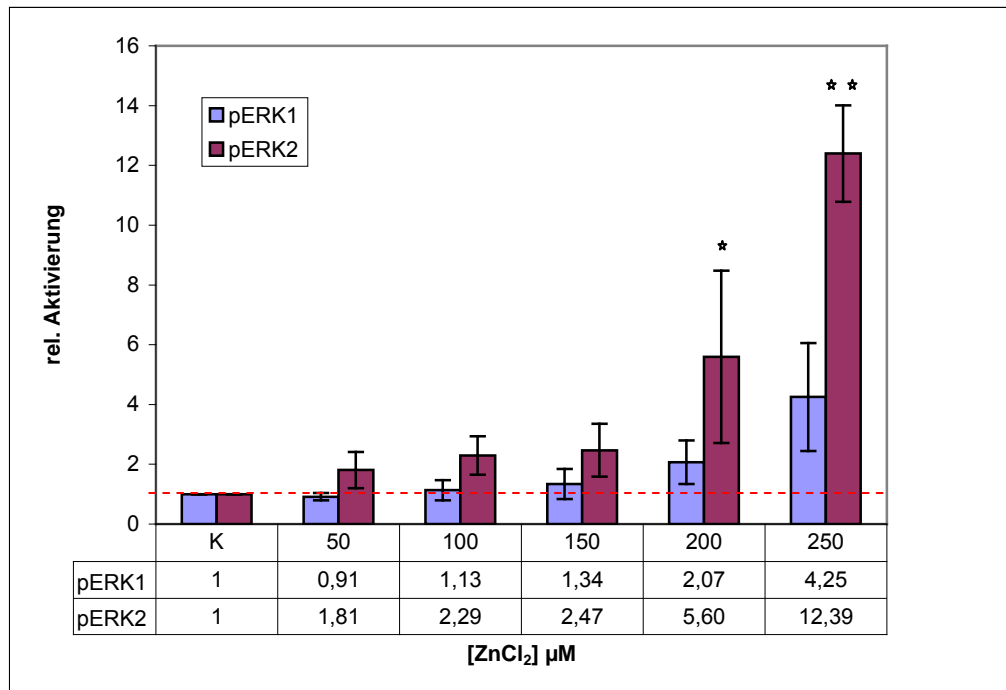


Abbildung 8a: Repräsentatives Western Blot Ergebnis von einem aus jeweils drei unabhängigen Versuchen, nach einer 72-stündigen Inkubation von differenzierten CaCo₂-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen an ZnCl₂

Abbildung 8b: Relative Aktivierung von ERK1 und ERK2 im Vergleich zur Kontrolle bei einer 72-stündigen Inkubation von differenzierten CaCo₂-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen an ZnCl₂, untersucht mittels Western Blot in drei unabhängigen Versuchen. Die dargestellten Banden zeigen Mittelwert ± Standardabweichung der drei Ergebnisse. Als Signifikanztest wurde der one sample t-test zugezogen, mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**)

Anhand von CaCo2-Zellen konnte beobachtet werden, dass ERK1 und ERK2 unterschiedlich stark aktiviert werden. Anhand der Kontrollbanden ist ersichtlich, dass bei undifferenzierten CaCo2-Zellen ERK1 im Vergleich zu ERK2 in höherem Maße aktiviert wird. Bei der Behandlung von undifferenzierten Zellen mit Zink kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Verstärkung des ERK1-Signals, wobei die Aktivierung von ERK2 jeweils geringer ausfällt.

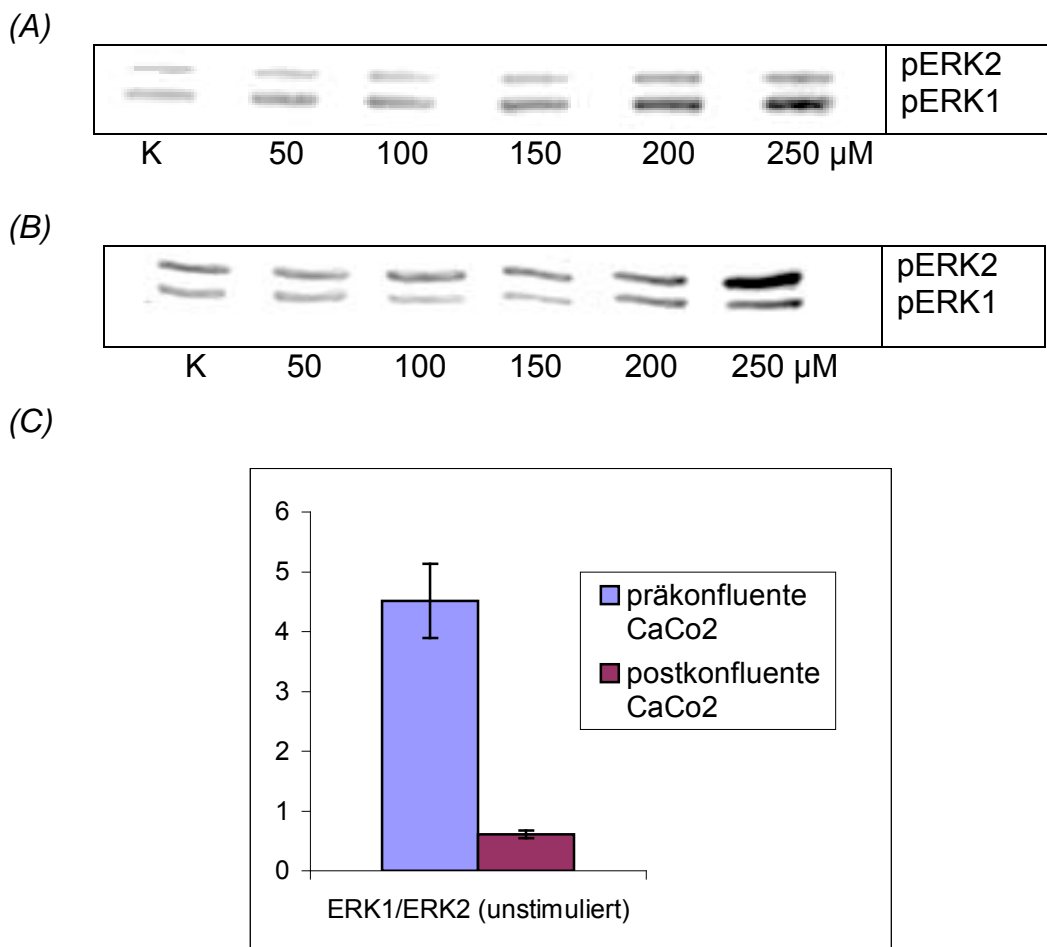


Abbildung 9a: Kontrollbande sowie Signalbanden von pERK1 und pERK2 von undifferenzierten CaCo2-Zellen nach Zinkinkubation

Abbildung 9b: Kontrollbande sowie Signalbanden von pERK1 und pERK2 von differenzierten CaCo2-Zellen nach Zinkinkubation

Abbildung 9c: Vergleich der Expressionsgrade der beiden Isoformen ERK1 und ERK2 in undifferenzierten sowie differenzierten CaCo2-Zellen, anhand der jeweiligen Kontrollbanden

Die Kontrollsignale von ERK1 und ERK2 der undifferenzierten CaCo2 Zellen wurden miteinander in Beziehung gesetzt. Anhand von unabhängigen Versuchen wurde der Wert von ERK1/ERK2 der Kontrollbande ermittelt, er beträgt im Mittel 4,49. (N=8)

Im Laufe der Differenzierung der CaCo2-Zellen kommt es zu einer Umkehrung der Kontrollsignale von ERK1 und ERK2. Durch unabhängige Versuche konnte das Verhältnis der Kontrollbanden errechnet werden, der Bezug von ERK1 zu ERK2 beträgt 0,51. (N=8)

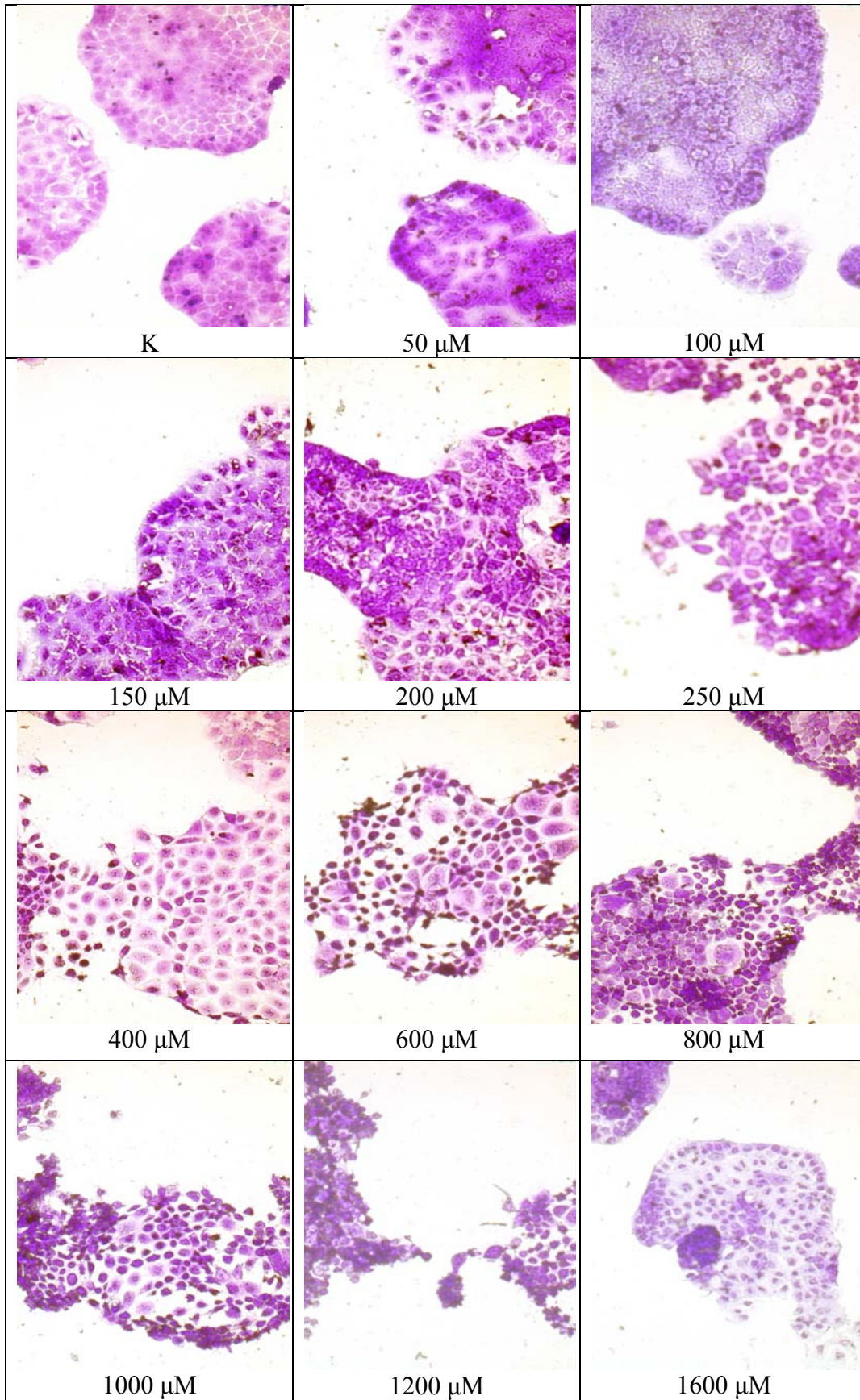
4.2. Adhäsionstests mit Kristallviolett

Die Kristallviolett-Methode gibt Rückschlüsse auf den Grad der Zellablösung von CaCo2-Zellen nach der Behandlung mit Zink. Durch die anschließende Behandlung mit den Lösungsmitteln Ethanol und/oder Isopropanol werden die anhaftenden, gefärbten Zellen von der Unterlage abgelöst und zersetzt. Nach Übertragung der Zellsuspension in eine 96-well-Platte kann die Farbtintensität am Plattenphotometer bei 550nm ermittelt werden.

4.2.1. Undifferenzierte, präkonfluente CaCo2-Zellen nach 4-Stunden-Inkubation

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen undifferenzierte CaCo2-Zellen, welche für 4 Stunden mit ansteigenden Zinkkonzentrationen (50µM bis 1600µM) inkubiert wurden. Obwohl die relative Farbtintensität erst ab einer Konzentration von 1200µM signifikant abnimmt (siehe Balkendiagramm), ist bereits ab 250µM eine Loslösung von einzelnen Zellen vom Zellverband im Mikroskop ersichtlich. Mit steigenden Konzentrationen kommt es zu einer progressiven Ablösung von der Unterlage.

(A)



(B)

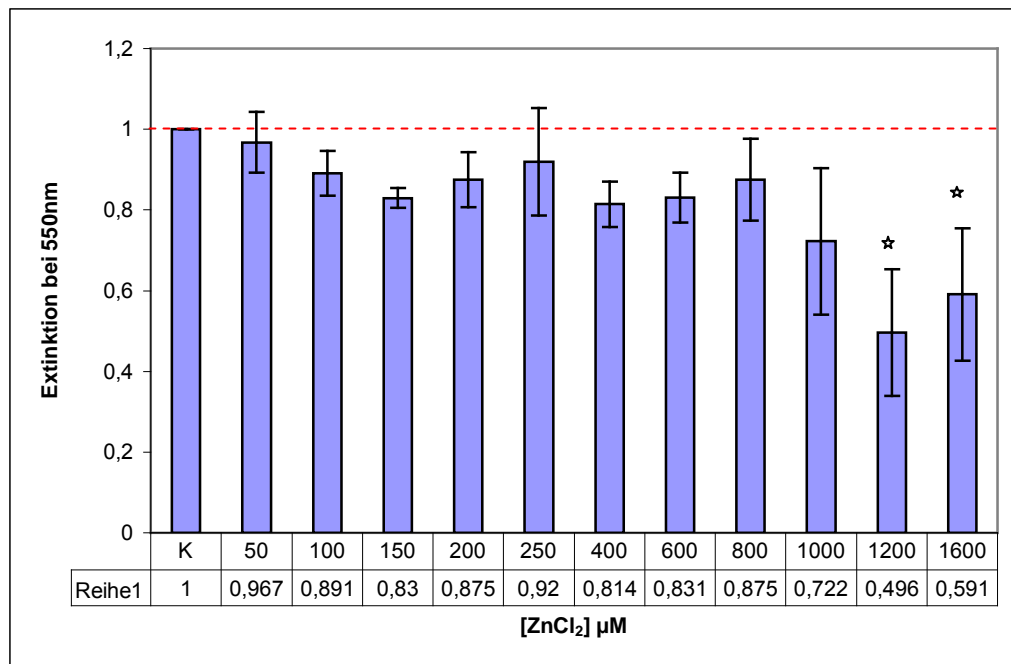


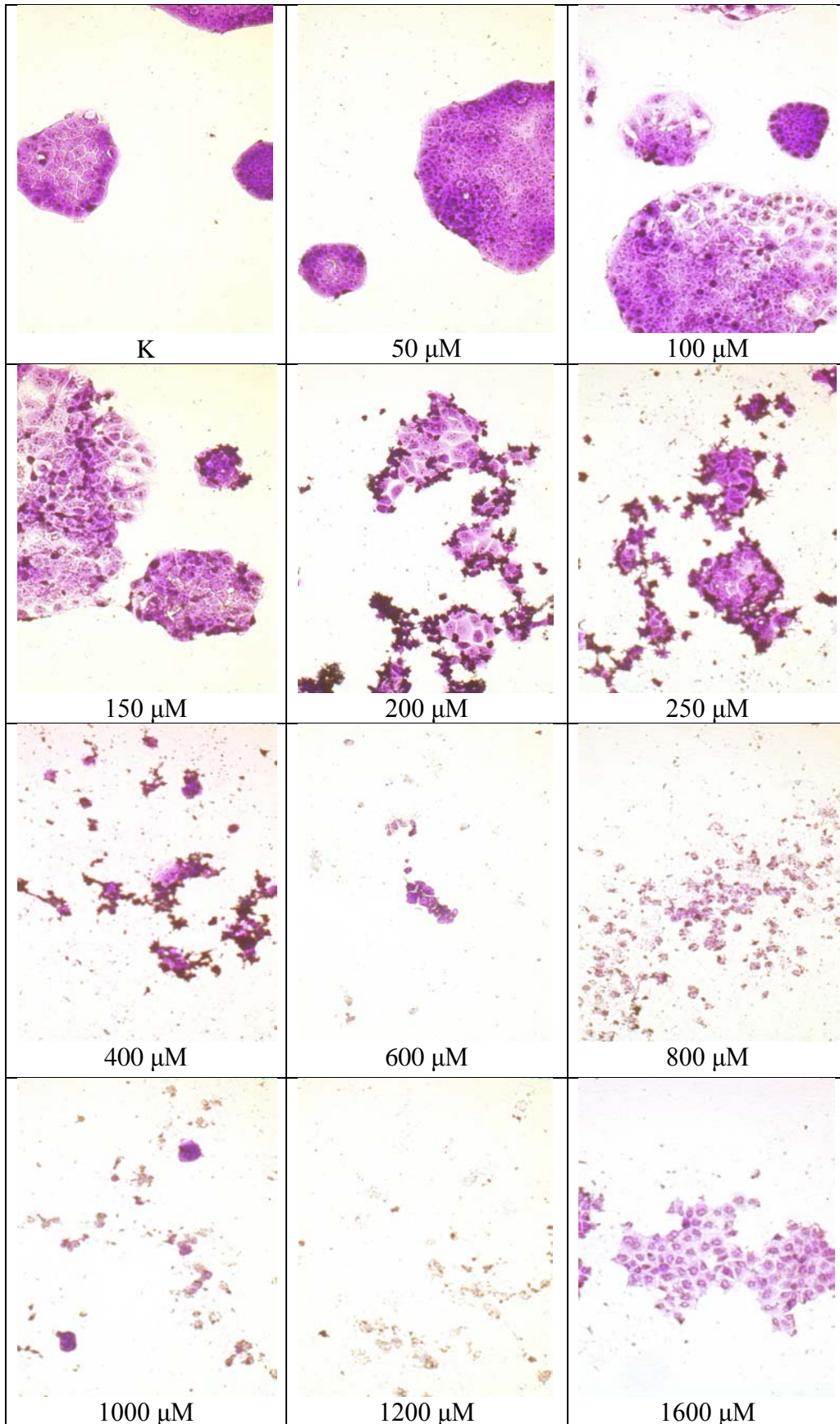
Abbildung 10a: Repräsentative mikroskopische Abbildungen (10-fache Vergrößerung) von undifferenzierten CaCo2-Zellen, gefärbt mit Kristallviolett, nach einer vierstündigen Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen an ZnCl₂

Abbildung 10b: Photometrische Messung der Extinktionswerte bei 550nm von drei unabhängigen Färbeversuchen von undifferenzierten CaCo2-Zellen nach einer vierstündigen Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen an ZnCl₂ und Bestimmung der relativen Farbintensität nach Abzug des Leerwertes (1:1 Isopropanol/50%-Ethanol-Gemisch) durch Bezug auf die auf 1 gesetzten Kontrollwerte. Die dargestellten Balken zeigen Mittelwert ± Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen. Als Signifikanztest wurde der one sample t-test zugezogen, mit $p < 0,05$ (*)

4.2.2. Undifferenzierte, präkonfluente CaCo2-Zellen nach 12-Stunden-Inkubation

Bei einer 12-stündigen Inkubation mit Zink kommt es bereits ab einer Konzentration von 200µM zum überwiegenden Zelltod. Der Zell-Zell-Kontakt wird ab 100µM gelöst. Ab einer Konzentration von 400µM geht die Haftung auf der Unterlage gänzlich verloren.

(A)



(B)

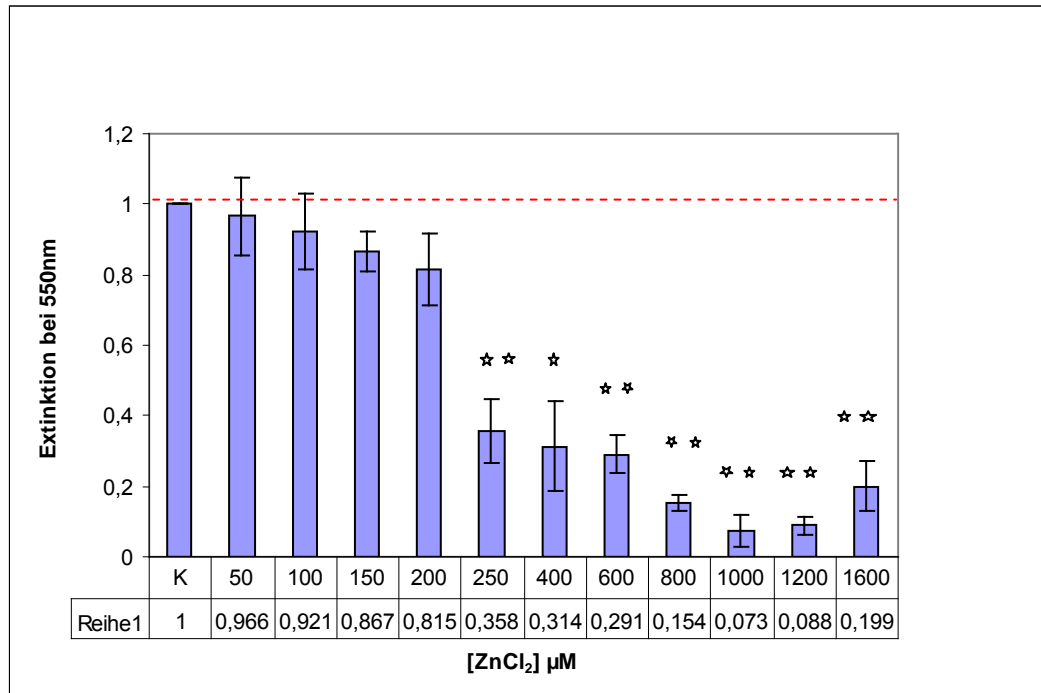


Abbildung 11a: Repräsentative mikroskopische Abbildungen (10-fache Vergrößerung) von undifferenzierten CaCo₂-Zellen, gefärbt mit Kristallviolett, nach einer 12-stündigen Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen an ZnCl₂

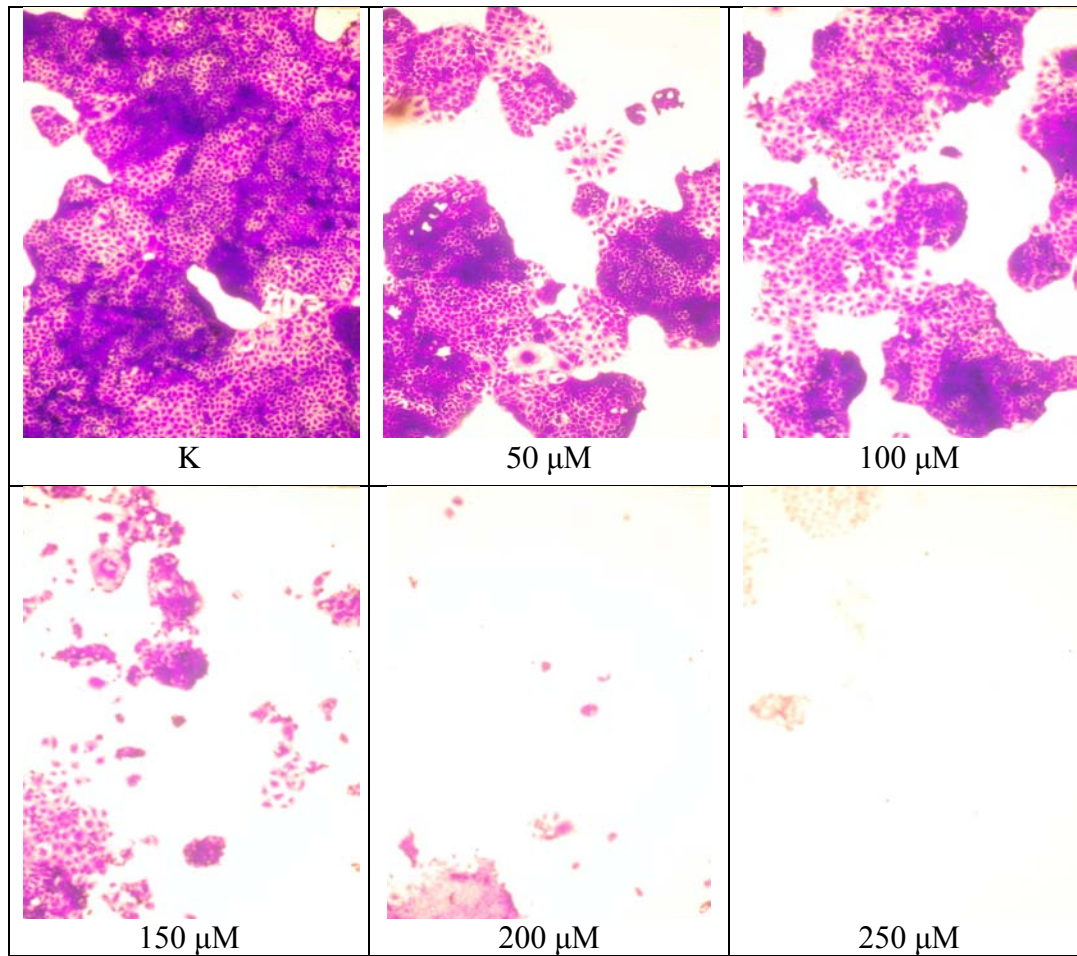
Abbildung 11b: Photometrische Messung der Extinktionswerte bei 550nm von drei unabhängigen Färbeversuchen von undifferenzierten CaCo₂-Zellen nach einer 12-stündigen Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen an ZnCl₂ und Bestimmung der relativen Farbintensität nach Abzug des Leerwertes (1:1 Isopropanol/50%-Ethanol-Gemisch) durch Bezug auf die auf 1 gesetzten Kontrollwerte. Die dargestellten Balken zeigen Mittelwert ± Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen. Als Signifikanztest wurde der one sample t-test zugezogen, mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**)

4.2.3. Undifferenzierte, präkonfluente CaCo₂-Zellen nach 24-Stunden-Inkubation

Da die Loslösung von der Unterlage bei der 12-Stunden-Inkubation bereits ab einer Konzentration von 250µM Zink zu beobachten war, wurden die undifferenzierten CaCo₂-Zellen bei der 24-Stunden-Inkubation nur mit Zinkkonzentrationen behandelt, die bis 250µM reichten.

Bei dem 24-Stunden-Versuch kann eine Abnahme der Zellintegrität ab 100 μ M Zink beobachtet werden. Eine komplette Zellablösung erfolgt ab einer Konzentration von 200 μ M. Diese Beobachtung kann durch eine Farbintensitätsmessung am Photometer quantifiziert werden.

(A)



(B)

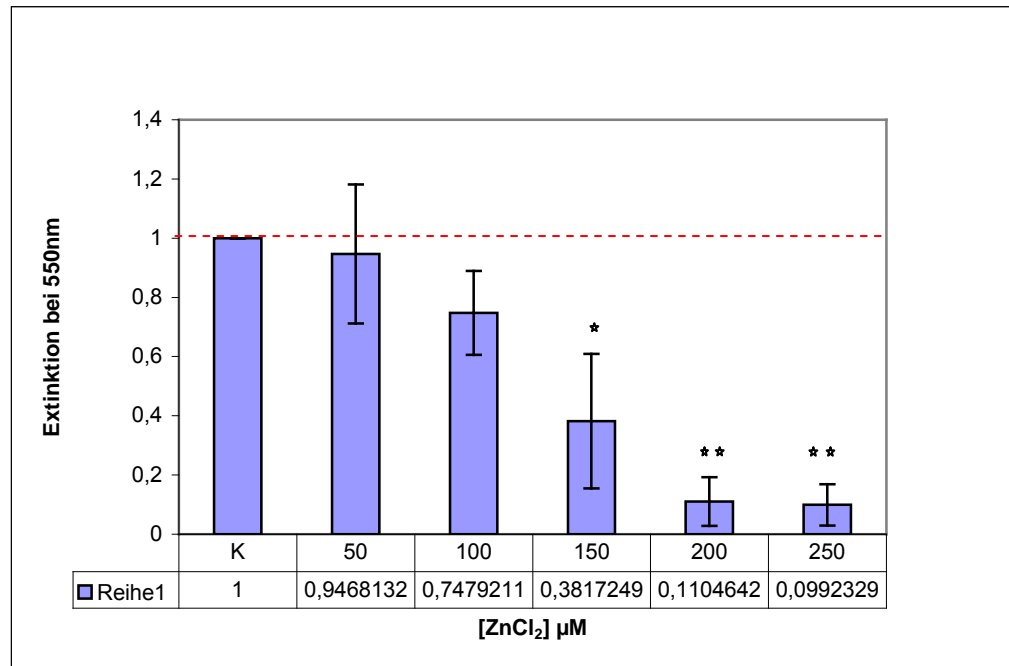


Abbildung 12a: Repräsentative mikroskopische Abbildungen (10-fache Vergrößerung) von undifferenzierten CaCo₂-Zellen, gefärbt mit Kristallviolett, nach einer 24-stündigen Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen an ZnCl₂

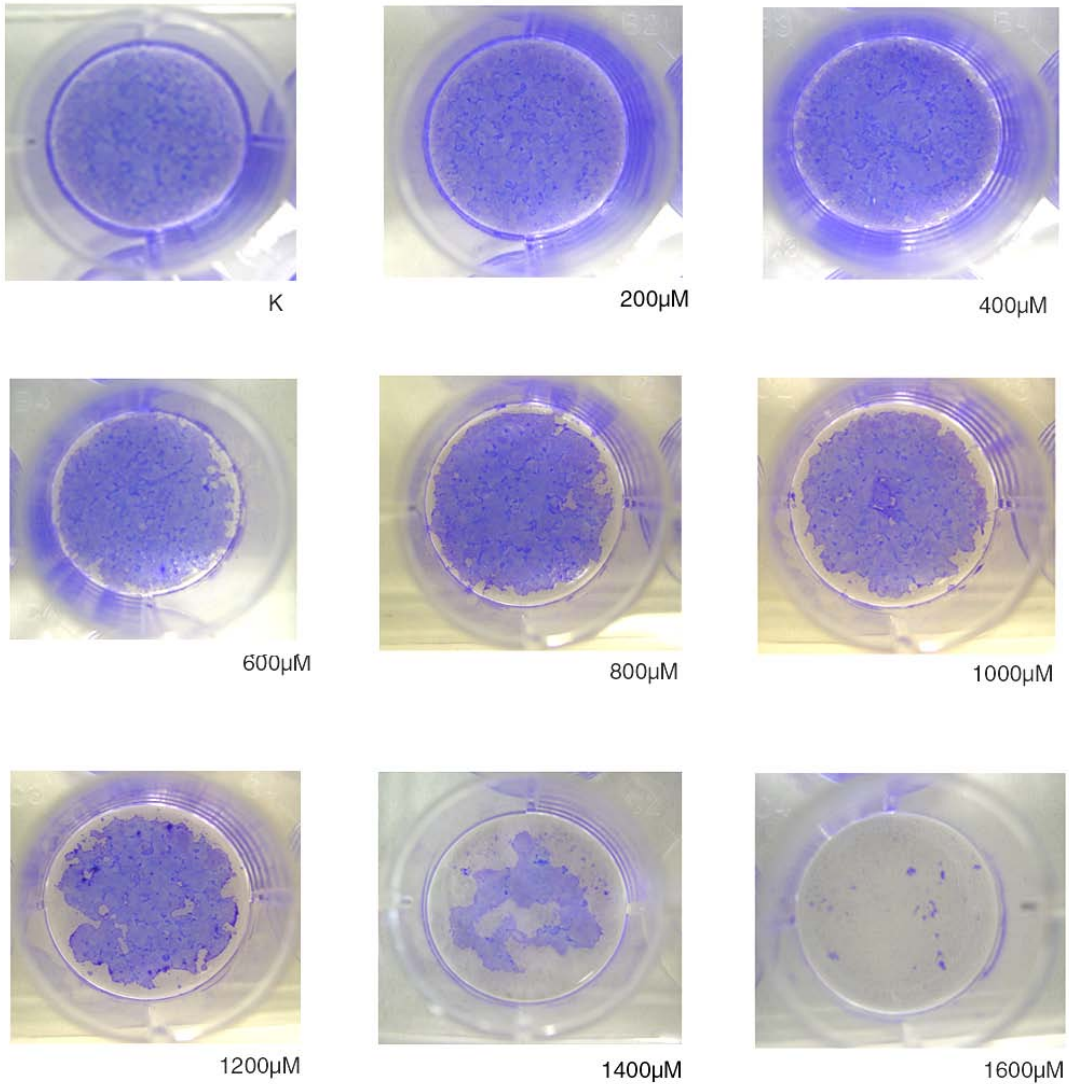
Abbildung 12b: Photometrische Messung der Extinktionswerte bei 550nm von drei unabhängigen Färbeversuchen von undifferenzierten CaCo₂-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen an ZnCl₂ und Bestimmung der relativen Farbintensität nach Abzug des Leerwertes (1:1 Isopropanol/50%-Ethanol-Gemisch) durch Bezug auf die auf 1 gesetzten Kontrollwerte. Die dargestellten Balken zeigen Mittelwert ± Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen. Als Signifikanztest wurde der one sample t-test zugezogen, mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**)

4.2.4. Differenzierte, postkonfluente CaCo₂ Zellen nach 24-Stunden-Inkubation

Es ist bekannt, dass differenzierte CaCo₂-Zellen eine höhere Toleranz gegenüber hohen Zinkkonzentrationen aufweisen [ZÖDL et al., 2003]. Daher wurden bei der 24-Stunden-Inkubation Konzentrationen zwischen 200µM und 1600µM Zink gewählt.

Aus den Abbildungen geht hervor, dass erst eine Konzentration von $1000\mu\text{M}$ eine visuell auffällige Abnahme der Farbintensität bewirkt. Die Zellablösung von der Unterlage beginnt am Rand der einzelnen Wells und erstreckt sich in Richtung Mitte. Der Verlust des Zell-Zell-Kontaktes erfolgt bereits bei $600\mu\text{M}$.

(A)



(B)

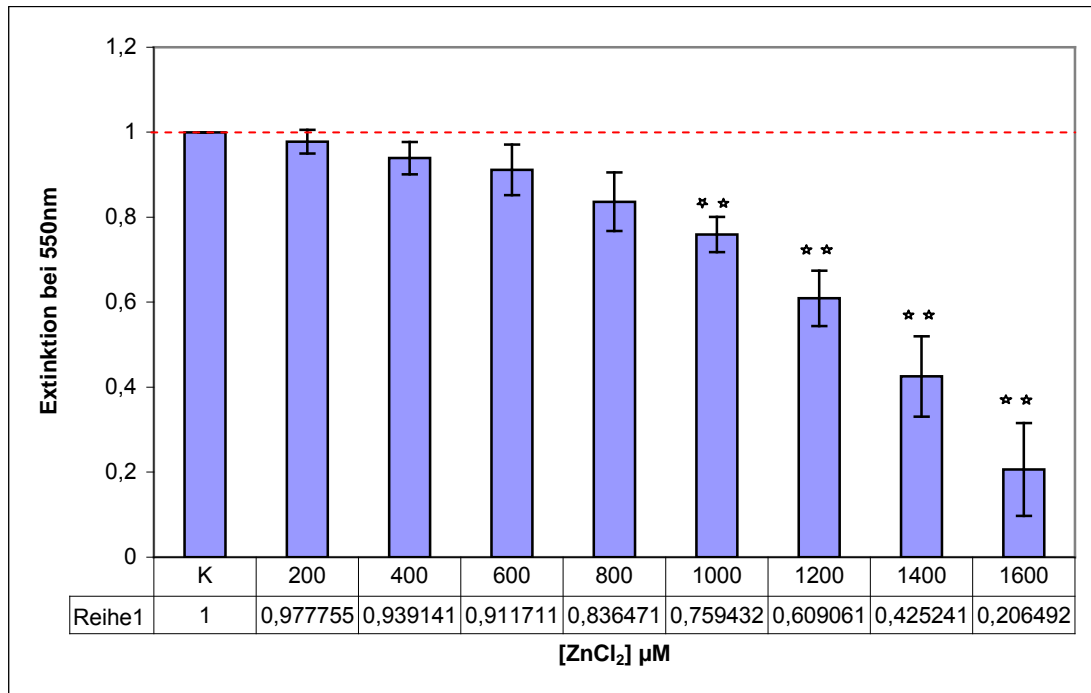


Abbildung 13a: Repräsentative makroskopische Abbildungen von differenzierten CaCo₂-Zellen in 12-well Platten, gefärbt mit Kristallviolett, nach einer 24-stündigen Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen an ZnCl₂

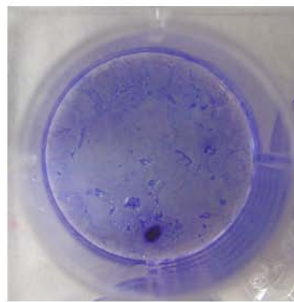
Abbildung 13b: Photometrische Messung der Extinktionswerte bei 550nm von drei unabhängigen Färbeversuchen von differenzierten CaCo₂-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen an ZnCl₂ und Bestimmung der relativen Farbintensität nach Abzug des Leerwertes (1:1 Isopropanol/50%-Ethanol-Gemisch) durch Bezug auf die auf 1 gesetzten Kontrollwerte. Die dargestellten Balken zeigen Mittelwert ± Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen. Als Signifikanztest wurde der one sample t-test zugezogen, mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**)

4.2.5. Differenzierte, postkonfluente CaCo₂ Zellen nach 72-Stunden-Inkubation

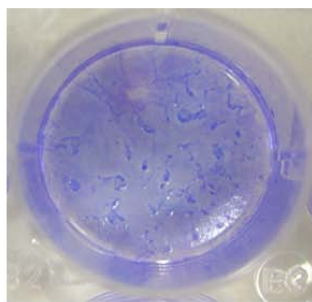
Aus den 72-Stunden-Versuchen geht hervor, dass die Zellintegrität mit steigender Zinkkonzentration kontinuierlich abnimmt. Infolge der längeren Inkubation mit Zink –verglichen zur 24-Stunden-Inkubation – ist hierbei bereits ab 400µM eine deutliche Ablösung der Zellen von der Unterlage ersichtlich.

Die gemessene Farbintensität bei 1600 μ M erreicht Werte ähnlich des Leerwertes, einhergehend mit der Beobachtung, dass bei dieser Konzentration nur noch einzelne Zellen an der Unterlage anhaften.

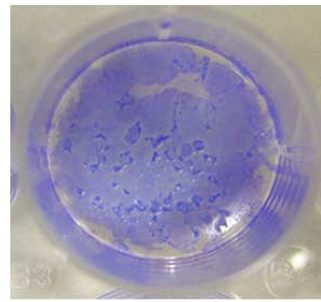
(A)



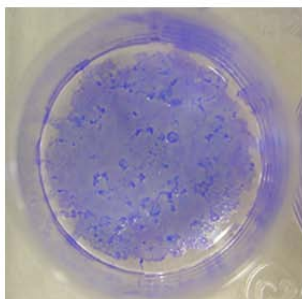
K



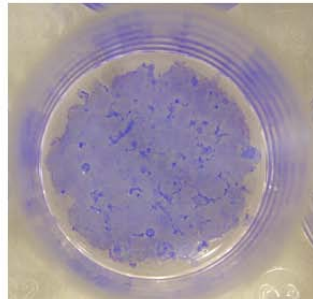
200 μ M



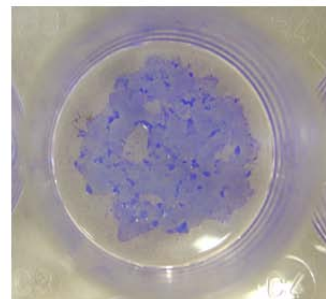
400 μ M



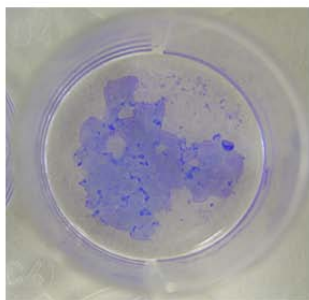
600 μ M



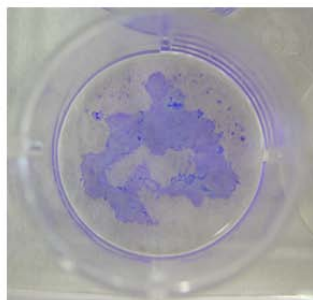
800 μ M



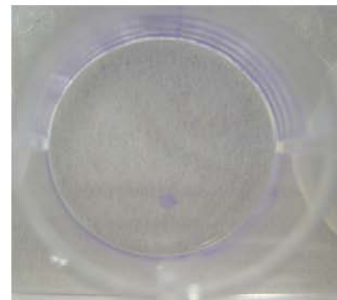
1000 μ M



1200 μ M



1400 μ M



1600 μ M

(B)

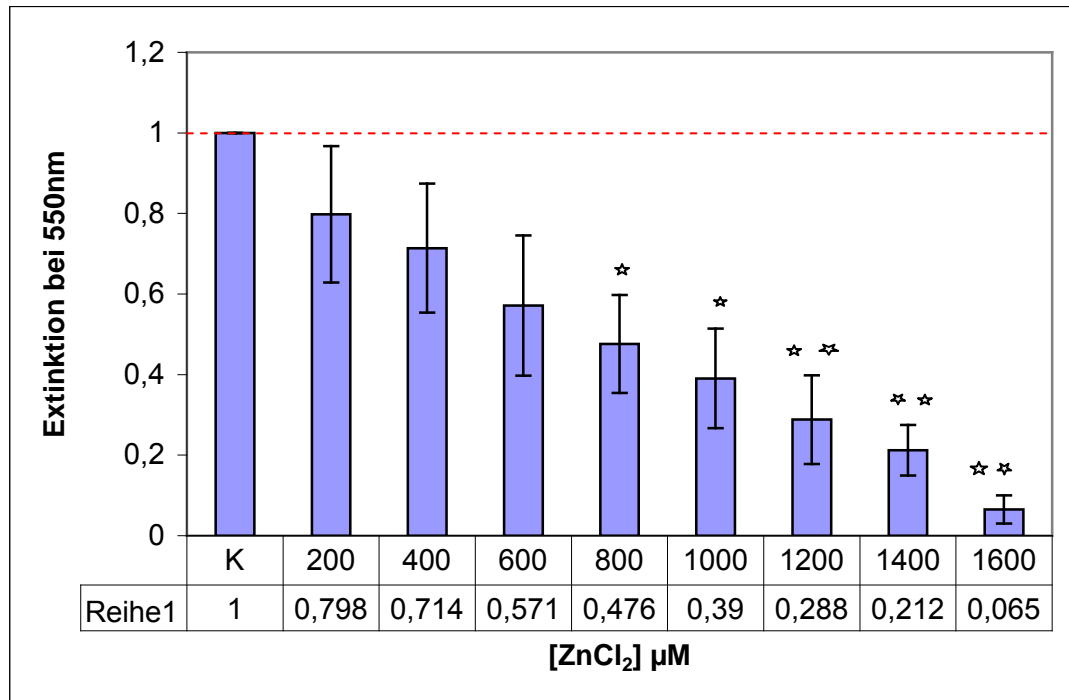


Abbildung 14a: Repräsentative makroskopische Abbildungen von differenzierten CaCo₂-Zellen in 12-well Platten, gefärbt mit Kristallviolett, nach einer 72-stündigen Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen an ZnCl₂

Abbildung 14b: Photometrische Messung der Extinktionswerte bei 550nm von drei unabhängigen Färberversuchen von differenzierten CaCo₂-Zellen nach einer 72-stündigen Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen an ZnCl₂ und Bestimmung der relativen Farbintensität nach Abzug des Leerwertes (1:1 Isopropanol/50%-Ethanol-Gemisch) durch Bezug auf die auf 1 gesetzten Kontrollwerte. Die dargestellten Balken zeigen Mittelwert ± Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen. Als Signifikanztest wurde der one sample t-test zugezogen, mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**)

5. Diskussion

Die in den vorliegenden Kristallviolettversuchen untersuchte Zinktoleranz von CaCo₂-Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien wurde im Folgenden durch Ergebnisse der Signaltransduktion ergänzt. Es konnte festgestellt werden, ab welchen Zinkkonzentrationen die Proteinkinasen des MAPK-Signalweges signifikant stimuliert wurden und ab welchen eine Loslösung der Zellen von der Unterlage erfolgte, indem die Farbintensität von Kristallviolett gemessen wurde, welche sich bei allen Inkubationsversuchen mit steigender Zinkkonzentration verminderte. Die Zinktoleranz der CaCo₂-Zellen ist in jedem Differenzierungsstadium von der Dauer und der Höhe der Konzentration an ZnCl₂ abhängig.

Auswirkung von Zink auf undifferenzierte CaCo₂-Zellen

Undifferenzierte CaCo₂-Zellen wurden 6-8 Tage kultiviert und können anhand ihrer Merkmale mit Dickdarmzellen verglichen werden.

Sie wurden in den vorliegenden Versuchen mit Zinkkonzentrationen zwischen 50µM und 1600µM inkubiert und anschließend mit Kristallviolett gefärbt. Es wurde die Zinkkonzentration ermittelt, ab welcher eine Trennung einzelner Zellen vom Zellverband stattgefunden hat bis zur vollständigen Loslösung der Zellen von der Unterlage.

Nach vierstündiger Inkubation kommt es zu einer signifikanten Abnahme der Farbintensität ab einer Konzentration von 1200µM Zink, einhergehend mit einer großflächigen Loslösung der Zellen von ihrer Unterlage. Auf Signaltransduktionsebene ist eine Stimulierung der Proteinkinasen ERK1 und ERK2 bereits ab 150µM Zink, von p38 ab 200µM Zink zu beobachten. Bei diesen Konzentrationen konnte zwar noch keine signifikante Loslösung der Zellen von der Unterlage beobachtet werden, doch zeigen die mikroskopischen Abbildungen bereits deutliche Veränderungen. Es sind somit Reaktionen der Zelle auf extrazelluläres Zink bereits ab geringen Konzentrationen detektierbar.

Eine Langzeitinkubation von 12 Stunden zeigte eine dramatische Abnahme der Adhäsion und einen damit einhergehenden Rückgang der Extinktion um mehr als die Hälfte ab $250\mu\text{M}$, verglichen mit den Kontrollwerten. Nach einer 24-Stunden-Inkubation konnte bereits ab $150\mu\text{M}$ eine signifikant verringerte Zelladhäsion verzeichnet werden.

Die Analysen demonstrieren eine relativ geringe Toleranz der undifferenzierten Zellen gegenüber ZnCl_2 . Die Toleranz, welche anhand sichtbarer Merkmale wie einer intakten Zellstruktur und dem Haften der Zellen an der Unterlage näher definiert werden kann, ist bei niedrigen Zinkkonzentrationen im Bereich zwischen $50\mu\text{M}$ und $250\mu\text{M}$ und bei Kurzzeitinkubationen höher, obgleich ebenso bei Langzeitinkubationen in diesem Konzentrationsbereich keine Zellschäden beobachtet werden können.

Die Arbeitsgruppe um Zödl behandelte undifferenzierte CaCo_2 -Zellen mit Konzentrationen von $30\mu\text{M}$ bis $200\mu\text{M}$ Zinksulfat (ZnSO_4) für die Dauer von 24 Stunden. Im Zuge dieser Untersuchungen wurde infolge von Viabilitäts- und Enzymmessungen ermittelt, ab welchen Konzentrationen Zellschäden auftraten. Eine signifikant erhöhte Toxizität konnte ab einer Zinkkonzentration von $200\mu\text{M}$ festgestellt werden [ZÖDL et al., 2003]. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Färbeversuche zeigten bei einer 24-Stunden Inkubation von undifferenzierten CaCo_2 -Zellen bereits bei $50\mu\text{M}$ Zink eine beginnende Loslösung der Zellen vom Zellverband und einen fast gänzlichen Verlust der Adhäsion an der Unterlage bei $200\mu\text{M}$ Zink.

Auswirkungen von Zink auf differenzierte CaCo_2 -Zellen

Differenzierte CaCo_2 -Zellen ähneln in ihrer Struktur und ihren Merkmalen oberen Dünndarmzellen und sind, wie im Ergebnisteil gezeigt, in der Lage höhere Zinkkonzentrationen zu tolerieren.

Langzeitinkubationen von differenzierten CaCo_2 -Zellen für 72 Stunden im Konzentrationsbereich zwischen $50\mu\text{M}$ und $1600\mu\text{M}$ haben gezeigt, dass eine Loslösung vom Zellverband sowie eine Abnahme der Extinktion ab $400\mu\text{M}$ Zink zu finden ist.

Um klare Messwerte zu erhalten wurden die Zinkkonzentrationen für die korrespondierenden Versuche zur Signaltransduktion zwischen 50µM und 250µM gewählt.

ERK1 und ERK2 wurden in diesem Fall ab 200µM signifikant stimuliert, p38 gab bei keiner der gemessenen Konzentrationen ein sichtbares Signal.

Der Grad der Stimulierung von ERK1 und ERK2 ist hierbei vergleichbar mit jenen Werten der Kurzzeitinkubationen bei der Konzentration von 200µM Zink.

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte höhere Zinktoleranz von differenzierten CaCo2-Zellen konnte in Versuchen der Arbeitsgruppe um Zödl untermauert werden. In diesem Fall wurden erst ab einer Konzentration von 400µM ZnSO₄ bei einer Inkubationsdauer von 24 Stunden signifikante Zellschäden festgestellt, Zellstrukturveränderungen und eine verminderte Adhärenz waren jedoch bereits bei 200µM ersichtlich [ZÖDL et al., 2003].

Molledo et al erforschten die möglichen Ursachen der erhöhten Zinktoleranz von differenzierten CaCo2-Zellen. Im Zuge der Analysen konnte eine erhöhte Syntheserate von Metallothioneinen bei der Differenzierung der Enterozyten beobachtet werden. Die Expression von Metallothionein ist an die lumenseitige Zinkkonzentration angepasst und wird je nach Höhe der Konzentration im Darm reguliert. Metallothionein ist bis zu einem gewissen Grad in der Lage, hohe extrazelluläre Zinkkonzentrationen abzupuffern [MOLTEDO et al., 2000].

Unterschiede zwischen den Differenzierungsstadien

Die Signalproteine ERK 1/2 und p38 werden sowohl in undifferenzierten, als auch differenzierten CaCo2-Zellen durch die Behandlung mit Zink stimuliert; bei undifferenzierten Zellen ist jedoch eine stärkere Aktivierung der Proteinkinasen ersichtlich. Dies ist möglicherweise dadurch bedingt, dass undifferenzierte CaCo2-Zellen andere Expressionsmuster von diversen Signalproteinen aufweisen. Diesbezüglich wurde eine erhöhte Aktivität des MAPK-Pathways bei undifferenzierten im Vergleich zu differenzierten CaCo2-Zellen gemessen [ZÖDL et al., 2003].

Große Unterschiede sind auch anhand der Stimulierung von p38 in undifferenzierten sowie in differenzierten CaCo2-Zellen mit Zink ersichtlich.

In undifferenzierten CaCo2-Zellen deutet eine Stimulierung von p38 nach einer Kurzzeitinkubation von ein oder vier Stunden mit Zinkkonzentrationen im Bereich von 200µM bereits auf eine mögliche Schädigung der Zellen hin [COMES et al., 2006].

Differenzierte Zellen reagieren mit Stimulierung von p38 nach Kurzzeitinkubationen mit Zink erst bei Konzentrationen ab 1000µM. Hier fanden sich nach einer 72-Stunden-Inkubation keine Signalbanden von p-p38. Dies ist dadurch bedingt, dass im untersuchten Bereich mit Konzentrationen zwischen 50µM und 250µM Zink keine Schädigung auftrat.

Aus den Daten ist ersichtlich, dass die beiden Signalproteine ERK1 und ERK2 durch Zink in unterschiedlicher Weise und getrennt voneinander stimuliert werden.

Bei undifferenzierten CaCo2-Zellen ist eine stärkere Expression von ERK1 im Vergleich zu ERK2 ersichtlich ($ERK1 > ERK2$), welche sowohl bei den Kontrollbanden als auch bei den Signalbanden beobachtet werden kann. Bei differenzierten CaCo2 Zellen dreht sich das ERK1/ERK2-Verhältnis der Kontrollbanden um. Kurzzeitinkubationen von ein und vier Stunden zeigen jedoch weiterhin nach Stimulierung mit Zink eine $ERK1 > ERK2$ -Ratio. ERK1 wird bei allen gemessenen Zinkkonzentrationen stärker aktiviert als ERK2, vergleichbar mit den Ergebnissen der undifferenzierten Zellen. Die Umkehrung des Verhältnisses der Signalbanden konnte ausschließlich bei den 72-Stunden-Inkubationen der differenzierten CaCo2-Zellen beobachtet werden. Dieses zeigt sich ebenso bei den Kontrollbanden.

Mittels Methoden der Genstilllegung von ERK1 bzw. ERK2 konnte eine um das Vierfache erhöhte Expression von ERK2 gegenüber ERK1 anhand von Fibroblasten der Linie NIH 3T3 demonstriert werden. Zu demselben Ergebnis kam man auch bei der Messung der phosphorylierten Formen. Über die unterschiedlichen Expressionslevel von ERK1 und ERK2 ist es der Zelle möglich, die Stärke der ERK-Signale präziser zu regulieren [LEFLOCH et al., 2008].

Auswirkungen von Zink auf die Expression von β -Catenin in differenzierten CaCo2-Zellen

Im Verlauf der Stimulierung von differenzierten CaCo2-Zellen mit hohen Konzentrationen an Zink konnte ein deutlicher Anstieg des β -Catenin-Signals beobachtet werden. Diese Ergebnisse dienen jedoch nur der Betrachtung des Signalverlaufs nach einer vierstündigen Inkubation mit Zink. Es sind somit keine Vergleiche mit Signalen von Zellen unter anderen Bedingungen möglich.

Tremblay et al fanden einen Zusammenhang zwischen dem ERK-Signalweg und der endothelialen Membranpermeabilität. So kommt es durch die Aktivierung der ERK-Signalproteine zu einer Entkoppelung von E-Cadherin und β -Catenin, was zu einer Lockerung der Zellkontakte führt [TREMBLAY et al., 2007]. Aus anderen Berichten geht hervor, dass die Expression von β -Catenin und anderen Zellkontaktmolekülen durch die Aktivierung des MAPK-Signalweges vermindert wird. Raf-1 spielt hierbei eine entscheidende Rolle. Dadurch kommt es, unter anderem, zu einer Lösung der Zellkontakte in Schilddrüsenkarzinomzellen der Linie MTC [NING et al., 2008].

Die genauen molekularen Vorgänge, die den Effekten von Zink auf die Expression von β -Catenin zugrunde liegen, müssen in weiteren Studien näher betrachtet werden.

Vergleiche mit anderen Zelllinien

Neben Versuchen mit CaCo2-Zellen wurde von diversen Arbeitsgruppen die Zinktoleranz einiger anderer Zelllinien durch Inkubationsversuche mit Zink ermittelt. Die Betrachtung verschiedener Darmzelllinien zeigte ähnliche Ergebnisse, verglichen mit den vorliegenden Resultaten. Durch die Bestimmung von Apoptosemarkern, Enzymaktivitäten usw. konnten genauere Aussagen über den Zeitpunkt und die Zinkkonzentration gemacht werden, ab welchen Merkmale einer Zinktoxizität erkennbar wurden.

Studien mit menschlichen Kolonkarzinomzellen der Linie HT-29 zeigen eine vergleichbare Reaktion auf unterschiedlich hohe Zinkkonzentrationen wie CaCo2-Zellen. Diese wurden im Bereich zwischen 150-1500µM ZnCl₂ gewählt. Die Inkubationsdauer betrug 72 Stunden.

Bei einer Konzentration von 150µM wurde ein Anstieg an intrazellulären freien Zinkionen sowie eine erhöhte Transkriptionsrate von Metallothionein gemessen. Bezüglich der Viabilität und der Zellproliferation hat die Applikation von 150µM Zink zum Zellmedium zwar keinerlei toxische Auswirkungen auf HT-29 Zellen, Konzentrationen über 150µM verursachen jedoch messbare Zellschäden [KINDERMANN et al., 2005].

Park et al untersuchten die Regulation des Zellwachstums bei 72-stündiger Inkubation von HT-29 mit unterschiedlich hohen Zinkkonzentrationen. Auch hierbei konnte gezeigt werden, dass Konzentrationen bis 100µM das Zellwachstum positiv beeinflussen, während 200µM, 300µM und 500µM Zink nach 9 Stunden pERK1/2, p21 und Cyclin D1 aktivieren [PARK et al., 2003].

Die Arbeitsgruppe um Cario untersuchte die Zinktoleranz von Rattendarmzellen der Linie IEC-6 nach 24-stündiger Inkubation mit ZnSO₄. In zwei parallelen Versuchen wurde das Nährmedium jeweils mit 25µM bzw. 250µM Zink versetzt. Ergebnisse zeigen eine Veränderung der Zellmorphologie sowie eine Erhöhung der Ausschüttung des Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) nach Inkubation mit 250µM Zink.

Nach Inkubation mit Zinkkonzentrationen über 100µM gehen die Zellen eine Apoptose ein. Konzentrationen von 25µM hingegen bewirken keine negativen Veränderungen.

Aus diesen Analysen kann geschlossen werden, dass Zinkkonzentrationen im physiologischen Bereich bis 100µM keinerlei toxische Effekte haben, während Konzentrationen über 100µM die Zellmigration einschränken und im weiteren Verlauf den Zelltod induzieren [CARIO et al., 2000].

Eine Zellschädigung durch Zink kann ebenso anhand von laryngealen Epithelzellen der Linie HEP-2 demonstriert werden. HEP-2 Zellen wurden mit Zinkkonzentrationen von 1,5µM, 15µM, 100µM und 150µM für 96 Stunden inkubiert. Durch colorimetrische, immunozytochemische und diverse Viabilitätsmessungen konnte festgestellt werden, dass bei der Inkubation mit Zinkkonzentrationen zwischen 15-100µM keine negativen Effekte auftreten. Bei höheren Konzentrationen jedoch kommt es zu Zeichen einer deutlichen Zinktoxizität. Bei sehr niedrigen Konzentrationen von 1,5µM Zink, hingegen, wurde sogar eine geringe Proliferationssteigerung gemessen.

Inkubationen mit sehr hohen Konzentrationen von 300µM bzw. 750µM ZnSO₄ zeigen im Laufe einer 96-Stunden-Inkubation dramatische Veränderungen der Zellstruktur. Eine Zinkkonzentration von 750µM verursacht bereits nach 30 Minuten Veränderungen der Zellform und eine Zerstörung des Zytoskeletts, welche im Laufe von weiteren zwei Stunden Inkubation eine Zellschrumpfung und den Austritt von Zellinhalt bewirken [RUDOLF et al., 2003].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass CaCo2-Zellen je nach Differenzierungsstadium in unterschiedlicher Weise auf extrazelluläre Zinkkonzentrationen reagieren. Kurzzeitinkubationen mit ZnCl₂ bewirken in undifferenzierten CaCo2-Zellen eine signifikante Signalverstärkung der Proteinkinasen ERK1/2 ab einer Konzentration von 150µM, wohingegen differenzierte Zellen erst ab 400µM – bei Langzeitinkubation bereits ab 200µM – deutliche Signale zeigen. Die Loslösung einzelner Zellen vom Zellverband, welche mit einer Disregulierung der Membranproteine β-Catenin, E-Cadherin und anderen einhergeht, kann in beiden Fällen jedoch erst bei höheren Konzentrationen beobachtet werden.

Aus den vorliegenden Analysen geht hervor, dass konstant erhöhte extrazelluläre Konzentrationen von über 100µM Zink toxische Effekte auf undifferenzierte CaCo2 Zellen haben. Im Laufe der Differenzierung exprimieren CaCo2-Zellen Merkmale von oberen Dünndarmzellen und sind in der Lage, Zinkkonzentrationen bis etwa 200µM Zink ohne negative Effekte auf die Zellviabilität zu tolerieren.

Physiologische Konzentrationen liegen im Bereich um 50µM Zink. Durch Zinksupplemente werden im Dünndarm allerdings oft höhere Zinkkonzentrationen erreicht.

Höhere extrazelluläre Zinkkonzentrationen bedingen einen vermehrten Import von Zink bzw. eine intrazelluläre Erhöhung der Konzentration an freien Zinkionen. Durch diverse Transport- und Speichermöglichkeiten wird im Normalfall eine Zinkhomöostase aufrechterhalten.

Bei einigen Krankheiten, allerdings, ist das intrazelluläre Zinkgleichgewicht gestört; bei vielen Krebsarten, z.B. Prostata-, Brustkrebs und Leukämie, kann eine verstärkte Aktivierung des ERK-Signalweges beobachtet werden, welche größtenteils durch Mutationen von Ras oder Raf bedingt sind [McCUBREY et al., 2006].

Die Aktivierung des MAPK-Signalwegs durch Zink kann sowohl eine Zellproliferation als auch eine Wachstumshemmung bzw. den programmierten Zelltod von kolorektalen Epithelzellen bewirken. Die unterschiedliche Auswirkung der MAPK-Aktivierung auf Zellproliferation bzw. Wachstumshemmung ist abhängig von der Signalintensität und der Zinkkonzentration im Serum.

6. Zusammenfassung

Zink ist ein wichtiger Bestandteil der menschlichen Ernährung und erfüllt auf Protein- ebenso wie auf DNA-Ebene viele biologische Funktionen. Es hat weiters die Eigenschaft eines Signalmoleküls und kann über Enzymkaskaden Signale vom Extrazellulärraum bis in den Zellkern vermitteln.

Die hier durchgeführten Untersuchungen geben Aufschluss über seine Rolle als Aktivator des Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) Signaltransduktionsweges, über den Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung, Zellwachstum, sowie Zelltod gesteuert werden. Auf diese Weise können Zellen auf äußere Reize, in diesem Fall die extrazelluläre Zinkkonzentration, reagieren. Anhand der Dickdarmkrebszelllinie CaCo2 konnte gezeigt werden, dass die Höhe der extrazellulären Zinkkonzentration und die Dauer der Exposition mit Zink einen Einfluss auf die Zelladhäsion hat. Physiologische Zinkkonzentrationen im Bereich bis etwa 100µM ZnCl₂ haben auch bei Langzeitinkubationen keinerlei toxische Auswirkungen auf die Zellen, während höhere Zinkkonzentrationen Mechanismen in Gang setzen, welche eine Veränderung der Zellmorphologie verursachen und im weiteren Verlauf den apoptotischen und/oder nekrotischen Zelltod auslösen. Die Zinkinkubationen wurden an zwei Differenzierungsstadien der CaCo2-Zellen getestet. Dabei ergaben sich Unterschiede, welche durch die höhere Zinktoleranz von differenzierten gegenüber undifferenzierten CaCo2-Zellen bedingt waren. Die Auswirkungen von Zink auf das Zellgeschehen wurden durch den Grad der Stimulierung der Signalkinasen pERK1, pERK2 sowie p-p38 mittels der Western Blot Methode bestimmt. Anhand von parallel dazu verlaufenden Adhäsionsversuchen mit Kristallviolett konnte demonstriert werden, dass es mit zunehmender Konzentration an Zink zu einer Loslösung der Zellen vom Zellverband und auch zu einer verminderten Adhäsion an der Unterlage kommt. Die Untersuchungen bestätigen die Aktivierung des MAPK-Signalweges durch Zink. Dies ist von physiologischer Relevanz, da Zink in niedrigen Dosierungen essentiell für diverse Funktionen im Körper ist, aber auf der anderen Seite in überhöhter Konzentration am negativen Verlauf von vielen Krankheiten, wie Ischämie, Myokardinfarkt und bei der Entstehung von Neoplasien beteiligt ist.

7. Abstract

Zinc is an essential component of nutrition and fulfils various biological functions on the protein and DNA-level. Besides it acts as a signal molecule and is capable of mediating signals from the extracellular space to the nucleus via enzyme cascades.

The analyses shown here give information about its role as activator of the Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) pathway, which regulates processes like proliferation, differentiation, cellular growth and cell death. By this means, cells are susceptible to external stimuli, e.g. the extracellular zinc concentration. In the context of this work CaCo2 cells, representatives of a cancerous colon cell line, were applied in order to show that the amount of extracellular zinc and the period of incubation have an effect on cell viability. Low zinc concentrations in the range of 100µM ZnCl₂ as well as long-time incubations with zinc do not have toxic effects on the cells, while high zinc concentrations produce effects that induce a change in cell morphology and lead to the initiation of the apoptotic and/or necrotic cell death.

The analyses were conducted using CaCo2 cells in two differentiation states. Results showed differences due to the fact that differentiated cells have a higher zinc tolerance than undifferentiated cells. The effects of zinc on cellular events were demonstrated by the Western Blot method, in particular by the stimulation level of the signal kinases pERK1, pERK2 and p-p38.

Additional experiments with Crystal violet showed a dissociation of single cells from the cell monolayer and subsequently a decreased adhesion with increasing concentration of zinc in the cell medium.

The analyses demonstrate the activation of the MAPK pathway through zinc. These findings have a high physiologic relevance, since zinc in low doses is essential for diverse bodily functions but, on the other hand, it is established that excessive concentrations of zinc contribute to the floridity of various diseases like ischemia, myocardial infarction as well as to the formation of neoplasias.

8. Literaturverzeichnis

ANDRE F, JANSSENS B, BRUYNEEL E, VAN ROY F, GESPACH C, MEREEL M, BRACKE M. Alpha-catenin is required for IGF-I-induced cellular migration but not invasion in human colonic cancer cells. *Oncogene* 2004; 23(6): 1177-86.

AVRUCH J, KHOKHLATCHEV A, KYRIAKIS JM, LUO Z, TZIVION G, VAVVAS D, ZHANG XF. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* 2001; 56: 127-55.

AZRIEL-TAMIR H, SHARIR H, SCHWARTZ B, HERSHFINKEL M. Extracellular zinc triggers ERK-dependent activation of Na⁺/H⁺ exchange in colonocytes mediated by the zinc-sensing receptor. *J Biol Chem* 2004; 279(50): 51804-16.

BERG JM, SHI Y. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science* 1996; 271(5252): 1081-5.

BOBO JA. Characterization of zinc transporters in CaCo-2 cells. Diplomarbeit, 2004

BROWN L, BENCHIMOL S. The involvement of MAPK signaling pathways in determining the cellular response to p53 activation: cell cycle arrest or apoptosis. *J Biol Chem* 2006; 281(7): 3832-40.

CARIO E, JUNG S, HARDER D'HEUREUSE J, SCHULTE C, STURM A, WIEDENMANN B, GOEBELL H, DIGNASS AU. Effects of exogenous zinc supplementation on intestinal epithelial repair in vitro. *Eur J Clin Invest* 2000; 30(5): 419-28.

CHEN L, NECELA BM, SU W, YANAGISAWA M, ANASTASIADIS PZ, FIELDS AP, THOMPSON EA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes epithelial to mesenchymal transformation by Rho GTPase-dependent activation of ERK1/2. *J Biol Chem* 2006; 281(34): 24575-87.

COMES F, MATRONE A, LASTELLA P, NICO B, SUSCA FC, BAGNULO R, INGRAVALLO G, MODICA S, LO SASSO G, MOSCHETTA A, GUANTI G, SIMONE C. A novel cell type-specific role of p38alpha in the control of autophagy and cell death in colorectal cancer cells. *Cell Death Differ* 2007; 14(4): 693-702.

COUSINS RJ, MCMAHON RJ. Integrative aspects of zinc transporters. *J Nutr* 2000; 130(5S Suppl): 1384S-7S.

DAVIS SR, MCMAHON RJ, COUSINS RJ. Metallothionein knockout and transgenic mice exhibit altered intestinal processing of zinc with uniform zinc-dependent zinc transporter-1 expression. *J Nutr* 1998; 128(5): 825-31.

DUBI N, GHEBER L, FISHMAN D, SEKLER I, HERSHFINKEL M. Extracellular zinc and zinc-citrate, acting through a putative zinc-sensing receptor, regulate growth and survival of prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 2008; 29(9): 1692-700.

FINAMORE A, MASSIMI M, CONTI DEVIRGILIIS L, MENGHERI E. Zinc deficiency induces membrane barrier damage and increases neutrophil transmigration in Caco-2 cells. *J Nutr* 2008; 138(9): 1664-70.

FOUQUET S, LUGO-MARTINEZ VH, FAUSSAT AM, RENAUD F, CARDOT P, CHAMBAZ J, PINÇON-RAYMOND M, THENET S. Early loss of E-cadherin from cell-cell contacts is involved in the onset of Anoikis in enterocytes. *J Biol Chem* 2004; 279(41): 43061-9.

FRISCH SM, FRANCIS H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994; 124(4): 619-26.

FUJISAWA T, NAKAJIMA A, FUJISAWA N, TAKAHASHI H, IKEDA I, TOMIMOTO A, YONEMITSU K, NAKAJIMA N, KUDO C, WADA K, KUBOTA N, TERAUCHI Y, KADOWAKI T, NAKAGAMA H, BLUMBERG RS. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) suppresses colonic epithelial cell turnover and colon carcinogenesis through inhibition of the beta-catenin/T cell factor (TCF) pathway. *J Pharmacol Sci* 2008; 106(4): 627-38.

GROSSMANN J, WALTHER K, ARTINGER M, KIESSLING S, SCHÖLMERICH J. Apoptotic signaling during initiation of detachment-induced apoptosis ("anoikis") of primary human intestinal epithelial cells. *Cell Growth Differ* 2001; 12(3): 147-55.

HARNOIS C, DEMERS MJ, BOUCHARD V, VALLÉE K, GAGNÉ D, FUJITA N, TSURUO T, VÉZINA A, BEAULIEU JF, CÔTÉ A, VACHON PH. Human intestinal epithelial crypt cell survival and death: Complex modulations of Bcl-2 homologs by Fak, PI3-K/Akt-1, MEK/Erk, and p38 signaling pathways. *J Cell Physiol* 2004; 198(2): 209-22.

HERSHFINKEL M, MORAN A, GROSSMAN N, SEKLER I. A zinc-sensing receptor triggers the release of intracellular Ca²⁺ and regulates ion transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(20): 11749-54.

HERSHFINKEL M, SILVERMAN WF, SEKLER I. The zinc sensing receptor, a link between zinc and cell signaling. *Mol Med* 2007; 13(7-8): 331-6.

HINCK L, NELSON WJ, PAPKOFF J. Wnt-1 modulates cell-cell adhesion in mammalian cells by stabilizing beta-catenin binding to the cell adhesion protein cadherin. *J Cell Biol* 1994; 124(5): 729-41.

HOUSLAY MD, KOLCH W. Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. *Mol Pharmacol* 2000; 58(4): 659-68.

KARANDIKAR M, XU S, COBB MH. MEKK1 binds raf-1 and the ERK2 cascade components. *J Biol Chem* 2000; 275(51): 40120-7.

KIM H, KOKKOTOU E, NA X, RHEE SH, MOYER MP, POTHOUKAKIS C, LAMONT JT. Clostridium difficile toxin A-induced colonocyte apoptosis involves p53-dependent p21(WAF1/CIP1) induction via p38 mitogen-activated protein kinase. *Gastroenterology* 2005; 129(6): 1875-88.

KINDERMANN B, DÖRING F, FUCHS D, PFAFFL MW, DANIEL H. Effects of increased cellular zinc levels on gene and protein expression in HT-29 cells. *Biomaterials* 2005; 18(3): 243-53.

KOHDA Y, MATSUNAGA Y, SHIOTA R, SATOH T, KISHI Y, KAWAI Y, GEMBA M. Involvement of Raf-1/MEK/ERK1/2 signaling pathway in zinc-induced injury in rat renal cortical slices. *J Toxicol Sci* 2006; 31(3): 207-17.

KOLCH W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000; 351 Pt 2: 289-305.

LANGMADE SJ, RAVINDRA R, DANIELS PJ, ANDREWS GK. The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J Biol Chem* 2000; 275(44): 34803-9.

LASSUS P, ROUX P, ZUGASTI O, PHILIPS A, FORT P, HIBNER U. Extinction of rac1 and Cdc42Hs signalling defines a novel p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 2000; 19(20): 2377-85.

LAVOIE JN, L'ALLEMAIN G, BRUNET A, MÜLLER R, POUYSSÉGUR J. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 1996; 271(34): 20608-16.

LAWLER S, FLEMING Y, GOEDERT M, COHEN P. Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. *Curr Biol* 1998; 8(25): 1387-90.

LEFLOCH R, POUYSSÉGUR J, LENORMAND P. Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels. *Mol Cell Biol* 2008; 28(1): 511-27.

MEERARANI P, REITERER G, TOBOREK M, HENNIG B. Zinc modulates PPARgamma signaling and activation of porcine endothelial cells. *J Nutr* 2003; 133(10): 3058-64.

MIYASHITA T, REED JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; 80(2): 293-9.

MOLTEDO O, VERDE C, CAPASSO A, PARISI E, REMONDELLI P, BONATTI S, ALVAREZ-HERNANDEZ X, GLASS J, ALVINO CG, LEONE A. Zinc transport and metallothionein secretion in the intestinal human cell line Caco-2. *J Biol Chem* 2000; 275(41): 31819-25.

MURGIA C, VESPIGNANI I, RAMI R, PEROZZI G. The Znt4 mutation in lethal milk mice affects intestinal zinc homeostasis through the expression of other Zn transporters. *Genes Nutr* 2006; 1(1): 61-70.

NING L, KUNNIMALAIYAAN M, CHEN H. Regulation of cell-cell contact molecules and the metastatic phenotype of medullary thyroid carcinoma by the Raf-1/MEK/ERK pathway. *Surgery* 2008; 144(6): 920-4; discussion 924-5.

ODA T, KANAI Y, OYAMA T, YOSHIURA K, SHIMOYAMA Y, BIRCHMEIER W, SUGIMURA T, HIROHASHI S. E-cadherin gene mutations in human gastric carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(5): 1858-62.

OH SY, PARK KS, KIM JA, CHOI KY. Differential modulation of zinc-stimulated p21(Cip/WAF1) and cyclin D1 induction by inhibition of PI3 kinase in HT-29 colorectal cancer cells. *Exp Mol Med* 2002; 34(1): 27-31.

OHANA E, HOCH E, KEISAR C, KAMBE T, YIFRACH O, HERSHFINKEL M, SEKLER I. Identification of the Zn²⁺ binding site and mode of operation of a mammalian Zn²⁺ transporter. *J Biol Chem* 2009.

OYAMA T, KANAI Y, OCHIAI A, AKIMOTO S, ODA T, YANAGIHARA K, NAGAFUCHI A, TSUKITA S, SHIBAMOTO S, ITO F, et al. A truncated beta-catenin disrupts the interaction between E-cadherin and alpha-catenin: a cause of loss of intercellular adhesiveness in human cancer cell lines. *Cancer Res* 1994; 54(23): 6282-7.

PARK KS, AHN Y, KIM JA, YUN MS, SEONG BL, CHOI KY. Extracellular zinc stimulates ERK-dependent activation of p21(Cip/WAF1) and inhibits proliferation of colorectal cancer cells. *Br J Pharmacol* 2002; 137(5): 597-607.

PARK KS, JEON SH, OH JW, CHOI KY. p21Cip/WAF1 activation is an important factor for the ERK pathway dependent anti-proliferation of colorectal cancer cells. *Exp Mol Med* 2004; 36(6): 557-62.

PARK KS, LEE NG, LEE KH, SEO JT, CHOI KY. The ERK pathway involves positive and negative regulations of HT-29 colorectal cancer cell growth by extracellular zinc. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285(6): G1181-8.

PEARSON G, ROBINSON F, BEERS GIBSON T, XU BE, KARANDIKAR M, BERMAN K, COBB MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001; 22(2): 153-83.

PORRAS A, ZULUAGA S, BLACK E, VALLADARES A, ALVAREZ AM, AMBROSINO C, BENITO M, NEBREDA AR. P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. *Mol Biol Cell* 2004; 15(2): 922-33.

RE F, ZANETTI A, SIRONI M, POLENTARUTTI N, LANFRANCONE L, DEJANA E, COLOTTA F. Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells. *J Cell Biol* 1994; 127(2): 537-46.

REYNOLDS AB, DANIEL J, MCCREA PD, WHEELLOCK MJ, WU J, ZHANG Z. Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol* 1994; 14(12): 8333-42.

RUDOLF E, RUDOLF K, RADOCHA J, PEYCHL J, CERVINKA M. The role of intracellular zinc in modulation of life and death of Hep-2 cells. *Biometals* 2003; 16(2): 295-309.

SEGER R, AHN NG, BOULTON TG, YANCOPOULOS GD, PANAYOTATOS N, RADZIEJEWSKA E, ERICSSON L, BRATLIEN RL, COBB MH, KREBS EG. Microtubule-associated protein 2 kinases, ERK1 and ERK2, undergo autophosphorylation on both tyrosine and threonine residues: implications for their mechanism of activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(14): 6142-6.

SEGER R, KREBS EG. The MAPK signaling cascade. *Faseb J* 1995; 9(9): 726-35.

SEGER R, SEGER D, RESZKA AA, MUNAR ES, ELDAR-FINKELMAN H, DOBROWOLSKA G, JENSEN AM, CAMPBELL JS, FISCHER EH, KREBS EG. Overexpression of mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) and its mutants in NIH 3T3 cells. Evidence that MAPKK involvement in cellular proliferation is regulated by phosphorylation of serine residues in its kinase subdomains VII and VIII. *J Biol Chem* 1994; 269(41): 25699-709.

SEO SR, CHONG SA, LEE SI, SUNG JY, AHN YS, CHUNG KC, SEO JT. Zn²⁺-induced ERK activation mediated by reactive oxygen species causes cell death in differentiated PC12 cells. *J Neurochem* 2001; 78(3): 600-10.

SHARIR H, HERSHFINKEL M. The extracellular zinc-sensing receptor mediates intercellular communication by inducing ATP release. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 332(3): 845-52.

SHIRAKABE K, GOTOH Y, NISHIDA E. A mitogen-activated protein (MAP) kinase activating factor in mammalian mitogen-stimulated cells is homologous to *Xenopus* M phase MAP kinase activator. *J Biol Chem* 1992; 267(23): 16685-90.

TAO YS, EDWARDS RA, TUBB B, WANG S, BRYAN J, MCCREA PD. beta-Catenin associates with the actin-bundling protein fascin in a noncadherin complex. *J Cell Biol* 1996; 134(5): 1271-81.

TAYLOR CG, BETTGER WJ, BRAY TM. Effect of dietary zinc or copper deficiency on the primary free radical defense system in rats. *J Nutr* 1988; 118(5): 613-21.

TOURNIER C, HESS P, YANG DD, XU J, TURNER TK, NIMNUAL A, BARSAGI D, JONES SN, FLAVELL RA, DAVIS RJ. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 2000; 288(5467): 870-4.

TREMBLAY PL, AUGER FA, HUOT J. Regulation of transendothelial migration of colon cancer cells by E-selectin-mediated activation of p38 and ERK MAP kinases. *Oncogene* 2006; 25(50): 6563-73.

VALENTINE RA, JACKSON KA, CHRISTIE GR, MATHERS JC, TAYLOR PM, FORD D. ZnT5 variant B is a bidirectional zinc transporter and mediates zinc uptake in human intestinal Caco-2 cells. *J Biol Chem* 2007; 282(19): 14389-93.

WADA T, PENNINGER JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 2004; 23(16): 2838-49.

WANG K, ZHOU B, KUO YM, ZEMANSKY J, GITSCHIER J. A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. *Am J Hum Genet* 2002; 71(1): 66-73.

WAPNIR RA. Zinc deficiency, malnutrition and the gastrointestinal tract. *J Nutr* 2000; 130(5S Suppl): 1388S-92S.

WESSELBORG S, BAUER MK, VOGT M, SCHMITZ ML, SCHULZE-OSTHOFF K. Activation of transcription factor NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase is mediated by distinct and separate stress effector pathways. *J Biol Chem* 1997; 272(19): 12422-9.

WIJNHOFEN BP, DINIENS WN, PIGNATELLI M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg* 2000; 87(8): 992-1005.

WU W, GRAVES LM, GILL GN, PARSONS SJ, SAMET JM. Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on tyrosine 845 is required for zinc-induced Ras activation. *J Biol Chem* 2002; 277(27): 24252-7.

ZANGGER K, ARMITAGE IM. Dynamics of interdomain and intermolecular interactions in mammalian metallothioneins. *J Inorg Biochem* 2002; 88(2): 135-43.

ZÖDL B, ZEINER M, SARGAZI M, ROBERTS NB, MARKTL W, STEFFAN I, EKMEKCIOGLU C. Toxic and biochemical effects of zinc in Caco-2 cells. *J Inorg Biochem* 2003; 97(4): 324-30.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

geboren 14.07.1986 in Wien, österr. Staatsbürgerschaft

Schulbildung:

1992-1996: Volksschule Linzerstraße 419, 1140 Wien

1996-2004: BGRG Fichtnergasse, 1130 Wien, neusprachlicher Zweig, Matura am 7.6.2004

2004-2008: Universität Wien, Naturwissenschaftliche Fakultät

Studienrichtung Ernährungswissenschaften: 1. Studienabschnitt in Mindestzeit abgeschlossen, 1. Diplomprüfung am 02.06.2006, Diplomarbeit an der MUW

Besondere Fähigkeiten und Kenntnisse:

Gute Kenntnisse in Englisch, Französisch, Italienisch, Kroatisch, Informatik (Word, Excel, Powerpoint), ausgeprägtes naturwissenschaftliches Interesse

Bisherige Ferialpraxis:

Juli 2002 & 2004 Fa. DOMUS Facility Management, Wien

Juli und August 2006 Fa. Eurest - Piccorante, Wien

September 2007 MA38 Lebensmitteluntersuchungsanstalt Wien

Seit 6.4.2009 im AKH als wissenschaftliche Mitarbeiterin tätig

