

# „Die Rolle von Zink in der Signaltransduktion von T-Zellen“

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen University  
zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte  
Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin  
Andrea Hönscheid

aus  
Düren

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Lothar Rink  
Professor Alan Slusarenko, Ph.D.

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2010

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

---

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
	1.1 Immunsystem des Menschen	1
	1.2 Zink als Spurenelement	2
	1.2.1 Zink-Stoffwechsel des Menschen	2
	1.2.2 Physiologische Zink Funktionen	2
	1.3 Einfluss von Zink auf das Immunsystem	3
	1.4 T-Zellen	5
	1.4.1 T-Zellaktivierung	5
	1.5 Src-Kinasen	6
	1.5.1 Zink-Einfluss auf die Src-Kinase Funktion	7
	1.6 Mitogen Aktivierte Protein Kinasen (MAPK)	8
	1.6.1 Zink-Einfluss auf die MAPK-Funktion	10
	1.7 Proteintyrosinphosphatasen (PTP) und MAPK Phosphatasen (MKP)	11
	1.7.1 Zink-Einfluss auf die PTP/MKP-Funktion	11
	1.8 Protein Kinase A (PKA)	12
	1.8.1 Zink-Einfluss auf die PKA-Funktionen	12
	1.9 NFAT-Signalweg in T-Zellen	13
	1.9.1 Zink-Einfluss auf die NFAT-Aktivierung	14
	1.10 NF $\kappa$ B-Signalweg in T-Zellen	14
	1.10.1 Zink-Einfluss auf die NF $\kappa$ B-Aktivierung	14
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
	3.1 Material	17
	3.1.1 Geräte	17
	3.1.2 Laborbedarf	18
	3.1.3 Zellkulturmedien und Medienzusätze	19
	3.1.4 Immunologische Reagenzien	19
	3.1.5 Sonstige Reagenzien	20
	3.1.6 Kommerziell erhältliche Kits	22
	3.1.7 Zelllinien	23
	3.2 Methoden	24

3.2.1 Isolierung von Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)	24
3.2.2 Zellzahlbestimmung am Casy	25
3.2.3 Anreicherung humaner T-Zellen	25
3.2.4 Herstellung von Zelllysaten für die Western Blot Analyse	26
3.2.5 <i>In vitro</i> -Dephosphorylierung	26
3.2.6 RNA-Isolierung	27
3.2.6.1 Bestimmung der RNA-Konzentration	28
3.2.7 Reverse Transkription	29
3.2.8 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	29
3.2.8.1 Semiquantitative RT-PCR	30
3.2.8.2 Agarose-Gelelektrophorese	30
3.2.8.3 Real time quantitative SYBR Green PCR	31
3.2.9 Identifizierung und Charakterisierung von DNA-Bindeproteinen	33
3.2.9.1 Präparation von Zellkernextrakten	33
3.2.9.2 Radioaktive Markierung der DNA-Oligonukleotide	35
3.2.9.3 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)	36
3.2.9.4 Nachweis der DNA-Bindeproteine mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
3.2.10 [ <sup>3</sup> H]-Thymidin-Proliferationsassay	38
3.2.11 Messung der zellulären cAMP-Konzentration	39
3.2.12 Messung der zellulären cGMP-Konzentration	41
3.2.13 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	42
3.2.14 Proteinbestimmung	43
3.2.15 Diskontinuierliche Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
3.2.16 Western Blot	45
3.2.17 FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)	47
3.2.17.1 Messung von Oberflächenmarkern im FACS	48
3.2.17.2 Toxizitätstest mit Propidiumiodid	49
3.2.18 Messung von intrazellulärem Zink und Calcium	50
3.2.19 FluoZin-3A Messung	52
3.2.20 Statistische Auswertung	53
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>54</b>
4.1 Signaltransduktion nach T-Zellrezeptor (TCR)-Stimulation	54

4.1.1	Stimulationsstudie der MAPK p38 und ERK1/2 und der Src Kinase Lck	54
4.1.2	Einfluss des intrazellulären Zinks auf die Signaltransduktion	55
4.2	Signaltransduktion nach Stimulation mit Zink/Pyrithion	57
4.2.1	Charakterisierung des beobachteten Zink-Effektes	57
4.2.1.1	Einfluss von Zink auf die Phosphorylierung der MAPK	61
4.2.1.2	Einfluss von Zink auf die TCR Signaltransduktion	63
4.2.1.3	Einfluss von Zink auf die alternative Aktivierung der p38	65
4.2.1.4	Einfluss von Zink auf die CREB-Phosphorylierung	69
4.2.1.5	Einfluss von Zink auf die p38-abhängige Cytokinproduktion	69
4.2.1.6	Einfluss von Zink auf die cAMP und cGMP Akkumulation in T-Zellen	70
4.2.1.7	Einfluss von Zink auf die p38 und ERK1/2 Phosphorylierung in Abhängigkeit von der Kinase PKA	71
4.2.1.8	Einfluss von Zink auf die Proliferation von Jurkat Zellen	75
4.2.1.9	Einfluss von Zink auf den PKA Signalweg	76
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>97</b>
<b>Anhang 1: verwendete Primer</b>		<b>99</b>
<b>Anhang 2: Toxizitätstests</b>		<b>100</b>
<b>Lebenslauf</b>		<b>102</b>
<b>Veröffentlichungen</b>		<b>103</b>
<b>Danksagung</b>		<b>104</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Immunsystem des Menschen

Das Immunsystem des Menschen setzt sich aus verschiedenen Geweben, Zellen und Proteinen zusammen, welche für die Verteidigung des Körpers gegen Infektionen unterschiedliche Funktionen übernehmen. Man unterscheidet eine angeborene, unspezifische und eine erworbene, spezifische Immunantwort. Beide Systeme lassen sich in lösliche und zelluläre Komponenten unterscheiden, wobei die Zellen im Knochenmark aus verschiedenen Vorläufer-Zellen entstehen, dann im Knochenmark oder Thymus heranreifen und anschließend im Blut und im lymphatischen System zirkulieren (1).

Die angeborene Immunantwort nutzt phagozytierende Zellen (Neutrophile, dendritische Zellen und Makrophagen), und Zellen, die inflammatorische Mediatoren wie Histamin und Tumornekrosefaktor (TNF)  $\alpha$  freisetzen (Mastzellen usw.), sowie Natürliche Killer (NK)-Zellen. Dabei spielen z.B. die phagozytierenden Zellen eine wichtige Rolle, da sie über unspezifische Oberflächenrezeptoren allgemeine Charakteristika auf der Pathogenoberfläche erkennen und diese nach Aufnahme zerstören bzw. zu Antigen präsentierenden Zellen (APC) reifen. APCs präsentieren den T-Zellen des erworbenen Immunsystems über MHC-II- und MHC-I-Moleküle das prozessierte Antigen, so dass eine direkte Verbindung zur adaptiven Immunantwort besteht (2). Die löslichen Komponenten umfassen das Komplementsystem, Akute Phase Proteine und Cytokine, welche als freigesetzte Proteine das Verhalten anderer Zellen beeinflussen und autokrin, parakrin oder endokrin wirken (3). Die Zellen des angeborenen Immunsystems halten anfangs Infektionen in Schach und spielen bei der Auslösung und Steuerung der anschließenden adaptiven Immunantwort eine entscheidende Rolle. Das heißt, dass beide Systeme bei der Bekämpfung von Infektionen sowohl alleine als auch synergistisch wirken.

Die erworbene (adaptive) Immunantwort basiert auf der klonalen Selektion von Lymphocyten aus einem bestehenden Repertoire, welche eine Vielzahl antigenspezifischer Rezeptoren besitzen, so dass die meisten Antigene erkannt werden können. Bei den Zellen der erworbenen Immunantwort unterscheidet man B- und T-Lymphocyten. Nach Erkennung des jeweiligen Antigens vermehren sich die Lymphocyten und differenzieren zu Effektorzellen. Dabei differenzieren aktivierte B-Zellen zu so genannten Plasmazellen, welche antigenspezifische Antikörper produzieren (humorale Immunität), während die T-Zellen sowohl an zellvermittelten Reaktionen als auch an der Induktion

der humoralen Immunantwort beteiligt sind. T-Zellen werden entsprechend der Korezeptor-Expression in CD8- und CD4-T-Zellen unterschieden. T-Zellen, welche den Korezeptor CD8 an ihrer Oberfläche exprimieren, werden als cytotoxische T-Zellen bezeichnet. Sie erkennen Virus-infizierte Körperzellen und Tumorzellen und induzieren einen zellvermittelten Zelltod (4). CD4-T-Zellen exprimieren den Korezeptor CD4 und werden in TH1-Zellen, TH2-Zellen, TH17-Zellen und regulatorische T-Zellen unterteilt. TH1-Zellen aktivieren über einen direkten Zellkontakt hauptsächlich Makrophagen, welche dadurch intrazelluläre Pathogene wie Mycobakterien zerstören, und produzieren die Cytokine Interferon (IFN) $\gamma$ , Interleukin (IL)-2, IL-3 und TNF $\alpha$ . TH2-Zellen initiieren über die Aktivierung von B-Zellen die humorale Immunität und produzieren die Cytokine IL-4, IL-5 und IL-10 (5). Durch die Bildung von Gedächtniszellen wird nach einem weiteren Kontakt mit einem Antigen eine schnellere, stärkere und damit effektivere Immunantwort initiiert.

## 1.2 Zink als Spurenelement

### 1.2.1 Zink-Stoffwechsel des Menschen

Zink ist ein wichtiges Spurenelement (6, 7), von dem der menschliche Körper insgesamt 2–4 g enthält (8). 85% des Gesamtkörper-Zinkgehaltes ist in Muskeln und Knochen zu finden, 11% in Haut und Leber und 2–3 % in anderen Geweben wie Gehirn, Nieren, Herz und Blutplasma (9, 10). Dabei liegt die Plasmakonzentration zwischen 12 und 16  $\mu\text{M}$  Zink. Im Serum bindet Zink mit einer geringen Affinität bevorzugt an Albumin (60%), mit einer hohen Affinität an  $\alpha_2$ -Makroglobulin (30%) und an Transferrin (10%) (11). Da es im Körper im Gegensatz zum Eisen keinen Zink-Speicher gibt, ist ein Gleichgewicht zwischen Zink-Aufnahme und -Ausscheidung sehr wichtig (12). Die Zink-Verfügbarkeit ist unter anderem abhängig von der Nahrungsaufnahme und wird durch weitere Faktoren wie das Alter und den Gesundheitszustand beeinflusst (13).

Die Zinkabsorption erfolgt hauptsächlich im Dünndarm, wobei faserreiche, insbesondere phytatreiche Kost durch Chelatbildung zu einer verminderten Zinkaufnahme führt, während Glukose und einige Aminosäuren die Absorption erhöhen können (14). Die Ausscheidung findet zum Großteil nach Exkretion mit dem Pankreassekret über die Fäces sowie in geringen Mengen über den Urin und Schweiß statt (15).

### 1.2.2 Physiologische Zink-Funktionen

Zink übt seine biologischen Funktionen als zweiwertiges Kation aus und ist intrazellulär zum Großteil an verschiedene Proteine gebunden. Es ist notwendiger Bestandteil von über 300

Enzymen mit Vertretern in allen 6 Enzymklassen (12) und übernimmt unter anderem katalytische, kokatalytische oder strukturell stabilisierende Funktionen. Zink spielt als Komponente der Superoxid Dismutase eine indirekte Rolle hinsichtlich des Schutzes vor freien Radikalen und schützt durch Bindung der Thiole in Metallothionein diese vor Oxidation. Weiterhin ist es als Zink-Fingermotiv wichtiger Bestandteil vieler Replikations- und Transkriptionsfaktoren (13, 16). Häufige Bindungspartner in den verschiedenen Makromolekülen sind die Aminosäuren Histidin, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Cystein (12). 30–40% des zellulären Zinks liegen im Zellkern, rund 50% im Cytoplasma und den Organellen vor und der Rest ist Teil der Plasmamembran bzw. der Zellwand (17).

Die gesamte Konzentration des zellulären Zinks ist relativ hoch und wird auf einige 100  $\mu\text{M}$  geschätzt (18). Intrazellulär unterscheidet man dabei aber zwei Zinkpools: einen größeren, in dem Zink fest an Metalloproteine gebunden ist sowie einen kleineren Pool, in dem Zink sowohl frei als auch lose an Proteine gebunden vorliegt und als verfügbares Zink bezeichnet wird (19). Während das fest an Proteine gebundene Zink wie bereits erwähnt unter anderem strukturelle Funktionen übernimmt, spielt das verfügbare Zink, dessen Konzentration in peripheren mononukleären Zellen des Blutes im nM-Bereich liegt (20), eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion. Fluktuationen des kleineren Pools an freiem Zink, z.B. nach Rezeptorstimulation, tragen zu Interaktionen mit regulatorischen Protein-Bindungsstellen bei und damit zu einem intrazellulären Zinksignal, so dass das verfügbare Zink für die Signalweiterleitung in die Zelle von Bedeutung ist.

### **1.3 Einfluss von Zink auf das Immunsystem**

Jedes stark proliferierende Zellsystem wie das Immunsystem ist abhängig von einer ausreichenden Verfügbarkeit des Metallions Zink (8, 13, 21). Prasad et al. beschrieben bereits 1963 ein Zink-Defizienz-Syndrom bei Kindern und Jugendlichen aus Persien, was unter anderem durch Anämie, Hypogonadismus und Wachstumsretardationen charakterisiert ist (22). Die seltene, autosomal rezessiv vererbte Erkrankung *Acrodermatitis enteropathica*, welche hervorgerufen wird durch eine Mutation im intestinalen Zink-Transporter Zrt/Irt-like protein (Zip) 4 (23), ist ein Zink-spezifisches Mangelabsorptionssyndrom. Die Symptome äußern sich unter anderem in einer Thymus-Atrophie, was in einem Immundefekt mit häufigen bakteriellen, viralen und fungalen Infektionen mündet. Ohne Behandlung führt diese Krankheit in nur wenigen Jahren zum Tod, wobei eine pharmakologische Zink-Supplementation alle auftretenden Symptome rückgängig macht (24).

Unzureichende Zufuhr, verminderte Absorption, Arzneimittelinteraktionen sowie erhöhte Zinkverluste führen zu Zink-Mangelercheinungen (25, 26). Akute Zink-Intoxikationen sind selten; häufiger sind auftretende Stoffwechselstörungen durch hohe Zink-Konzentrationen aufgrund des daraus resultierenden Kupfer-Mangels (27). Durch Regulationsmechanismen auf zellulärer Ebene wird die Aufnahme zytotoxischer Mengen von exogenem Zink verhindert, während endogenes Zink in einzelnen Zellen wie Neuronen durchaus zytotoxisch wirken kann (28).

Die Zink-Konzentration im Plasma beträgt 12-16  $\mu\text{M}$  und ist immunologisch relevant. Als Kofaktor für verschiedene Enzyme hat Zink einen Einfluss auf generelle Zellfunktionen, so dass über Replikations- und Transkriptionsfaktoren die Zellproliferation und über eine Caspase 3-Inhibition die Apoptose beeinflusst werden (8, 13). Dadurch wird das Immunsystem als stark proliferierendes Zellsystem indirekt über die Regulation von Proliferation und Apoptose beeinflusst. Weiterhin hat Zink einen direkten Effekt auf Produktion, Reifung und Funktion von Leukocyten (29-34).

Zink beeinflusst sowohl den angeborenen als auch den erworbenen Teil des Immunsystems, wobei eine Zink-Defizienz aber auch die Erhöhung des Zink-Gehaltes von Bedeutung sind. Ein Zink-Mangel beeinflusst *in vivo* im angeborenen Immunsystem die Rekrutierung von Neutrophilen und vermindert deren Chemotaxis. Unter diesen Bedingungen sind ebenfalls die NK Zellaktivität und die Erzeugung des oxidativen Burst vermindert (13, 35). Hohe Zink-Konzentrationen sind in der Lage Monozyten direkt zu aktivieren und erhöhen die Produktion von Cytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF $\alpha$  (36, 37). Diese Effekte sind spezifisch für Zink und weder biologisch relevante, zweiwertige Kationen wie Calcium oder Magnesium noch strukturell äquivalente Kationen wie Nickel oder Cobalt weisen eine solche immunregulative Kapazität auf (38).

Als Teil des erworbenen Immunsystems werden B-Zellen in ihrer Entwicklung durch einen Zinkmangel weniger beeinflusst als T-Zellen, da die B-Zellproliferation weniger von Zink abhängig ist (39, 40). Die Antikörperproduktion und das immunologische Gedächtnis werden bei Zink-Defizienz allerdings inhibiert (41), wobei Studien gezeigt haben, dass die Antikörperproduktion als Antwort auf T-Zell-abhängige Antigene sensitiver auf Zink-Mangel reagiert als die Antikörperproduktion bei T-Zell-unabhängigen Reaktionen (42, 43).

Zink-Defizienz kann zu einer Thymus-Atrophie führen, was in einer beeinträchtigten T-Zellentwicklung und verminderter T-Zellzahl resultiert (32, 33). Die Thymus-Funktion ist unter anderem abhängig von dem Thymus-Hormon Thymulin, welches nur nach Bindung von Zink als Kofaktor aktiv ist (44, 45). Thymulin wird durch die Thymus-Epithelzellen sekretiert und induziert die Differenzierung unreifer T-Zellen im Thymus (46). Weiterhin wirkt es auf periphere T-Zellen, indem es unter anderem die Cytokinfreisetzung in peripheren, mononukleären Zellen aus dem Blut



(PBMC) moduliert (47). Über die Thymulin-Aktivierung hat Zink demnach einen Einfluss auf unreife und reife T-Zellen. Sogar einige Autoimmunerkrankungen mit T-Zellpathologie wie die rheumatoide Arthritis werden mit einem Zink-Mangel assoziiert (48), so dass eine Zink-Defizienz zu einer erhöhten Autoreaktivität führen kann. Konzentrationen ab 30  $\mu\text{M}$  Zink üben einen inhibitorischen Effekt auf T-Zellen aus (8), wobei Konzentrationen über 100  $\mu\text{M}$  Zink direkt die IL-1 $\beta$ -abhängige T-Zellstimulation inhibieren (49). Zink reguliert demnach konzentrationsabhängig die T-Zellfunktionen, wobei geringe Zink-Konzentrationen anormale Funktionen induzieren und hohe Konzentrationen die T-Zellfunktionen inhibieren.

## 1.4 T-Zellen

T-Zellen erkennen über den T-Zellrezeptor (TCR) spezifisch Peptide, welche in den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) eingelagert sind. Dabei handelt es sich um Antigenfragmente, die im Zellinnern prozessiert und dann an der Zelloberfläche über den MHC-Komplex den T-Zellen präsentiert werden. Je nach Herkunft der Peptide (Cytosol oder Phagolysosom) erfolgt eine Bindung der Antigenfragmente an MHC-I- oder MHC-II-Moleküle (50). Die antigenspezifische Bindung der T-Zellen über den TCR/MHC-Komplex erfolgt in Koordination mit dem jeweiligen Korezeptor. Dabei erkennen CD8-exprimierende T-Zellen nur Peptide, welche an ein MHC-I-Molekül gekoppelt sind und CD4-exprimierende T-Zellen MHC-II-gebundene Peptide (51). Diese Korezeptor-abhängige Peptiderkennung wird als MHC-Restriktion der T-Zellen bezeichnet (52).

### 1.4.1 T-Zellaktivierung

Die spontane Aktivierung der T-Zellen wird durch unterschiedliche Lokalisierung der beteiligten Oberflächenmoleküle, der intrazellulären Kinasen und der Adaptorproteine vermieden. Während die Korezeptoren und die intrazellulären Sarcoma (Src)-Kinasen im unstimulierten Zustand mit Lipid Rafts assoziieren, befinden sich TCR und verschiedene Proteintyrosinphosphatasen (PTP) wie CD45 außerhalb dieser Bereiche (53, 54). Durch die Nähe von PTPs zum TCR werden die Immunrezeptor-Tyrosin-basierenden-Aktivierungsmotiv (ITAM)-Sequenzen in einem dephosphorylierten Zustand gehalten (55). Die T-Zellen werden nach Erkennung und Bindung des Antigens aktiviert, wobei der TCR und weitere beteiligte Oberflächenmoleküle wie CD28 in den Lipid Rafts konzentriert werden. Auf diese Weise wird eine dynamische Struktur an der Seite des T-Zellkontaktes mit der APC gebildet, die als Immunologische Synapse bezeichnet wird (56).

Nach Stimulation der T-Zellen erfolgt die erste intrazelluläre Signalweiterleitung über die TCR- und Korezeptor-assoziierten Src-Kinasen Lck und Fyn, welche nach eigener Aktivierung die ITAM-Sequenzen des TCR-assoziierten Signalkomplexes CD3 phosphorylieren. Die phosphorylierten Tyrosinreste der cytoplasmatischen TCR-Ketten fungieren anschließend als Bindungsstellen für die ZAP70-Kinase, welche wiederum durch die Src-Kinase Lck phosphoryliert wird. Nach einer Autophosphorylierung werden verschiedene Proteine wie LAT und SLP-76 durch ZAP70 phosphoryliert, welche als Adaptoren die Bildung eines Signalosoms induzieren (57). Dieser Signalkomplex ist Ausgangspunkt für die Weiterleitung des Aktivierungssignales über verschiedene Signalkaskaden in den Zellkern.

Durch Aktivierung der Phospholipase C (PLC) $\gamma$ 1 werden aus Phosphatidylinositbisphosphat (PIP<sub>2</sub>) Diacylglycerin (DAG) und Inositrtrisphosphat (IP<sub>3</sub>) hergestellt. Diese aktivieren als Second Messenger die Proteinkinase C (PKC) und Ras und sorgen für eine Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung. Ca<sup>2+</sup>-abhängig wird dann der Transkriptionsfaktor Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) aktiviert. Gleichzeitig werden DAG-abhängig über kleine G-Proteine (Ras usw.) verschiedene MAP-Kinasen wie p38 und ERK1/2 aktiviert, über die wiederum Transkriptionsfaktoren wie c-Fos und c-Jun aktiviert werden. Über die PKC $\theta$  erfolgt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B (58).

## 1.5 Src-Kinasen

Die Kinasen der Src-Familie sind bei Wirbeltieren häufig an Signalübertragungen hinsichtlich Regulation der Zellteilung und der Differenzierung beteiligt. In T-Zellen sind sie unter anderem an der Regulation der Entwicklung, der Homöostase und der Aktivierung beteiligt (59). Sie phosphorylieren die Tyrosinreste in den ITAM-Sequenzen des TCR-Signalkomplexes und nachgeschaltete Kinasen wie die ZAP70 (60). Die Src-Kinase Familie besteht aus 9 Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen (Src, Yes, Fgr, Yrk, Fyn, Lyn, Hck, Lck und Brk) mit einem Molekulargewicht zwischen 50 und 60 kDa und mit unterschiedlicher Substratspezifität (61). T-Zellen exprimieren hauptsächlich Lck und Fyn-T, eine Zell-spezifische Isoform (59, 62, 63). Die Lck (56 kDa) ist über ihre Lipidmodifikationen am N-Terminus mit der Plasmamembran verbunden und an die Korezeptoren CD4 und CD8 assoziiert (64, 65).

Die Src-Kinasen werden in ihrer Aktivität unter anderem über Phosphorylierungen reguliert (66). Nach Stimulation der T-Zelle über den TCR und Assoziation des jeweiligen Korezeptors wird die Lck durch Autophosphorylierung aktiviert (59). Diese Aktivierung ist hauptsächlich von zwei

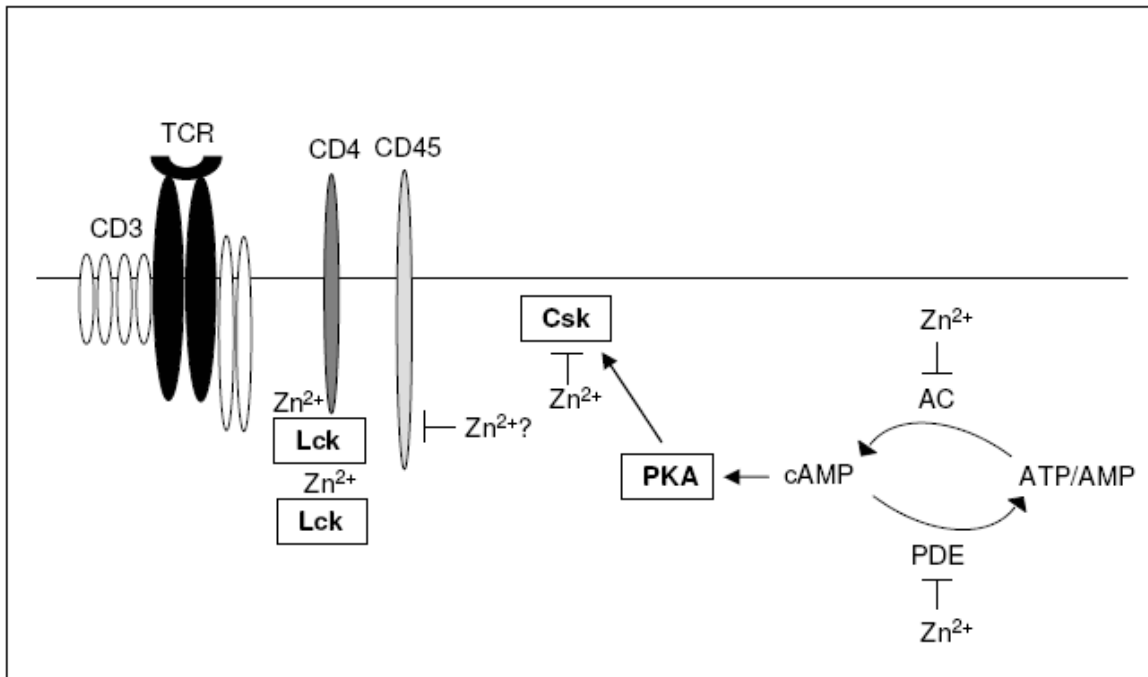
Tyrosinresten abhängig: der Tyrosinrest (Y) an Position 394 in der katalytischen Domäne muss im aktiven Enzym phosphoryliert vorliegen (aktivierendes Tyrosin), während das Tyrosin an Position 505 im C-Terminus dephosphoryliert vorliegt (inhibierendes Tyrosin) (67). Während die Position Y394 der Lck autophosphoryliert wird, erfolgt die Phosphorylierung an Position Y505 über die C-terminale Src Kinase (Csk) (66). Eine wichtige regulatorische Funktion bezüglich des Phosphorylierungsgrades besitzen PTPs wie CD45, SHP-1 und LYP (Abschnitt 1.7). Csk phosphoryliert die Position Y505 im C-Terminus, während die membranständige PTP CD45 diese Position als positiver Regulator der Src-Kinase-Aktivität dephosphoryliert. Die Position Y394 wird durch die cytoplasmatischen PTPs LYP (= PEP in Mäusen) und SHP-1 dephosphoryliert (55). Als weitere dephosphorylierende PTP für diese Position kommt ebenfalls die CD45 in Frage, welche in diesem Fall auch eine negativ regulierende Funktion auf die Kinaseaktivität ausübt (67). Vermutlich sind durch die Aktivität der PTPs und der Csk in einer Zelle Subpopulationen von Src-Kinasen in verschiedenen Aktivierungsformen simultan vorhanden (68).

#### *1.5.1 Zink-Einfluss auf die Src-Kinase Funktion*

Die Assoziation der Src-Kinase Lck an die beiden Corezeptoren CD4 und CD8 ist Zink-abhängig (69). Zusätzlich konnten Pernelle et al. zeigen, dass die Lck in einem Zell-freien System durch Zink direkt aktiviert wird. Dies ist vermutlich auf eine Zink-abhängige Homodimerisierung von Lck-Molekülen zurückzuführen, die innerhalb der Src-Familie für die Lck spezifisch ist und damit eine anschließende Autophosphorylierung erleichtert (70, 71).

Die Csk phosphoryliert das inaktivierende Tyrosin 505 der Lck, wodurch die TCR-Aktivierung und die daraus resultierende TCR-Signalweiterleitung inhibiert werden. Die Csk wird durch Zink auf unterschiedliche Weise beeinflusst (siehe Abbildung 1). Zum einen wird sie direkt durch reversible Bindung von Zink-Ionen gehemmt (72, 73) und zum anderen durch eine PKA-abhängige Phosphorylierung aktiviert (74). Dabei beeinflusst Zink über die Menge des second Messengers zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) die Aktivität der Protein Kinase A (PKA), indem es sowohl Adenylatzyklen (AC) als auch Phosphodiesterasen (PDE) (siehe Abschnitt 1.8) inhibiert. Die PKA phosphoryliert dann anschließend die Csk, so dass Zink auch über diesen Weg einen Einfluss auf die Aktivität der Lck hat.

Weiterhin ist ein indirekter Einfluss von Zink auf die Aktivität der Src-Kinase durch eine mögliche Inhibition verschiedener regulativ wirkender PTPs denkbar (siehe Abschnitt 1.7.1).



**Abb. 1: Schematische Darstellung des Zink-Einflusses auf die Src-Kinase Funktion.** Die Src-Kinase Lck assoziiert zink-abhängig an den Corezeptor CD4. Die zink-abhängige Homodimerisierung zweier Lck-Moleküle führt zu einer Autophosphorylierung und Aktivierung der Lck. Reguliert wird die Src-Kinase in ihrer Aktivität durch die membranständige Tyrosinphosphatase CD45 und die Kinase Csk. Eine Inhibition der CD45 durch Zink ist möglich. Die Csk wird sowohl direkt durch Zink gehemmt, als auch indirekt über den PKA-Signalweg beeinflusst. Dabei erfolgt sowohl eine Hemmung der AC als auch der PDE durch Zink (eigene Darstellung).

## 1.6 Mitogen Aktivierte Protein Kinasen (MAPKs)

Die MAP Kinase Kaskade stellt einen evolutionär konservierten Signalweg dar, der besonders für viele Prozesse der Immunantwort wichtig ist. MAPK Signalwege regulieren zelluläre Prozesse wie Proliferation, Apoptose, Differenzierung, Entwicklung und Genexpression. Generell besteht keine direkte Verbindung der MAPK Kaskaden mit Rezeptoren, so dass Effektormoleküle benötigt werden, welche das Signal des aktivierten Rezeptors übertragen. Die klassischen MAPK Signalwege bestehen aus einer Kaskade von drei aufeinander folgenden Phosphorylierungsereignissen, welche durch Proteine initiiert wird, die die MAPK Kinase Kinase (MAPKKK) aktivieren (siehe Abbildung 2). Anschließend werden die MAPK Kinase (MAPKK) und die MAPK phosphoryliert. Die MAPK werden durch eine duale Phosphorylierung des Tripeptid

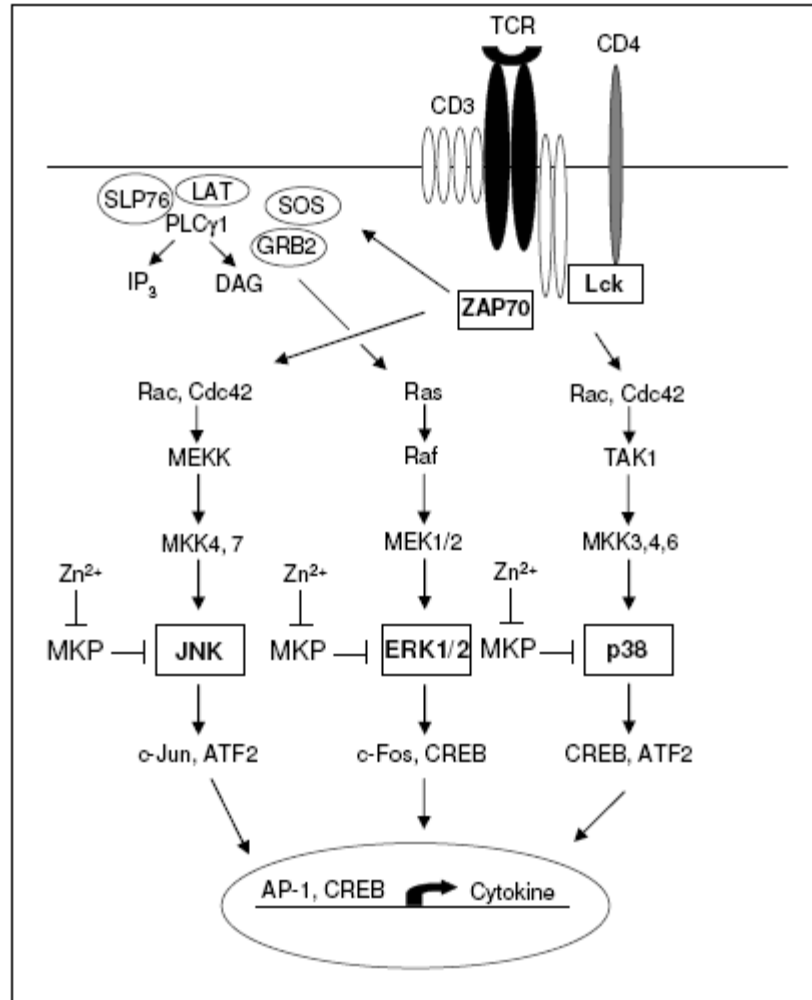
Motivs Thr-Xaa-Tyr aktiviert und phosphorylieren wiederum andere Substrate wie Protein-Kinasen oder Transkriptionsfaktoren (75).

In Säugetierzellen gibt es drei Gruppen von MAPK: die der extrazellulär Signal-regulierten Protein Kinase (ERK) und die Gruppe der Stress-aktivierten Protein Kinasen (SAPK) p38 und c-Jun NH<sub>2</sub>-terminale Kinase (JNK) (76-78):

Die Gruppe der ERK MAPK besteht aus den Isoformen ERK1-5 und ERK7/8, von denen die ERK1/2 (ERK1=p44 MAPK, ERK2=p42 MAPK) in T-Zellen hauptsächlich vorkommen. Die Aktivierung der ERK1/2 erfolgt über Rezeptortyrosinkinasen, welche über die GTPase Ras die Kaskade Raf-1, MEK1/2 und ERK1/2 aktivieren (75).

Die Isoformen p38 $\alpha$  und p38 $\delta$  werden am häufigsten in T-Zellen exprimiert. Eine Aktivierung wird unter anderem initiiert durch Stress, Cytokine und Wachstumsfaktoren. Erfolgt eine Stimulation über den TCR, wird durch die LAT-Rekrutierung die Familie der Rho-GTPasen Rac und Cdc42 aktiviert, welche dann über die Phosphorylierung der MAPKK MKK3/4/6 die p38 aktivieren (75). Zusätzlich ist in T-Zellen eine alternative Aktivierung der p38 bekannt. Über eine TCR-initiierte Aktivierung der ZAP70 wird die p38 an dem Tyrosin an Position 323 phosphoryliert. Anschließend erfolgt eine Autophosphorylierung des klassischen Tripeptid Motifs Thr-Xaa-Tyr (79).

Die Gruppe der c-Jun NH<sub>2</sub>-terminalen Kinase besteht aus drei Isoformen: JNK1, JNK2 und JNK3. JNK1 und 2 werden ubiquitär und die JNK3 primär im Gehirn exprimiert. Ihre Aktivierung wird ausgelöst durch Stress und Cytokine. Die Aktivierungskaskade läuft über die Rho-GTPasen Rac und Cdc42 zu den MAPKK MKK4/7 und endet in der Phosphorylierung der JNKs (80).



**Abb. 2: Schematische Darstellung des Zink-Einflusses auf die MAPK Funktion.** Nach Aktivierung über den TCR werden in Abhängigkeit von der jeweiligen Signalkaskade die entsprechenden MAPKKK durch die jeweils initiierten Proteine aktiviert. Anschließend werden die MAPKK und die MAPK phosphoryliert. Die MAPK phosphorylieren dann verschiedene Transkriptionsfaktoren, welche in den Zellkern gelangen und die Expression von Cytokinen beeinflussen. Die MAPK werden indirekt durch Zink beeinflusst, indem Zink die MKPs inhibiert (eigene Darstellung).

### 1.6.1 Zink-Einfluss auf die MAPK-Funktion

Zink beeinflusst die Signaltransduktion verschiedener Zellen durch Aktivierung und Inhibition unterschiedlicher, zellulärer Signalwege wie die MAPK Kaskaden (81). In C6 Gliomzellen der Ratte wird ERK1/2 durch niedrige Zink-Konzentrationen in Kombination mit dem Ionophor Pyrithion stimuliert, während höhere Zink-Konzentrationen keinen Effekt zeigen (82). In Leukocyten aktivieren Zink und Pyrithion die MAPK p38 (83). Bisher konnte noch kein direkter Zink-Einfluss auf die MAPK-Aktivität nachgewiesen werden, weshalb die MAPK vermutlich indirekt durch Zink beeinflusst werden. In humanen Monozyten wurde eine Inhibition der ERK und p38 Dephosphorylierung

gezeigt, was einen Effekt von Zink auf die MAPK Phosphatasen (MKPs) vermuten lässt (siehe Abschnitt 1.7.1) (83).

## 1.7 Proteintyrosinphosphatasen (PTPs) und MAPK Phosphatasen (MKPs)

An der Regulation der Signaltransduktion in T-Zellen sind neben den Src-Kinasen auch verschiedene, bereits erwähnte PTPs beteiligt. Dabei werden cytosolische PTPs wie SHP-1 von membranständigen Phosphatasen wie CD45 unterschieden (55). Für die Aktivität der PTPs ist ein Cystein-basierender katalytischer Mechanismus verantwortlich (84, 85).

Die membranständige PTP CD45 fungiert, wie bereits erwähnt, als positiver Regulator der Lck-Aktivität (86), obwohl aufgrund von geringen CD45-Vorkommen in Lipid rafts (~5-10%) auch eine negative Regulation durch Dephosphorylierung der Y394 Position in der Src-Kinase Lck diskutiert wird (55, 86).

MAPK Phosphatasen (MKPs) gehören zu den dual-spezifischen Phosphatasen und regulieren die Aktivität der MAPK durch Dephosphorylierung der Threonin- und Tyrosin-Reste (87). Da sie zur Familie der PTPs gehören, weisen sie ebenfalls einen Cystein-basierenden katalytischen Mechanismus auf.

### 1.7.1 Zink-Einfluss auf die PTP/MKP-Funktion

Verschiedene Studien bestätigen bei hohen Zink-Konzentrationen einen inhibierenden Einfluss auf T-Zellen (49, 88). Wellinghausen et al. zeigten dabei, dass die IL-1 Rezeptor-assoziierte Protein Kinase (IRAK) durch Zink spezifisch inhibiert wird und dadurch T-Zellfunktionen beeinflusst werden (49). Weitere Arbeiten machen deutlich, dass der inhibierende Einfluss auf die T-Zellaktivität durch zusätzliche Mechanismen beeinflusst wird. Samet und Kollegen (2003) konnten in Epithelzellen eine Zink-induzierte, Src-Kinase-abhängige Zunahme der Phosphorylierung des EGF-Rezeptors nachweisen, welche vermutlich auf einer Inhibition beteiligter Tyrosinphosphatasen beruht. Untermuert wurden diese Ergebnisse durch die Zink-Inhibition von Tyrosinphosphatasen in C6-Gliomzellen der Ratte (89). Andere Arbeitsgruppen beobachteten später unter anderem durch Verwendung von PTP-Inhibitoren wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dass eine erhöhte Lck-Phosphorylierung auch auf eine Inhibition der PTPs zurückgeführt werden kann (90). Da T-Zellen ohne CD45 nicht aktiviert werden können und ein CD45-Verlust zu einer erhöhten Y505-Phosphorylierung der Lck führt (91, 92), ist anzunehmen, dass die PTP CD45 und einige cytoplasmatische PTPs als wichtige Regulatoren der Lck-Aktivität inhibitorisch durch Zink beeinflusst werden können (siehe Abbildung 1). Da endogenes

Zink vermutlich mit dem Cystein-basierenden katalytischen Zentrum der PTPs assoziieren kann und die Inhibitionskonstanten im nM-Bereich liegen (93), ist es sehr wahrscheinlich, dass physiologische Konzentrationen verfügbaren Zinks in der Zelle PTPs inhibieren und damit in die Signaltransduktion eingreifen können (82).

Die MKPs, welche ebenfalls ein Cystein-basierendes katalytisches Zentrum aufweisen, werden durch Zink inhibiert. Samet und Kollegen zeigten in humanen Epithelzellen der Luftwege, dass der aktivierende Zink-Effekt auf die MAPK ERK1/2 und p38 auf eine Zink-vermittelte Inhibition zurückzuführen ist (94). Weiterhin inhibiert Zink in humanen T-Zellen die MEK und ERK-Dephosphorylierung nach Stimulation des IL-2 Rezeptors (95). Die Inhibition von MKPs reguliert demnach zellübergreifend die Aktivität der MAPK (siehe Abbildung 2).

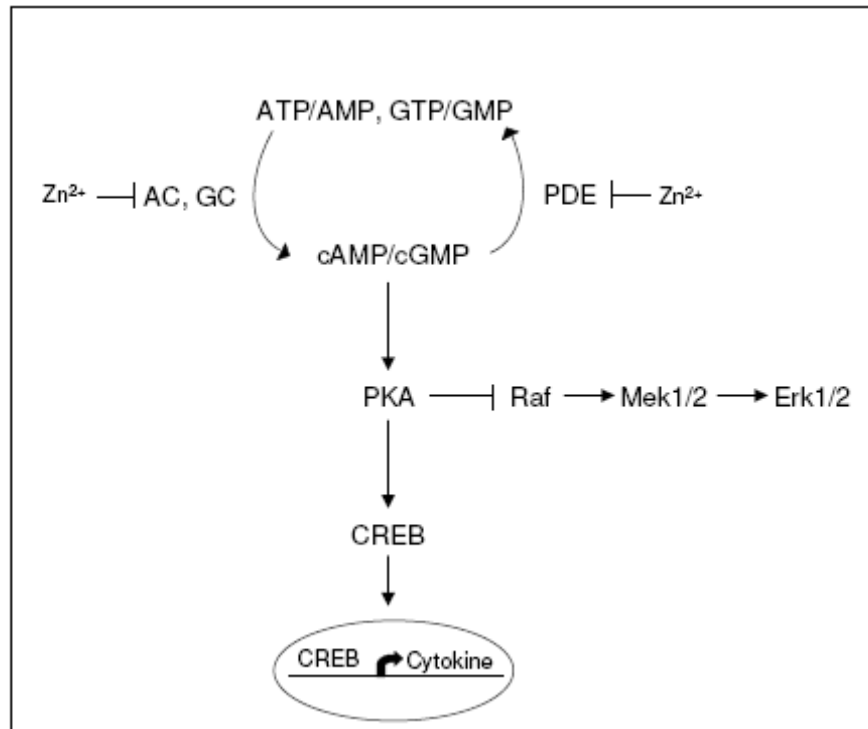
## **1.8 Protein Kinase A (PKA)**

In Lymphocyten stellt die Aktivierung der PKA durch die Akkumulation zyklischer Nukleotide wie cAMP einen Mechanismus dar, die TCR-Signaltransduktion zu regulieren. PKA ist eine Serin/Threonin Kinase, die als inaktive Form ein Tetramer aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten bildet. Nach Bindung der zyklischen Nukleotide, werden die beiden katalytischen Untereinheiten freigesetzt und werden enzymatisch aktiv. Die intrazelluläre Konzentration der zyklischen Nukleotide wird reguliert durch die synthetisierenden Enzyme Adenylatzyklase (AC) und Guanylatzyklase (GC) und durch die abbauenden Phosphodiesterasen (PDE). Durch einen intrazellulären Anstieg von cAMP oder cGMP wird die PKA aktiviert und phosphoryliert ihrerseits verschiedene andere Substrate wie z.B. Transkriptionsfaktoren (CREB) (96). In T-Zellen hat die PKA einen Einfluss auf die MAPK-Aktivität und inhibiert die Raf/MEK/ERK-Kaskade, wodurch die Proliferation der Zellen beeinträchtigt wird (97, 98).

### *1.8.1 Zink-Einfluss auf die PKA-Funktion*

Zink hat keinen direkten Einfluss auf die Aktivität der PKA. In Monozyten inhibiert Zink reversibel die PDEs 1, 3 und 4, von denen PDE 3 und 4 zwei wichtige Isoformen in T-Zellen repräsentieren (99, 100). Zink inhibiert die GTPase-Aktivität des stimulatorischen GTP-bindenden Proteins, welches die AC-Aktivität stimuliert, so dass die cAMP-Produktion gehemmt wird (101). Während die lösliche GC nicht durch Zink beeinflusst wird, führt die zink-abhängige PDE-Inhibition zu einer Anhäufung des zyklischen Nukleotids cGMP mit einer anschließenden Kreuzaktivierung der PKA (siehe Abbildung 3) (102).





**Abb. 3: Schematische Darstellung des Zink-Einflusses auf die PKA Funktion.** Zink hat keinen direkten Einfluss auf die PKA Aktivität. Zink inhibiert reversibel die PDE und inhibiert die GTPase Aktivität des stimulatorischen GTP-bindenden Proteins, welches die AC-Aktivität stimuliert. Auf diese Weise wird die Akkumulation und die Produktion der zyklischen Nukleotide beeinflusst und damit die Aktivität der PKA, was sowohl den Raf/Mek1/2/Erk1/2 Signalweg als auch den Transkriptionsfaktor CREB beeinflusst (eigene Darstellung).

## 1.9 NFAT-Signalweg in T-Zellen

Der Transkriptionsfaktor Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) vermittelt als Antwort auf eine T-Zellaktivierung die Expression verschiedener Gene wie IL-2. Es gibt verschiedene NFAT-Proteine, von denen NFAT1-4 in ihrer Aktivität von  $\text{Ca}^{2+}$  und Calcineurin abhängig sind. In ruhenden Zellen verbleiben die phosphorylierten NFAT-Proteine im Cytoplasma. Nach TCR-Stimulation erfolgt ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx, der zur Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin führt. Diese dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor NFAT, welcher anschließend in den Kern transloziert und transkriptional aktiv wird (103).

### 1.9.1 Zink-Einfluss auf die NFAT-Aktivierung

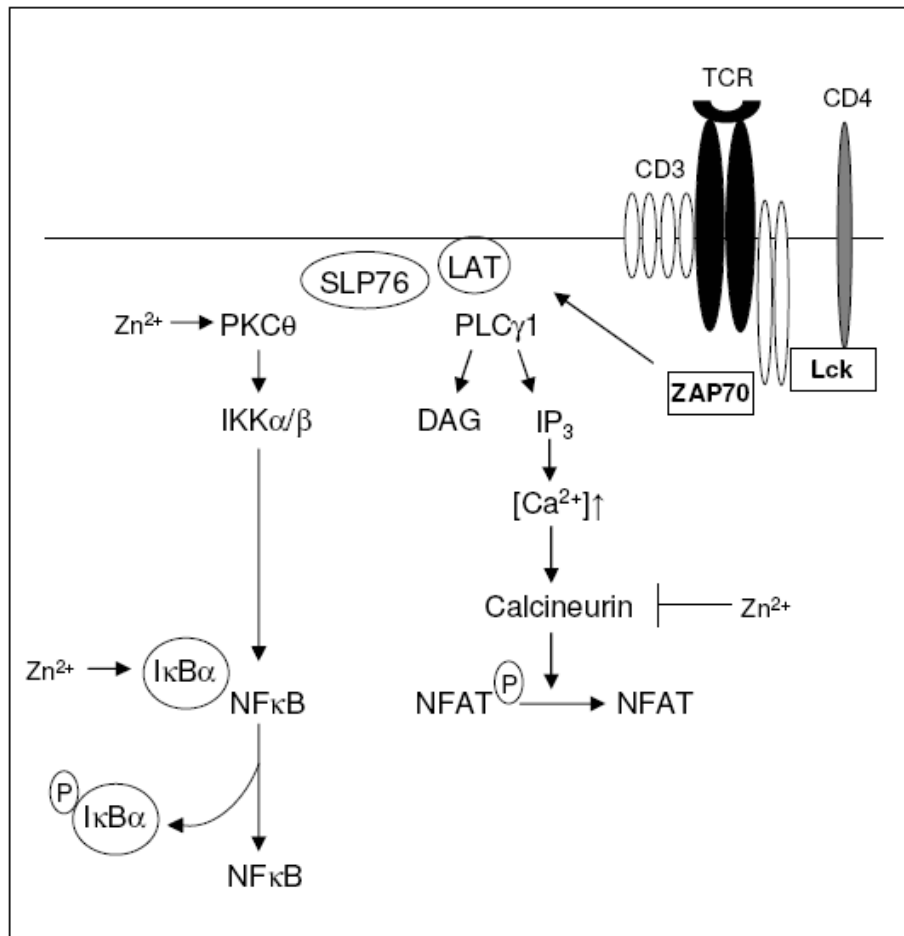
Verschiedene Veröffentlichungen beschreiben eine Inhibition von aufgereinigtem Calcineurin durch Zink, obwohl in den meisten Fällen die Aktivierung durch Nickel induziert wurde und nicht durch einen physiologischen Stimulus (104-106). Kubohara und seine Gruppe konnten zeigen, dass unter Verwendung von Nickel-stimuliertem Calcineurin aus Rindergehirn und aufgereinigtem Calmodulin 10 nM bis 10  $\mu$ M Zink die Aktivität von Calcineurin inhibieren (107). Demnach hat Zink einen Einfluss auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors NFAT und beeinflusst so die Expression verschiedener Gene wie z.B. IL-2 (siehe Abbildung 4).

## 1.10 NF $\kappa$ B-Signalweg in T-Zellen

Nuclear factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) ist der Name einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die als Dimere fungieren und Gene regulieren, die unter anderem an Immunantworten beteiligt sind (108). NF $\kappa$ B Proteine kommen im Cytoplasma als inaktive Form vor, assoziiert an das Inhibitorprotein I $\kappa$ B  $\alpha/\beta$ . Nach Stimulation über den TCR erfolgt über eine PKC $\theta$ -abhängige Signalkaskade die Aktivierung der I $\kappa$ B-Kinasen  $\alpha/\beta/\gamma$  (IKK  $\alpha/\beta/\gamma$ ). Diese phosphorylieren den Inhibitor und markieren ihn so für den proteasomalen Abbau. Dadurch wird das NF $\kappa$ B Protein frei, gelangt in den Zellkern und wird transkriptional aktiv (58).

### 1.10.1 Zink-Einfluss auf die NF $\kappa$ B-Aktivierung

Zink beeinflusst den NF $\kappa$ B Signalweg auf unterschiedliche Weise. Während Zink in der Lage ist die PKC zu stimulieren und somit einen indirekten Einfluss auf den NF $\kappa$ B Signalweg hat (109, 110), wird die NF $\kappa$ B-abhängige Genexpression während eines Zink-Mangels nach TCR/CD28-Stimulation beeinträchtigt (111). Als Grund für den beobachteten Effekt wird unter anderem eine NF $\kappa$ B-Aktivierung durch einen Zink-Einfluss auf den I $\kappa$ B Signalweg vermutet (siehe Abbildung 4) (112).



**Abb. 4: Schematische Darstellung des Zink-Einflusses auf die NFAT- und NFκB-Aktivierung.** Zink inhibiert die Phosphatase Calcineurin, welche Calcium-abhängig den Transkriptionsfaktor NFAT dephosphoryliert. Im NFκB Signalweg beeinflusst Zink über die PKCθ die IKKα/β Aktivierung und damit die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB. Es wird auch ein Zink-Einfluss auf den IκB Signalweg vermutet (eigene Darstellung).

## 2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, mit Hilfe von primären T-Zellen und der humanen T-Zelllinie Jurkat die Rolle von Zink in der Signaltransduktion von T-Zellen im Vergleich zur TCR-vermittelten Signalweiterleitung aufzuklären.

Dabei sollte zunächst herausgefunden werden, ob intrazellulär freigesetztes Zink nach TCR-Stimulation einen Einfluss auf die Signalweiterleitung in die Zelle hat. Im Vergleich zum Second Messenger Calcium sollte dafür die Freisetzung von Zink nach TCR-Aktivierung überprüft werden und mit Hilfe des Zink Chelators TPEN im Western Blot der Einfluss von anti-CD3-induziertem Zink auf die Phosphorylierung der MAPK p38 und ERK1/2 untersucht werden.

Desweiteren sollte die Aktivierung zentraler Signalkinasen wie der Rezeptor-nahen Src Kinase Lck und der MAPK p38, JNK2 und ERK1/2 mit Hilfe der Western Blot Analyse nach TCR- und nach Zink/Pyrithion-Stimulation verglichen werden. Das Ionophor Pyrithion wurde in Kombination mit Zink verwendet, um einen raschen Anstieg freien Zinks in der Zelle zu gewährleisten und die daraus resultierende Beeinflussung der Signaltransduktion zeitnah untersuchen zu können.

Anschließend sollten aus anderen Zelltypen bereits bekannte Wirkmechanismen von Zink auf ihre Gültigkeit in T-Zellen untersucht werden. Dabei sollten mögliche Lipidmodifikationen und verschiedene Signalwege wie z.B. der PKA-Signalweg und die Inhibition von MKPs in Betracht gezogen werden. Durch die Verwendung von Inhibitoren und Aktivatoren der einzelnen Signalproteine sollte der induzierte Mechanismus auf molekularer Ebene nachvollzogen und aufgeklärt werden.

Um den funktionalen Einfluss von Zink auf die T-Zellen untersuchen zu können, sollten mittels PCR und ELISA die Produktion der Th1- bzw. Th2-Cytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  bzw. IL4 bestimmt werden. Da unter Zink-Mangel das TH1/TH2-Gleichgewicht gestört ist, sollte der molekulare Mechanismus der Zink-Supplementierung, der zur Wiederherstellung optimaler Immunfunktionen führt, erforscht werden. Die Rolle unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren wie CREB, T-bet, GATA-3, c-maf, NFAT und NF $\kappa$ B sollte dabei ebenfalls überprüft werden.

Wäre es möglich, den molekularen Mechanismus des Zink-Effektes in T-Zellen aufzuklären, würde dies zum einen die Rolle von Zink als möglichen Second Messenger untermauern und für die Behandlung T-Zell-vermittelter Erkrankungen und Störungen des Immunsystems neue Therapieperspektiven eröffnen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

- Analysenwaage, 770/GS/GJ (Kern, Balingen-Frommern)
- Bio-Imager, LAS 3000 (Fujifilm Lifescience, Düsseldorf)
- Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg)
- CO<sub>2</sub>-Inkubator, MCO-17AIC (Sanyo, Gunma, Japan)
- Durchflusscytometer, FACS-Calibur (Becton-Dickinson, Heidelberg)
- Elektrophorese-Kammer für Polyacrylamidgele, Mini-Protean 3 Electrophoresis Module Assembly (Biorad, München)
- Elektrophorese-Netzgerät, Power Pac 300 (Biorad, München)
- ELISA-Reader, Sunrise (Tecan, Crailsheim)
- ELISA-Washer, Atlantis (Asys Hitech, Eugendorf)
- Gefrierschrank, -20 °C (Bosch, München)
- Gefrierschrank, -86 °C, MDF-U71V (Sanyo, Gunma, Japan)
- Gel Dok XR System (Biorad, München)
- Kühlschrank (Bosch, München)
- Laborwaage, 1265 MP (Sartorius, Göttingen)
- Magnetrührer, MR3001 (Heidolph, Schwabach)
- Mikroskop, SM-LUX (Leitz, Wetzlar)
- Multipipette, Multipette plus (Eppendorf, Hamburg)
- Multiplate Reader, Ultra 384 (Tecan, Crailsheim)
- pH-Messgerät, HI 9321 (Hanna Instruments, Kehl am Rhein)
- Photometer, BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg)
- Pipetten, 0,5-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl, Research (Eppendorf, Hamburg)
- Pipettierhilfe, Pipetus-Akku (Hirschmann, Eberstadt)
- Schüttler, HS 250 basic (IKA Labortechnik, Staufen)
- Schüttler, Titramax 101 (Heidolph Instruments, Schwabach)
- Schweißgerät, Polystar 100 GE (Rische+Herfurth GMBH, Hamburg)
- Standzentrifuge, Varifuge 3.0 RS (Heraeus Christ, Osterode)

- Sterile Werkbank, KR-130 und KR-210 (Kojair, Vilppula, Finnland)
- Szintillationszähler, 1219 Rackbeta (LBK, Wallace, Freiburg)
- Taqman PCR-Gerät, Sequence Detection System ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- Thermomixer, Comfort und Compact (Eppendorf, Hamburg)
- Tischzentrifuge, 5417 R (Eppendorf, Hamburg)
- Tischzentrifuge, Z 160 M (Hermle, Wehingen)
- Ultraschallgerät, Vibra Cell (Sonics & Materials, Danbury, Connecticut, USA)
- UV-Cleaner Box, UVC/T (Lab4You, Berlin)
- UV-Transilluminator TI2 (Biometra, Göttingen)
- Video Graphik Printer, UP-895CE (Sony, Tokyo, Japan)
- Vortex, Reax (Heidolph, Schwabach)
- Wasserbad (GFL, Burgwedel)
- Zellzählgerät, Casy 1 TT (Schärfe System, Reutlingen)

### **3.1.2 Laborbedarf**

- Belichtungskassette (Biorad, München)
- Casy-Cups (Schärfe System, Reutlingen)
- Einmalküvetten (Sarstedt, Nümbrecht)
- Einmalpipetten, 5 mL, 10 mL und 25 mL (Greiner, Nürtingen)
- Erlenmeyerkolben, 250 mL (Schott, Mainz)
- FACS-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht)
- Gel-Blotting-Papiere (Schleicher und Schuell, Dassel)
- Gelkamm, 10 und 15 Zähne (BioRad Laboratories, München)
- Glasplatten, Outer Glass PLTW/1,5 mm, M-P-3 (BioRad Laboratories, München)
- Glasplatten, Short Plates, M-P-3 (BioRad Laboratories, München)
- Klebefolien, Optical adhesive covers (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- Kunststoffröhrchen mit Schraubverschluss, 15 mL und 50 mL (Falcon, Heidelberg)
- Latex Einmalhandschuhe (Kimberly-Clark, Zaventem, Belgien)
- Pipettenspitzen, 1-10  $\mu$ L und 10-100  $\mu$ L (Sarstedt, Nümbrecht)
- Pipettenspitzen, 100-1000  $\mu$ L (Eppendorf, Hamburg)
- Pipettenspitzen Combitips, 1 mL, 2,5 mL, 5 mL und 10 mL (Eppendorf, Hamburg)

- Polypropylen-Röhrchen mit Deckel, 5 mL (Greiner, Nürtingen)
- Polystyren-Röhrchen mit und ohne Deckel, 13 mL (Sarstedt, Nümbrecht)
- Reaktionsgefäße, 1,5 und 2 mL (Sarstedt, Nümbrecht)
- Reaktionsplatten, MicroAmp Optical 96-Loch (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- Szintillationsröhrchen (PerkinElmer, Rodgau)
- Trans-Blot Transfer Medium, pure Nitrocellulose Membrane (Biorad, München)
- UV-Einmalküvette, UVette (Eppendorf Hamburg)
- Western Blot-Schwammkissen (Biorad, München)
- Zellkulturflaschen, 25 cm<sup>2</sup> und 75 cm<sup>2</sup> (Nunc, Roskilde, Dänemark)
- Zellkulturplatten, 6-Loch, 12-Loch, 24-Loch und 96-Loch (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Zellkulturschalen, 100 mm x 20 mm (Sarstedt, Nümbrecht)

### 3.1.3 Zellkulturmedien und Mediumzusätze

- Fetales Kälberserum (PAA, Cölbe)
- Kulturmedium IMDM (Bio Whittaker, Heidelberg)
- Kulturmedium RPMI 1640 (Bio Whittaker, Heidelberg)
- L-Glutamin, 200 mM (Bio Whittaker, Heidelberg)
- NaPyruvat 100 mM (Bio Whittaker, Heidelberg)
- Nicht-essentielle Aminosäuren, NEAA 100x (Bio Whittaker, Heidelberg)
- Phosphate Buffered Saline ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>, 1x (Bio Whittaker, Heidelberg)
- Penicillin/Streptomycin, 10.000 U/ml + 10.000 µg/ml (Bio Whittaker, Heidelberg)

### 3.1.4 Immunologische Reagenzien

- Anti-human-CD3-FITC konjugiert (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Anti-human-CD45-FITC konjugiert (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Isotypkontrolle IgG<sub>1</sub> κ-FITC konjugiert (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Ziege-anti-Maus IgG (H&L) HRP-gekoppelter Antikörper (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Pferd-anti-Kaninchen IgG (H&L) HRP-gekoppelter Antikörper (Cell Signaling, Beverly, USA)
- HRP-konjugierter-anti-Biotin-Antikörper (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Kaninchen-anti-Phospho-Lck (Tyr 505) Antikörper (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Kaninchen-anti-Phospho-Src Familie (Tyr 416) Antikörper (Cell Signaling, Beverly, USA)

- Kaninchen-anti-Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (3D7) R-mAntikörper (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Maus-anti-Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (G9) Antikörper (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Kaninchen-anti-Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) Antikörper (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Kaninchen-anti-Phospho-CREB (Ser133) (87G3) Antikörper (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Kaninchen-anti-Phospho-PKA Substrat (RRXS/T) (100G7E) Antikörper (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Kaninchen-anti- $\beta$ -Aktin Antikörper (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Kaninchen-anti-Lck-Antikörper (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Kaninchen-anti-ZAP70-Antikörper (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Biotinylierte Proteinleiter (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Anti-human-CD3-Antikörper Okt3 (Natutec, Frankfurt)
- PHA (Becton Dickinson, Heidelberg)
- PMA (Sigma-Aldrich, Steinheim)

### 3.1.5 Sonstige Reagenzien

- [ $\alpha$ - $^{32}$ P] CTP,  $1,11 \times 10^{11}$  kBq/mmol (Hartmann Analytik, Braunschweig)
- A23187, Calcimycin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- AcrylBisamid solution (37.5:1), 30% (w/v) (SERVA, Heidelberg)
- Agarose (Gibco, Karlsruhe)
- Ammonium Persulfat (Biorad, München)
- Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen)
- Aqua Spüllösung (Delta Select, Pfullingen)
- 8-Br-cGMP (BioLog LSI, Bremen)
- Biotinylierte Proteinleiter (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Brilliant SYBR Green QPCR Mastermix (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)
- Bromphenolblau (Riedel-de-Haën, Hannover)
- Bovines Serum Albumin (BSA) (Fluka, Buchs, Schweiz)
- $\text{CaCl}_2$  (Merck, Darmstadt)
- Casy-Ton (Schärfe System, Reutlingen)
- dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 100 mM (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)



- db cAMP (BioLog LSI, Bremen)
- DMSO, Dimethyl-Sulfoxid (Merck, Darmstadt)
- DNA-Leiter, O`Range Ruler, 50 und 100 bp (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- DTT, Dithiothreitol (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 mM (Applied Biosystems, Warrington, Großbritannien)
- EDTA, Ethylendiamintetraacetat (Merck, Darmstadt)
- EGTA, Ethylenglycoltetraacetat (Roth, Karlsruhe)
- Ethanol, absolut, (Universitätsklinikum, Aachen)
- Ethanol, 70 %, vergällt (Universitätsklinikum, Aachen)
- Ficoll-Trennlösung 1,077 g/ml (Biochrom, Berlin)
- FluoZin-3 A, freie Säure (Invitrogen, Eugene, USA)
- FluoZin-3 Acetoxymethylester AM (Invitrogen, Eugene, USA)
- Fluo-4 AM (Fluka, Buchs, Schweiz)
- Forskolin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Glycerin (Merck, Darmstadt)
- Glycin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- H-89 (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Heparin-Natrium, Liquemin N 5000 (Roche, Mannheim)
- Hepes (Merck, Darmstadt)
- HotStar-Taq, 5 U/μL (Qiagen, Hilden)
- IBMX, Isobutyl-1-methylxanthin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Klenowfragment, 300 U (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- Klenowpuffer, 10x (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- Lipoluma Plus (Lumac LSC B.V., Groningen, Niederlande)
- Loading dye solution, O`Range 6x (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- LumiGLO Reagent and Peroxide (Cell Signaling, Beverly, USA)
- LY 83538 (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Magermilchpulver Sucofin (Trade Service International, Zeven)
- β-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)
- Methanol (Universitätsklinikum, Aachen)
- Methyl-beta-Cyclodextrin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Methyl-[<sup>3</sup>H]-Thymidin (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Großbritannien)

- $MgCl_2$  (Qiagen, Hilden)
- NaCl (Merck, Darmstadt)
- $NaH_2PO_4$  (Fluka, Buchs, Schweiz)
- Natrium-Pyrithion (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Natronlauge (Merck, Darmstadt)
- $Na_3VO_4$  (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- NFAT Oligonukleotide (TIB Molbiol, Berlin)
- Oligonukleotidprimer (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- PCR-Puffer, 10x (Qiagen, Hilden)
- Pefabloc SC (Roche, Mannheim)
- Poly(dI-dC) (Amersham, Freiburg)
- Ponceau S (Fluka, Buchs, Schweiz)
- Propidium Iodid, Minimum 95% (HPLC) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- RNase, DNase-frei (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- RP-8-cpt-cAMPS (BioLog LSI, Bremen)
- Salzsäure (Merck, Darmstadt)
- SB202190 (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- SDS, Natriumdodecylsulfat (Merck, Darmstadt)
- TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin), for electrophoresis, approx. 99% (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- TPEN, N,N,N',N'-Tetrakis(-)[2-pyridylmethyl]-ethylendiamin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Tris Base, Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (Merck, Darmstadt)
- Tween-20 (Merck, Darmstadt)
- U0126 (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Wortmannin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- $ZnSO_4 \times 7 H_2O$  (MERCK, Darmstadt)

### 3.1.6 Kommerziell erhältliche Kits

- Humane ELISA Komponenten-Sets zum Nachweis von IL-2 und IFN- $\gamma$  (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg)
- Lance cAMP 384 Kit (PerkinElmer, Rodgau)

- cGMP-Enzymimmunoassay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA)
- Nucleo Spin RNA II (Macherey Nagel, Düren)
- qScript cDNA-Synthese Kit (Quanta, Gaithersberg, USA)

### 3.1.7 Zelllinien

Tab. 3.1.1: Auflistung aller verwendeten Zelllinien

	ZELLINIE	SPEZIES	KULTURMEDIUM
1	Jurkat	humane T-Zelle	RPMI 1640 + 1 mM NaPyruvat + NEAA (1x)
2	Jurkat <sup>CD45 neg</sup>	humane, CD45 defiziente T-Zelle	RPMI 1640 + 1 mM NaPyruvat + NEAA (1x)
3	Jurkat <sup>Lck neg</sup>	humane, Lck defiziente T-Zelle	RPMI 1640 + 1 mM NaPyruvat + NEAA (1x)
4	Jurkat <sup>ZAP70 neg</sup>	humane, ZAP70 defiziente T-Zelle	IMDM+ 1 mM NaPyruvat + NEAA (1x)
5	MOLT-4	humane T-Zelle, CD3 negativ	RPMI 1640
6	Raji	humane, lymphoblastoide B-Zelle	RPMI 1640
7	BJAB	humane B- Zelle	RPMI 1640
8	LP-1	humane B- Zelle	IMDM + 20% FCS
9	EBV Michael	EBV-transformierte B-Zelle	IMDM + 18% FCS
10	EBV Peter	EBV-transformierte B-Zelle	IMDM + 18% FCS

Quelle der einzelnen Zelllinien:

- 1, 5, 6 = DSMZ  
 2, 3 = Dr. Reinhard Schwinzer (Hannover)  
 4 = Dr. Karsten Gülow (Heidelberg)  
 7 = Prof. Ritter (UK Aachen)  
 8 = Dr. Galm (UK Aachen)  
 9, 10 = Institutsbestand

Falls nicht anders kenntlich gemacht, enthalten alle Medien 10% FCS (30 min bei 56°C inaktiviert), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Isolierung von PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells)

#### **Prinzip:**

PBMC weisen als mononukleäre Zellen des peripheren Blutes eine im Vergleich zu Granulocyten und Erythrocyten geringere Dichte auf und können daher über eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden. Ficoll ist eine Lösung aus einem hochmolekularen Zucker und Epichlorhydrin, einer reaktiven organischen Komponente, mit einer Dichte von 1,077 g/mL. Während sich die Erythrocyten am Boden absetzen, befinden sich die Granulocyten nach der Zentrifugation in der unteren Phase. Thrombocyten besitzen eine noch geringere Dichte als mononukleäre Zellen und sammeln sich in der oberen Phase an, so dass die PBMC aus der Interphase isoliert werden können.

#### **Reagenzien:**

- Heparin, 10.000 Einheiten/mL
- PBS
- Ficoll der Dichte 1,077 g/mL

#### **Durchführung:**

- 1) Zu Beginn in zwei 50 mL Röhrchen jeweils 25 ml PBS vorlegen
- 2) Anschließend mit 25 mL heparinisiertem Vollblut auffüllen
- 3) Vier 50 mL Röhrchen mit jeweils 25 mL Ficoll beschicken und darüber 25 mL des Blut/PBS-Gemisches schichten
- 4) Gradientenzentrifugation bei RmT und 600 g für 20 min
- 5) Lymphocytenringe der Interphase in zwei 50 mL Röhrchen sammeln und mit PBS auffüllen
- 6) Zentrifugation bei RmT und 300 g für 10 min
- 7) Nach Entfernen der Überstände Aufnahme der Pellets in 20 mL PBS
- 8) Zentrifugation bei RmT und 300 g für 10 min
- 9) Überstand dekantieren und das Pellet in 20 mL PBS resuspendieren
- 10) Nach der Zentrifugation bei RmT und 300 g für 10 min, Pellet in 10 mL PBS aufnehmen
- 11) Zellzahlbestimmung mit Hilfe des Casy (siehe 3.2.2)
- 12) Einstellen einer definierten Zellzahl, die von den jeweiligen Anschlussversuchen abhängt

### 3.2.2 Zellzahlbestimmung am Casy (Cell Counter and Analyzer System)

**Prinzip:**

Die Zellzahlbestimmung am Casy beruht auf einer Partikelmessung nach dem Widerstandsmessprinzip in Kombination mit einer Signalauswertung durch Pulsflächenanalyse. Während der Messung fließt durch die Messkapillare ein konstanter Strom, wobei die elektrolytgefüllte Kapillare einen definierten elektrischen Widerstand darstellt. Da die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge Elektrolytlösung verdrängen, unterscheidet sich der Widerstand der Partikel von dem der umgebenden Lösung. Beim Durchtritt einer jeden Zelle vergrößert sich der Widerstand entlang der Kapillarstrecke, da intakte Zellen in erster Linie als Isolatoren betrachtet werden können. Die resultierende Spannungsänderung wird dann gemessen.

**Reagenzien:**

- Casy-Ton

**Durchführung:**

- 1) Zugabe von 10  $\mu$ L Zellen zu 10 mL Casy-Ton
- 2) Messung mit Hilfe des Casy

### 3.2.3 Anreicherung humaner T-Zellen

**Prinzip:**

Aus isolierten, humanen PBMC werden T-Zellen angereichert, indem in einem ersten Schritt durch Inkubation mit PHA aktivierte T-Zellblasten hergestellt werden. Anschließend erfolgt eine Trennung von den adhärennten Monozyten und B-Zellen und der verbleibende Zellüberstand wird mit Hilfe von IL-2 zu T-Zellen angereichert. Die erhaltenen T-Zellen werden daraufhin im FACS entsprechend ihrer CD3-Expression bzw. Reinheit überprüft (3.2.17.1).

**Reagenzien:**

- PHA (1 mg/mL)
- IL-2 (1 U/ $\mu$ L)
- RPMI-Medium (10% FCS; 100 U/mL Penicillin; 100  $\mu$ g/mL Streptomycin und 2 mM L-Glutamin)

**Durchführung:**

- 1) Überführen von isolierten PBMC (siehe 3.2.1) zu je 25 mL ( $5 \times 10^5$  Zellen/mL) in Kulturflaschen

- 2) Zellen zwei Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit 2,5 µg/mL PHA inkubieren
- 3) Anschließend Kulturüberstand bei 300g und RmT für 10 min abzentrifugieren
- 4) Pellets in 20 mL RPMI Medium aufnehmen, resuspendieren und für vier Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit 50 U/mL IL-2 inkubieren

### 3.2.4 Herstellung von Zelllysaten für die Western Blot-Analyse

#### **Prinzip:**

Um intrazelluläre Proteine, die nicht sekretiert werden, und deren Phosphorylierungsgrad mittels SDS-PAGE (3.2.11) und Western Blot (3.2.12) detektieren zu können, müssen die Zellen aufgeschlossen werden.

Um zu verhindern, dass spezifische Phosphorylierungen abgebaut werden, wird dem Probenpuffer, in dem die Zellen aufgenommen werden, der Phosphatase-Inhibitor Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> zugesetzt.

#### **Reagenzien:**

- Probenpuffer (H<sub>2</sub>O dest.; 0,5 M TrisHCl pH 6,8; 26,6% Glycerin; 10% SDS; 0,5% Bromphenolblau), kurz vor Gebrauch 1% β-Mercaptoethanol und 1% 100 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> zugeben

#### **Durchführung:**

- 1) Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe des Casy (3.2.1.1)
- 2) Zelllinien und PBMC werden auf 1x10<sup>6</sup> Zellen/mL und primäre T-Zellen auf 2x10<sup>6</sup> Zellen/mL eingestellt und den Versuchsansätzen entsprechend stimuliert. Anschließend die jeweiligen Proben in 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäße überführen
- 3) Zentrifugation bei RmT und 300 g für 10 min
- 4) Zellpellet in 100 µL Probenpuffer aufnehmen und resuspendieren
- 5) Behandlung mit dem Ultraschallgerät für den Zellaufschluss (Intensität 3; Output control 5; duty cycle 50%; 10 sec)
- 6) Inkubation der Proben für 5 min bei 95°C, Verwendung der Proben oder Lagerung bei -20°C

### 3.2.5 *In vitro*-Dephosphorylierung

#### **Prinzip:**

Um indirekt die Aktivität von Phosphatasen nachzuweisen, wurden Jurkat Zellen zur vollständigen Aktivierung der Kinasen mit PHA stimuliert und nach Herstellung von Zelllysaten mit

unterschiedlichen Zink-Konzentrationen inkubiert. Der Grad der verbleibenden Phosphorylierung verschiedener Kinasen wurde anschließend im Western Blot untersucht.

**Reagenzien:**

- PHA (1 mg/mL)
- Hepes-Reaktionspuffer (20 mM Hepes; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7,5)
- ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O (1 mM)
- Probenpuffer (H<sub>2</sub>O dest.; 0,5 M TrisHCl pH 6,8; 26,6% Glycerin; 10% SDS; 1% 100 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 0,5% Bromphenolblau)

**Durchführung:**

- 1) Jurkat Zellen auf 1x10<sup>6</sup>/mL einstellen und 10 mL Zellen mit 10 µg/mL PHA stimulieren
- 2) Inkubation bei 37° und 5% CO<sub>2</sub> für 25 min
- 3) In 1,5 mL Reaktionsgefäße jeweils unterschiedliche Zink-Konzentrationen vorlegen
- 4) 50 µL Probenpuffer in eine gleiche Anzahl von 1,5 mL Reaktionsgefäßen vorlegen
- 5) Zentrifugation der Zellen bei RmT und 300 g für 10 min
- 6) Pellet in 3 mL eisgekühltem Hepes-Reaktionspuffer aufnehmen und durch Ultraschall (Intensität 3; Output control 5; duty cycle 50%; 10 sec) auf Eis lysieren
- 7) Zugabe von je 250 µL Zellysate pro Ansatz in die 1,5 mL Reaktionsgefäße mit dem vorgelegten Zink
- 8) Für den Kontrollansatz 150 µL Lysat in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß mit vorgelegtem Probenpuffer überführen und direkt für 5 min bei 95°C erhitzen
- 9) Inkubation der restlichen Ansätze für 30 min im Thermoblock bei 37°C
- 10) Anschließend aus den jeweiligen Ansätzen 150 µL Aliquots entnehmen und in die 1,5 mL Reaktionsgefäße mit dem Probenpuffer überführen
- 11) Inkubation für 5 min bei 95°C, danach bei -20° einfrieren

**3.2.6 RNA-Isolierung****Prinzip:**

Zur Isolation der RNA wird das NucleoSpin® RNA II-Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Dazu werden die Proben zu Beginn mit einem Puffer lysiert, der aufgrund der enthaltenen chaotropen Ionen RNAsen inaktiviert und die Adsorption der RNA an die Silica Membran fördert. In Gegenwart von Ethanol bindet die RNA an die Silica-Gel-Membran in einem Zentrifugensäulchen und wird nach einigen Waschschritten, in RNase-freiem Wasser eluiert. Kontaminierende DNA wird

durch Zugabe einer rDNase-Lösung entfernt. Dieses Isolierungsverfahren führt zu einer Anreicherung von mRNA, da ausschließlich RNA ab einer Größe von 200 Nukleotiden isoliert wird.

**Reagenzien:**

- Reagenzien des NucleoSpin® RNA II-Kits
- Ethanol (70%)
- $\beta$ -Mercaptoethanol

**Durchführung:**

- 1) Einstellen der Zellen auf  $2 \times 10^6$ /mL und Zellen zu je 1 mL auf eine 12-Loch Platte verteilen
- 2) Stimulation der Zellen gemäß der Versuchsansätze und Inkubation für 4 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>
- 3) Durchführung von Zellyse und RNA-Isolierung nach Angaben des Herstellers
- 4) Bestimmung der RNA-Konzentration (3.2.6.1) und Lagerung der Proben bei -80°C

### 3.2.6.1 Bestimmung der RNA-Konzentration

**Prinzip:**

Durch eine spektralphotometrische Messung der optischen Dichte lässt sich sowohl die Menge als auch die Reinheit von RNA bestimmen. Während Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm ein Absorptionsmaximum aufweisen, befindet sich das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm. Der RNA-Gehalt der Probe ist nach dem Lambert-Beerschen Gesetz linear zur absoluten Extinktion der Lösung gegen Wasser bei 260 nm. Der Quotient der Extinktionswerte 260 nm/280 nm kann als Maß für die Kontamination der Probe mit Proteinen betrachtet werden. Er sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen.

**Reagenzien:**

- Aqua ad iniectabilia

**Durchführung:**

- 1) Isolierte RNA 1:50 mit Aqua ad iniectabilia verdünnen
- 2) Bestimmung der optischen Dichte im Photometer mit Aqua ad iniectabilia als Nullabgleich
- 3) Die RNA-Konzentration wird wie folgt berechnet:

$$\text{Konzentration } (\mu\text{g/mL}) = \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \times \text{Extinktion bei 260 nm}$$



### 3.2.7 Reverse Transkription

#### **Prinzip:**

Für die reverse Transkription wird das qScript cDNA-Synthese Kit von Quantas verwendet. Hier kommen Oligo-dT-Primer (komplementär zum Poly-A-Schwanz des 3'-Endes der mRNA) und Random Hexamer Primer zum Einsatz. Diese binden an die umzuschreibende mRNA und bilden einen DNA/RNA-Doppelstrang, welcher der Reversen Transkriptase als Ausgangspunkt für die cDNA-Synthese dient.

#### **Reagenzien:**

- Aqua ad iniectionabilia
- 1 µg RNA Template
- qScript Reaction Mix (5x)
- qScript Reverse Transkriptase

#### **Durchführung:**

- 1) 1 µg RNA in 15 µL Aqua ad iniectionabilia in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettieren
- 2) Zugabe von 4 µL Reaction Mix (5x) und 1 µL Reverse Transkriptase
- 3) Die Ansätze nach vorsichtigem Mischen wie folgt (Tab. 3.2.1) im Thermoblock erhitzen:

Tab. 3.2.1: Reaktionsschema für die cDNA-Synthese

Dauer	Temperatur
5 min	25°C
45 min	42°C
5 min	85°C

- 4) cDNA bei -20°C lagern

### 3.2.8 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

#### **Prinzip:**

Die RT-PCR ist eine molekularbiologische Methode zum Nachweis von mRNA. Mittels reverser Transkriptase wird mRNA zu cDNA umgeschrieben (3.2.7) und dann mit Hilfe der Primer amplifiziert, die an die Template DNA hybridisieren. Von deren 3' Ende aus synthetisiert die DNA-Polymerase den neuen DNA-Doppelstrang.

### 3.2.8.1 semiquantitative RT-PCR

Zur Überprüfung der Expression von Cytokinen und Transkriptionsfaktoren wurde eine RT-PCR angewendet und das Amplifikat gelelektrophoretisch aufgetrennt und sichtbar gemacht (3.2.8.2).

#### **Reagenzien und Durchführung:**

- 1) Gemäß Tabelle 3.2.2 einen Mastermix in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß auf Eis ansetzen (Primersequenzen siehe Anhang 1)

Tab. 3.2.2: Mastermix für HotStart RT-PCR

Reagenz	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Endkonzentration
Aqua ad iniectabilia	38	
10x PCR-Puffer	5	1x
dNTP-Mix (10 mM)	3	0,6 mM
3` Primer	0,75	0,08 $\mu\text{M}$
5` Primer	0,75	0,08 $\mu\text{M}$
HotStar Taq-Polymerase	0,5	0,05 U/ $\mu\text{L}$

- 2) 48  $\mu\text{L}$  Mastermix mit 2  $\mu\text{L}$  cDNA in einem 0,2 mL Reaktionsgefäß mischen und nach Tabelle 3.2.3 amplifizieren

Tab. 3.2.3: PCR-Programm

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Aktivierung der Polymerase	95°C	15 sec	1
Denaturierung	95°C	40 sec	35
Primer-Annealing	60°C	1 min	
Elongation	72°C	1,5 min	

- 3) Die Proben anschließend elektrophoretisch auftrennen (3.2.8.2)

### 3.2.8.2 Agarose-Gelelektrophorese

#### **Prinzip:**

Die RT-PCR-Reaktionsprodukte werden mittels Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Da das Gel bereits Ethidiumbromid enthält, lagert sich das Ethidiumbromid in die

Nukleinsäure-Doppelstränge ein, so dass die aufgetrennten DNA-Banden im UV-Licht sichtbar gemacht und anhand eines Längenstandards identifiziert werden können.

**Reagenzien:**

- TBE-Puffer (89 mM TrisBase; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA; pH 7,5)
- 6x Ladepuffer (O`Range Loading Dye solution)
- Agarose
- Ethidiumbromid (10 mg/mL)
- 50 und 100 bp Leiter (O`Range ruler)

**Durchführung:**

- 1) Den Gelschlitten in die Gießhalterung einspannen und austarieren
- 2) 1,5 g Agarose mit 100 ml TBE-Puffer (1x) aufkochen bis die Agarose schlierenfrei gelöst ist
- 3) Zugabe von 4  $\mu$ L Ethidiumbromidlösung
- 4) Die Agarose luftblasenfrei in den Gelschlitten eingießen, den Kamm einsetzen und 30 min aushärten lassen
- 5) Anschließend den Gelschlitten mit dem Gel in die Elektrophoresekammer einsetzen, die mit TBE-Puffer (1x) aufgefüllt wird bis das Gel vollständig bedeckt ist
- 6) Die Proben 6:1 mit Ladepuffer verdünnen und 12  $\mu$ L in eine Geltasche pipettieren
- 7) In die äußere Geltasche 12  $\mu$ L Längenstandard geben
- 8) Die Elektrophorese läuft bei 90 V für ca. 1 h
- 9) Die Auswertung und die Dokumentation erfolgen mit Hilfe des BioRad Gel Dok XR Systems

**3.2.8.3 Real time quantitative SYBR Green PCR****Prinzip:**

Der Farbstoff SYBR Green bindet unspezifisch in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA. Dadurch nimmt seine Fluoreszenz (Emissionsmaximum 529 nm) proportional zur Menge des PCR-Produktes zu. Die Fluoreszenz-Emission wird nach jedem PCR-Zyklus aufgezeichnet. Dadurch wird das Beobachten der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion möglich. Dabei wird der Parameter  $C_T$  („cycle threshold“) als diejenige Zyklusnummer definiert, in der die Fluoreszenz-Emission der Probe die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Für die relative Quantifizierung wird die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode angewandt. Hier wird der  $C_T$ -Wert des zu untersuchenden Gens mit dem  $C_T$ -Wert des Housekeeping-Gens ( $\beta$ -Aktin) normalisiert ( $\Delta C_T$ ) und anschließend der Expressionsunterschied zwischen unbehandelter Kontrolle und behandelten Proben mittels Subtraktion bestimmt ( $\Delta\Delta C_T$ ).

Der relative Expressionsunterschied zwischen Probe und unbehandelter Kontrolle, normalisiert zum Housekeeping-Gen, wird wie folgt berechnet (113):

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

**Reagenzien:**

- Aqua ad iniectabilia
- Brilliant SYBR Green QPCR Mastermix
- Reference Dye (1:50 verdünnt mit Aqua ad iniectabilia)
- Primer gelöst in Aqua ad iniectabilia
- cDNA

**Durchführung:**

- 1) jeweils einen separaten Mastermix für das Housekeeping-Gen und die zu untersuchenden Gene in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß auf Eis gemäß Tabelle 3.2.4 ansetzen (Primersequenzen siehe Anhang 1)

Tab. 3.2.4: Mastermix für Real time quantitative SYBR Green PCR

Reagenz	Ansatz (µL)
Aqua ad iniectabilia	8,63
SYBR Green QPCR Mastermix	12,5
Primer 3` (0,1 µM Endkonzentration)	1,25
Primer 5` (0,1 µM Endkonzentration)	1,25
Reference Dye	0,375

- 2) 24 µL Mastermix und 1 µL cDNA in die Vertiefungen der Reaktionsplatte geben und diese mit Folie abdecken
- 3) Amplifizierung der Proben mit den Einstellungen gemäß Tabelle 3.2.5

Tab. 3.2.5: PCR-Programm

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Aktivierung der Polymerase	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	30 sec	50
Primer-Annealing	58°C	1 min	
Elongation	72°C	1 min	

- 4) Auswertung mit Hilfe des Programms Abi Prism 7000
- 5) Um die Größe der Amplifikate zu kontrollieren, wurden diese nach der PCR elektrophoretisch aufgetrennt (3.2.8.2)

### 3.2.9 Identifizierung und Charakterisierung von DNA-Bindeproteinen

Zum Nachweis von DNA-bindenden Proteinen wie Transkriptionsfaktoren werden Zellkernextrakte aus Zellen benötigt, welche die nachzuweisenden Proteine synthetisieren. Ebenso müssen die sequenzspezifischen Elemente des Promotors im Genom bekannt sein.

#### 3.2.9.1 Präparation von Zellkernextrakten

##### **Prinzip:**

Zum Nachweis von Transkriptionsfaktoren durch einen Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) müssen die Kernproteine aus den Zellen isoliert werden. Bei der Herstellung von Kernextrakten werden die Zellen zuerst mit einem hypotonen Puffer (Puffer A) inkubiert, wodurch die zytoplasmatischen Komponenten freigesetzt werden. Anschließend werden die verbliebenen Kerne mit einem Hochsalz-Puffer (Puffer C) inkubiert, so dass die Kerne anschwellen. Nach einer anschließenden Zentrifugation verbleiben die Kernproteine im Überstand.

Es wurden Zellkernextrakte aus Jurkat Zellen gewonnen, um eine funktionelle Bindung des im Extrakt enthaltenen Transkriptionsfaktors NFAT an die NFAT-Konsensussequenz im IL-2 Promotor zu untersuchen.

##### **Reagenzien:**

- PBS- Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Puffer (10 mL PBS+10 µL 100 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)

- Puffer A (10 mM HEPES-KOH pH 7,6; 15 mM KCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; **0,1 mM DTT; 0,5 mM Protease Inhibitor Cocktail; 0,5 mM Pefablock; 100 µM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>**)
- Puffer C (20 mM HEPES-KOH pH 7,6; 420 mM NaCl; 0,2 mM EDTA; 25% (v/v) Glycerin; **0,5 mM Protease Inhibitor Cocktail; 0,5 mM Pefablock; 100 µM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>**)  
Fettgedruckte Komponenten werden erst kurz vor Gebrauch der Reagenzien hinzugefügt.
- PHA (1 mg/mL)
- Okt3 (10 µg/mL)
- ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O (1 mM)
- Pyriithion (5 mM)

**Durchführung:**

- 1) Inkubation von Jurkat Zellen (1x10<sup>6</sup>/mL) 24 h vor Beginn des Versuches zu 10 mL in Kulturflaschen
- 2) Anschließend die Zellen in den Kulturflaschen mit PHA (10 µg/mL), Okt3 (100 ng/mL), Zink (75 µM) oder Zink (7,5 µM)/Pyriithion (10 µM) für 1 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> stimulieren
- 3) Nach der Stimulation Zellen in 15 mL Röhrchen überführen und bei 300 g und RmT für 10 min zentrifugieren
- 4) Zweimaliges Waschen der Pellets mit eiskaltem PBS- Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Puffer und Zentrifugation bei 300 g und 4°C für 10 min
- 5) Nach Entfernen des Puffers Lyse der Zellen mit 1 mL Puffer A pro Ansatz
- 6)  berf hren des Zelllysats in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß und Inkubation für 10 min auf Eis, um die Zellen anschwellen zu lassen
- 7) Nach der Inkubation Zentrifugation der Zelllösung bei 700 g und 4°C für 5 min
- 8) Abnahme und Verwerfen des Überstandes
- 9) Anschließend das Pellet durch vorsichtiges Invertieren mit 80 µL Puffer C resuspendieren
- 10) Zellkernmembranaufschluss durch eine zwanzigmin tliche Inkubation der Lösung auf Eis
- 11) Zentrifugation der Lösung bei 15000g und 4°C für 10 min
- 12) Abnahme des Überstandes und Lagerung bei -80°C in kleinen Aliquots nach Schockfrostern in flüssigem Stickstoff
- 13) Bestimmung der Proteinkonzentration (3.2.14)

### 3.2.9.2 Radioaktive Markierung der DNA-Oligonukleotide

#### Hybridisierung

Die DNA-Bereiche, die mittels Gelretardationsanalyse auf eine funktionelle Proteinbindung hin untersucht werden sollen, werden synthetisch hergestellt.

NFAT-Konsensussequenz	
Sense	5` GGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT 3`
Antisense	5` ACGCCTTCTGTATGAAACAGTTTTTCCT 3`

#### Durchführung:

- 1) In einem 1,5 mL Reaktionsgefäß je 10 µL des Sense-Oligonukleotids (10 pmol/µL) und Antisense-Oligonukleotids zusammen pipettieren und mischen
- 2) Ansatz für 5 min bei 95°C erhitzen und so lange stehen lassen, bis er auf RmT heruntergekühlt ist

#### Radioaktive Markierung und Reinigung der Sonde

Zur Herstellung einer Sonde werden die Oligonukleotide radioaktiv durch eine Endmarkierung mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-CTP markiert. Die Oligonukleotide besitzen 5'-Überhänge, so dass in einer Auffüllreaktion mit Klenowfragment das [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-CTP eingebaut werden kann.

#### Reagenzien:

Tab. 3.2.6: Komponenten für die radioaktive Markierung der Sonde

(-dCTP)-Nukleotidmix (10 mM/dNTP)	2,5 µL (5 mM)
10x Klenowpuffer	2 µL (1x)
Oligonukleotid (1 pmol/µL)	1 µL
H <sub>2</sub> O	8,5 µL
Klenowfragment (300 U)	1 µL
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-CTP (110 TBq/mmol)	5 µL (2 MBq)

#### Durchführung:

- 1) Die in Tabelle 3.2.6 aufgeführten Komponenten zusammen pipettieren, mischen und kurz herunterzentrifugieren

- 2) Inkubation für 30 min bei 30°C in einem Thermomixer
- 3) Nach der Einbaureaktion erfolgt die Abtrennung der nicht eingebauten [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-CTP mittels QiaQuick Nucleotid Removal Kit
- 4) Zugabe von 200  $\mu$ L Puffer PN zum Sondenmix und mischen
- 5) Den gesamten Mix auf die Säule geben und 1 min bei 2000 g zentrifugieren
- 6) Zweimal mit 500  $\mu$ L Puffer PE (mit Ethanol) waschen und ebenfalls für 1 min bei 2000 g zentrifugieren
- 7) Eine letzte Zentrifugation bei 10000 g erfolgt für 1 min ohne Zugabe von Puffer
- 8) Die Sonde durch Zugabe von 100  $\mu$ L Wasser eluieren und 1 min bei RmT inkubieren
- 9) Die Säule auf ein beschriftetes 1,5 mL Reaktionsgefäß setzen und für 1 min bei 12000 g zentrifugieren

### 3.2.9.3 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

#### **Prinzip:**

Zum Nachweis der Protein-DNA-Komplexe werden die Kernextrakte in einem EMSA mit radioaktiv markiertem Oligonukleotid inkubiert. Die Protein-DNA-Komplexe werden dabei elektrophoretisch durch ein Polyacrylamidgel aufgetrennt und wandern langsamer durch das Gel als die kleineren, radioaktiv markierten Oligonukleotide, was als „Shift“ bezeichnet wird.

#### **Reagenzien:**

- 10x Bandshiftpuffer (100 mM Tris-HCl pH 7,4; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 M KCl; 50% (v/v) Glycerin; 100 mM DTT)
- dIdC (1  $\mu$ g/mL)
- NFAT-Sonde
- Aqua dest.

#### **Durchführung:**

- 1) Für die Bandshiftreaktion Reagenzien aus Tabelle 3.2.7 zusammenpipettieren:

Tab. 3.2.7: Reagenzien für die Bandshiftreaktion

10x Bandshiftpuffer	2 $\mu$ L
dIdC (1 $\mu$ g/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
Kernextrakt	20 $\mu$ g
NFAT-Sonde	5 $\mu$ L
Aqua dest. ad 20 $\mu$ L	x $\mu$ L



- 2) Inkubation des Ansatzes für 30 min bei RmT
- 3) Anschließend wird der Ansatz auf Eis gestellt

### 3.2.9.4 Nachweis der DNA-Bindeproteine mittels nativer Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Protein-DNA-Komplexe werden mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dabei bleiben im Gegensatz zur denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese die gebildeten Proteinkomplexe in ihrer Struktur erhalten.

Tab. 3.2.8: Reagenzien für ein Gel

10x TBE-Puffer	900 $\mu$ L
Glycerin	2,7 mL
AcrylBisamid (30%)	6 mL
Aqua dest.	53 mL
TEMED	58 $\mu$ L
APS (10%)	288 $\mu$ L

#### **Durchführung:**

- 1) Zusammenbau der Gelgießapparatur
- 2) Zusammenpipettieren der Reagenzien für ein Gel nach Tabelle 3.2.8
- 3) Einsetzen des Kammes und Auspolymerisieren des Geles für 1 h bei RmT
- 4) Die Gelkammern in die Gelelektrophoreseapparatur einspannen und die Pufferkammern mit 0,25x TBE befüllen
- 5) Kamm herausziehen und die Taschen gut mit Puffer durchspülen
- 6) Die Vorelektrophorese läuft für 20-30 min bei 200 V
- 7) Die Bandshiftproben mit 6  $\mu$ L Ladepuffer versetzen und mit Hilfe von 200  $\mu$ L Gel Tip Spitzen in die Taschen pipettieren
- 8) Die Gelelektrophorese wird für ca. 3 h bei 200 V durchgeführt

## Geltrocknung und Entwicklung

### **Durchführung:**

- 1) Die Gelkammer aus der Apparatur nehmen und die obere Glasplatte und den Abstandhalter entfernen
- 2) Auf das Gel ein Filterpapier auflegen, so dass das Gel mit Filterpapier von der Glasplatte abgelöst und mit Haushaltsfolie auf der Gelseite luftblasenfrei abgedeckt werden kann
- 3) Das Gel in die Trocknungsapparatur einlegen und bei 70°C und eingestellter Pumpe für 2 h unter Vakuum trocknen
- 4) Das getrocknete Gel auf dem Raster der Filmkassette mit Klebeband fixieren
- 5) Einen Phosphorscreen mit der weißen Seite zum Licht auf dem Leuchttisch 5 min lang löschen
- 6) Anschließend den Phosphorscreen mit der weißen Seite auf das Gel legen
- 7) Gekassette schließen und über Nacht belichten lassen
- 8) Zügiges Einlegen des Phosphorscreens mit der weißen Seite nach oben in den Phosphoimager
- 9) Die Auswertung des Phosphoscreens erfolgt mit der Software Quantity one/Personal FX

### 3.2.10 [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Proliferationsassay

#### **Prinzip:**

Die Proliferation von Zellen kann mit Hilfe von radioaktiv markiertem [<sup>3</sup>H]-Thymidin bestimmt werden. Dafür werden die Zellen zunächst mit Mitogenen stimuliert, welche für T-Zellen spezifisch sind. 16 Stunden vor Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen mit [<sup>3</sup>H]-Thymidin gepulst, welches daraufhin in die DNA eingebaut wird. Zur Auswertung werden die Zellen lysiert und die DNA auf Filterpapier angereichert, getrocknet und in Szintillationsflüssigkeit aufgenommen. Ein Szintillationszähler erfasst die  $\beta$ -Strahlung des [<sup>3</sup>H]-Zerfalls als Maß für das eingebaute [<sup>3</sup>H]-Thymidin und damit für die DNA-Synthese. Das Ausmaß der Stimulation durch die Mitogene wird als counts per minute (CPM) angegeben.

#### **Reagenzien:**

- RPMI-Medium (10% FCS; 100 U/mL Penicillin; 100  $\mu$ g/mL Streptomycin und 2 mM L-Glutamin)
- [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Lösung
- Szintillationsflüssigkeit Lipoluma
- Aqua dest.
- Ethanol 70% (v/v)
- ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O (1 mM)

- Pyrithion (5 mM)

Das [<sup>3</sup>H]-Thymidin wird immer frisch 1:20 mit Kulturmedium verdünnt, so dass die Lösung 1850 kBq/mL enthält. Von dieser Lösung wird zu jeder Probe in eine 96-Loch Platte 10 µL gegeben (18,5 kBq/Vertiefung).

**Durchführung:**

- 1) Verteilung von Jurkat Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen/mL) zu je 100 µL auf eine 96-Loch Platte
- 2) Inkubation der Zellen für 10 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> nach Zugabe von Zink (7,5 µM)/Pyr (10 µM)
- 3) Anschließend 10 µL der verdünnten [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Lösung in jede Vertiefung pipettieren
- 4) Inkubation für 16 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>
- 5) Inkubation stoppen (wenn die Platte nicht sofort ausgewertet wird, bei -20°C einfrieren)
- 6) Mit Hilfe des Zellerntegerätes die Zellen lysieren und die DNA auf Filterpapier anreichern
- 7) 5x mit Aqua dest. und 1x mit Ethanol waschen
- 8) Überführen der Filterpapierscheibchen in Szintillationsröhrchen und Trocknen für ca. 5 min im Brutschrank bei 70°C
- 9) Zum Auflösen des Filterpapiers Zugabe von 3 mL Lipoluma in jedes Röhrchen, welche anschließend verschlossen werden
- 10) Messung der CPM im β-Counter

### 3.2.11 Messung der zellulären cAMP-Konzentration

**Prinzip:**

Die Messung der cAMP-Konzentration wurde in Jurkat Zellen mit Hilfe des Lance® cAMP 384 Kits der Firma PerkinElmer durchgeführt. Diese Methode nutzt den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) um die Bindung von cAMP an spezifische Antikörper zu detektieren. Die cAMP-spezifischen Antikörper sind mit Alexa Fluor 647 gekoppelt. Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, dass natürliches cAMP aus der Probe sowie Europium-W-8044-Chelat-markiertes cAMP aus dem Detektionsmix um die limitierten Bindungsstellen des Alexa Fluor 647-markierten Antikörpers konkurrieren. Bindet markiertes cAMP an den Antikörper, befinden sich Europium und Alexa Fluor 647 in räumlicher Nähe. Wird dann das Europium-W8044-Chelat bei einer Wellenlänge von 340 nm angeregt, wird die freiwerdende Energie auf das Alexa Fluor 647 übertragen. Dieses emittiert dadurch Licht einer Wellenlänge von 665 nm. Ist unmarkiertes cAMP der Probe an den Antikörper gebunden, findet kein FRET statt. Die Fluoreszenz der Probe bei 665 nm ist also

umgekehrt proportional zur cAMP-Konzentration. Mit Hilfe einer cAMP-Standardkurve kann die cAMP-Konzentration berechnet werden.

**Reagenzien:**

- RPMI-Medium
- $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  (1 mM)
- Pyrithion (5 mM)
- Forskolin (2,5 mM)
- Reaktionspuffer (PBS; 0,1% (w/v) BSA; 0,5 mM IBMX) auf Eis
- cAMP-Antikörper, gekoppelt an Alexa Fluor 647 (1:100 in Reaktionspuffer)
- cAMP-Standard in Serienverdünnung (gemäß Kit)
- Detektionsmix (gemäß Kit)

**Durchführung:**

Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit einigen Modifikationen und wurde von Svenja Dubben vorgenommen.

- 1) 2 mL Jurkat Zellen ( $2,5 \times 10^6$  Zellen/mL) in einem 2 mL Reaktionsgefäß bei 37°C unter Schütteln im Thermoblock mit den entsprechenden Reagenzien für 1 h inkubieren
- 2) Zentrifugation bei 1000 g und RmT für 1 min
- 3) Überstand vollständig abnehmen und das Pellet in 500  $\mu\text{L}$  eiskaltem Reaktionspuffer resuspendieren
- 4) In eine 384-Lochmikrotiterplatte 6  $\mu\text{L}$  verdünnter cAMP-Antikörper vorlegen und dann 6  $\mu\text{L}$  Zellsuspension bzw. cAMP-Standard zugeben
- 5) 12  $\mu\text{L}$  Detektionsmix in die Vertiefungen der Platte pipettieren
- 6) um einen Effekt von Zink/Pyrithion auf die Fluoreszenz des Alexa Fluors auszuschließen, 6  $\mu\text{L}$  Antikörperlösung + 6  $\mu\text{L}$  Standard + 12  $\mu\text{L}$  Detektionsmix mit den Substanzen versetzen und gemeinsam mit den Proben messen
- 7) Platte mit Folie abdecken und 10 sec auf einem Plattenrüttler mit 750 rpm schütteln
- 8) Nach 1 h Inkubation im Dunkeln bei RmT erfolgt die Detektion der Fluoreszenz mittels Fluoreszenzplattenlesers (Tab. 3.2.9):

Tab. 3.2.9: Einstellungen für die Detektion der Fluoreszenz am Fluoreszenzplattenleser

Anregungswellenlänge	340 nm
Emissionswellenlänge	670 nm (FRET-Signal) 612 nm (Korrektur)
Verzögerungszeit	50 $\mu$ s
Integrationszeit	200 $\mu$ s
Anzahl der Blitze	50/Sekunde

- 9) Die cAMP-Konzentration mit Hilfe der cAMP-Standardkurve quantifizieren. Vorher eine Quenchkorrektur nach Angaben des Herstellers durchführen

### 3.2.12 Messung der zellulären cGMP-Konzentration

#### **Prinzip:**

Die cGMP-Konzentration wird mit einem Enzymimmunoassay der Firma Cayman Chemical quantifiziert. Der Assay basiert auf der konkurrierenden Bindung zwischen freiem cGMP der Probe und Acetylcholinesterase-konjugiertem cGMP an anti-cGMP-Antikörper. Der entstandene Komplex bindet dann an Antikörper auf der Plattenoberfläche, die gegen den anti-cGMP-Antikörper gerichtet sind. Zugegebenes Ellman's Reagenz wird in einer enzymatischen Reaktion der Acetylcholinesterase und einer darauf folgenden chemischen Reaktion zu einem gelben Farbstoff umgesetzt. Dieser absorbiert bei 412 nm. Die Intensität der Farbe ist proportional zur Menge des Acetylcholinesterase-konjugiertem cGMPs und damit umgekehrt proportional zur Menge des freien cGMPs. Mit Hilfe einer cGMP-Standardkurve kann die cGMP-Konzentration berechnet werden.

#### **Reagenzien:**

- Reagenzien des cGMP-Kit
- EDTA (30 mM)
- $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  (1 mM)
- Pyridithion (5 mM)
- IBMX (250 mM)

#### **Durchführung:**

- 1) Jurkat Zellen zu je 2 mL ( $2,5 \times 10^6$  Zellen/mL) in eine 12-Loch Platte überführen
- 2) Zellen für 1 h mit den entsprechenden Reagenzien stimulieren und bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubieren

- 3) Die Ansätze in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführen und bei 3000 g und 4°C für 5 min zentrifugieren
- 4) Nach Abnahme des Überstandes das Pellet in 200 µL EDTA resuspendieren und bei 95°C für 5 min erhitzen
- 5) Danach Zugabe von 800 µL Ethanol absolut
- 6) Die Ansätze auf dem Vortexer für 1 min homogenisieren und anschließend für 30 min auf Eis inkubieren
- 7) Nach einer Zentrifugation bei 3000 g und 4°C für 10 min, Überstand in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführen und bei 45°C für 2 h in der Speed Vac trocknen
- 8) Nach der Evaporation die Proben in 90 µL Probenpuffer des Herstellers resuspendieren
- 9) Zur Erhöhung der Nachweisgrenze werden die Proben acetyliert. Dafür wird der 90 µL Ansatz mit 18 µL KOH (4 M) und 4,5 µL Essigsäureanhydrid versetzt
- 10) Nach exakt 15 sec vortexen, 4,5 µL KOH (4 M) zugeben und erneut mischen
- 11) Die Proben werden entweder direkt für den Assay verwendet oder bei -80°C gelagert
- 12) Die Durchführung des Assays folgt nach Anleitung des Herstellers

### 3.2.13 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

#### *Prinzip:*

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren für verschiedene Substanzen (Antigene) in einer Probe, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Dabei werden spezifische Antikörper verwendet, die an das nachzuweisende Antigen in der Probe binden.

Bei dem Sandwich ELISA werden mindestens zwei Antikörper genutzt, die beide hoch spezifisch, aber an unterschiedlicher Stelle an das nachzuweisende Antigen z.B. sezerniertes IL-2 binden. Der erste Antikörper wird an eine feste Phase, meistens eine 96-Loch Platte, gekoppelt (capture-antibody). Nach dem Blocken der Platte kann durch Zugabe der zu untersuchenden Probe das nachzuweisende Antigen an den immobilisierten Antikörper binden. Nach einem Waschschrift zur Entfernung von überschüssigem Antigen erfolgt die Zugabe des zweiten Antikörpers (detection-antibody), der das Antigen an einer anderen Stelle spezifisch erkennt und bindet. Dieser Antikörper ist für die spätere Detektion an ein Enzym wie z.B. die Meerrettichperoxidase (HRP) gebunden, welches durch Zugabe einer Substratlösung die Farbreaktion katalysiert.

Die Extinktion wird photometrisch gegen einen Leerwert bestimmt und ist z.B. der Interleukin-Konzentration direkt proportional. Für die Bestimmung der IL-2 und IFN- $\gamma$  Sekretion wurden die ELISA-Komponenten-Sets der Firma BD Biosciences/Pharmingen verwendet.

**Reagenzien und Durchführung:**

Die Beschichtung der Mikrotiterplatten und die jeweiligen Durchführungen erfolgen nach Anleitung der Hersteller.

**3.2.14 Proteinbestimmung****Prinzip:**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird der Mikro-Protein-Assay nach Bradford verwendet. Dabei bindet der Säurefarbstoff Coomassie-Brilliantblau an vorhandene Proteine und zwar primär an basische und aromatische Aminosäure-Reste. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes verschiebt sich in Gegenwart von Proteinen im sauren Milieu von 465 nm zu 595 nm.

Für die Messung wird eine Standardreihe mit BSA angesetzt, deren Variationskoeffizient kleiner als 10% sein muss.

**Reagenzien:**

- Puffer C (siehe Abschnitt 3.2.9)
- BSA-Stammlösung (1 mg/mL gelöst in Puffer C)
- Bradford-Reagenz
- Aqua Spüllösung

**Durchführung:**

- 1) Die Standardreihe umfasst folgende Konzentrationen (Tab. 3.2.10):

Tab. 3.2.10: Standardreihe des MikroBradford-Assays

KONZENTRATION	AQUA SPÜLLÖSUNG	STAMMLÖSUNG
1 µg/mL	799 µL	1 µL
2,5 µg/mL	797,5 µL	2,5 µL
5 µg/mL	795 µL	5 µL
10 µg/mL	790 µL	10 µL
15 µg/mL	785 µL	15 µL
25 µg/mL	775 µL	25 µL

- 2) Nach dem Pipettieren der Standardreihe, Zugabe von 200 µL Bradford-Reagenz zu den jeweiligen Ansätzen
- 3) 5 min Inkubation der Ansätze bis zur Messung
- 4) 1:200 Verdünnung der jeweiligen Proben. Danach erfolgt ebenfalls wie bei der Standardreihe eine Inkubation von 5 Minuten bis zur Messung

### 3.2.15 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

#### **Prinzip:**

Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese werden ein Sammel- und ein Trenngel mit jeweils unterschiedlichen Puffersystemen verwendet. Das Sammelgel dient dabei der Aufkonzentrierung der Proteine, die dann im Trenngel entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden.

Die Behandlung der Proteine mit SDS (Natriumdodecylsulfat) führt zur Auflösung der Quartär-, Tertiär- und teilweise der Sekundärstruktur, so dass lang gestreckte Protein/SDS-Komplexe entstehen, die durch das anionische Detergenz SDS eine negative Nettoladung tragen. Durch diese negative Gesamtladung des jeweiligen Proteins ist es möglich, eine Auftrennung in Abhängigkeit von dem jeweiligen Molekulargewicht zu erzielen. Durch die Arbeit unter reduzierenden Bedingungen z. B. durch die Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol werden zusätzlich die Disulfidbrücken der Proteine gespalten, was zur weiteren Proteinentfaltung führt. Außerdem fördert das Erhitzen der Proteine bei 95°C die Auflösung der Proteinstruktur.

#### **Reagenzien:**

- Probenpuffer (H<sub>2</sub>O dest.; 0,5 M TrisHCl pH 6,8; 26,6% Glycerin; 10% SDS; 100 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 0,5% Bromphenolblau)
- TrisHCl-Puffer (1,5 M, pH 8,8)
- TrisHCl-Puffer (0,5 M, pH 6,8)
- 5x Elektrophoresepuffer (0,12 M Tris Base; 0,96 M Glycin; 30 ml 10% SDS; pH 8,3)
- Acrylbisamid (30%)
- APS (10%)
- TEMED
- Aqua Spüllösung
- Biotinylierte Proteinleiter

#### **Durchführung:**

- 1) Die Glasplatten mit Ethanol säubern und in die Gießhalterung einsetzen
- 2) Zu Beginn wird das Gel gegossen, welches eine Geldicke von 1,5 mm aufweist und aus einem 10%igen Trenngel und einem 4%igen Sammelgel besteht (Tab: 3.2.11):



Tab. 3.2.11: Zusammensetzung für ein diskontinuierliches SDS-Gel:

SUBSTANZEN	10% TRENNGEL	SUBSTANZEN	4% SAMMELGEL
H <sub>2</sub> O	3,66mL	H <sub>2</sub> O	2,08 mL
1,5 M TrisHCl pH 8,8	2,34 mL	0,5 M TrisHCl pH 6,8	910 µL
AcrylBisamid 30% Stock	3 mL	AcrylBisamid 30% Stock	467 µL
10% APS (frisch angesetzt)	90 µL	10% APS (frisch angesetzt)	35 µL
TEMED	20 µL	TEMED	7,8 µL
Gesamtvolumen	9 mL	Gesamtvolumen	3,5 mL

Dabei wird das gegossene Trenngel mit H<sub>2</sub>O überschichtet und benötigt dann ca. 30 min für die Auspolymerisierung.

Anschließend wird das Wasser entfernt und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Nach dem Einsetzen der Kämme (entweder 10 oder 15 Kammvertiefungen) erfolgt erneut eine ca. 30-minütige Auspolymerisierung.

- 3) Überführen des Gels in die Gelkammer
- 4) Anschließend die Proben wie die in Probenpuffer 1:10 verdünnte biotinylierte Proteinleiter 5 Minuten bei 95°C inkubieren
- 5) Von den Ansätzen und der biotinylierten Proteinleiter 10 µL in die jeweiligen Kammvertiefungen auftragen
- 6) Die Elektrophoresekammer mit 1x Elektrophoresepuffer füllen
- 7) Durchführung der Elektrophorese bei 150 V
- 8) Das Gel wird für einen anschließenden Western Blot (3.2.16) genutzt

### 3.2.16 Western Blot

#### **Prinzip:**

Beim Western Blot werden in einer SDS-PAGE aufgetrennte Proteingemische aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld (Tank-Blot-System) auf eine Membran aus Nitrocellulose transferiert.

Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Bei diesem Vorgang wird das an die Proteine angelagerte SDS ausgewaschen, so dass die Proteine renaturieren und teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wiederherstellen können.

Die Proteine können dadurch in einem nächsten Schritt durch Epitop-spezifische Antikörper erkannt werden, so dass zum Beispiel in Abhängigkeit vom jeweiligen Phosphorylierungsgrad ein Nachweis möglich ist.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Nitrocellulose zu vermeiden, erfolgt ein Abblocken möglicher Bindungsstellen mit Proteinen (entweder mit BSA oder Magermilchpulver), welche durch die Antikörper nicht erkannt werden. Um die hoch affine Bindung der Antikörper an die Proteinepitope nachweisen zu können, werden Spezies-spezifische Sekundärantikörper verwendet, welche an HRP gekoppelt sind. HRP kann dann verschiedene Substrate wie zum Beispiel die LumiGlo-Lösung umsetzen, wodurch ein Intermediat entsteht, welches durch Lichtemission detektiert werden kann.

**Reagenzien:**

- Transferpuffer (25 mM Tris Base; 0,2 M Glycin; 20% Methanol; pH 8,5)
- Magermilchpulver
- Aqua Spüllösung
- 10x TBS (Tris Bufferd Saline; 0,2 M Tris Base; 2,28 M NaCl; pH mit HCl auf 7,6 einstellen)
- Waschpuffer TBS-T (1x TBS; 0,1% Tween-20)
- LumiGLO-Substratreagenz (4,5 mL Aqua Spüllösung; 250 µL Substrat A; 250 µL Substrat B)
- Primäre Antikörper-Lösung in 10 mL TBS-T und 5% Magermilchpulver
- Sekundäre Antikörper-Lösung in 10 mL TBS-T und 5% Magermilchpulver
- HRP-konjugierter-anti-Biotin-Antikörper

**Materialien:**

- Nitrocellulose Membran
- Gel-Blotting-Papier
- Schwammkissen

**Durchführung:**

- 1) Die Nitrocellulose Membran und vier Gel-Blotting-Papiere auf Gelgröße zurecht schneiden und in Transferpuffer äquilibrieren
- 2) Anschließend das Blot-Sandwich zusammensetzen, indem auf ein Schwammkissen und ein Gel-Blotting-Papier das SDS-Gel (3.2.15) platziert wird. Auf das Gel wird nun die Membran gelegt, welche dann wiederum mit einem Gel-Blotting-Papier und einem Schwammkissen bedeckt wird

- 3) Dieses Blot-Sandwich in das Blot-Modul einsetzen, die Kühleinheit und einen Rührfisch zufügen und den Transferpuffer einfüllen
- 4) Das Blotten erfolgt bei 100 V für 1 h unter Rühren
- 5) Blocken der Nitrocellulose Membran in 25 mL TBS-T mit 5% Magermilchpulver für 1 h bei RmT
- 6) Danach die Membran über Nacht bei 4°C mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubieren, welcher in 10 mL TBS-T mit 5% Magermilchpulver 1:1000 verdünnt wird
- 7) Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS-T erfolgt die Inkubation mit dem jeweiligen Sekundärantikörper 1 h bei RT. Der Sekundärantikörper wird dabei in 10 mL TBS-T mit 5% Magermilchpulver 1:2000 und der zusätzlich enthaltene HRP-konjugierte-anti-Biotin-Antikörper 1:1000 verdünnt
- 8) Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TBS-T wird die Membran für die anschließende Signaldetektion 1 min mit der frisch angesetzten Substratlösung LumiGLO inkubiert
- 9) Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgt mit einem LAS-3000 bei steigender Belichtungszeit im Intervall von 10 sec

### **3.2.17 FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)**

#### ***Prinzip:***

Mit einem Durchflusszytometer können Zellen anhand ihrer durch Fluoreszenzmoleküle markierten Zelloberflächenproteine oder intrazellulären Moleküle identifiziert und charakterisiert werden.

Die Zellen werden in einem laminaren Probenstrom einzeln an dem Laser vorbeigeleitet, wobei es zu einer Lichtstreuung kommt. Sobald Fluorochrome an eine Zelle gebunden oder intrazellulär lokalisiert sind, werden sie durch den Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt. Photodetektoren messen dann sowohl das emittierte Licht als auch das gestreute Licht, welches Informationen über die Größe und die Granularität der Zellen liefert. Die Größe jeder Zelle wird über die Vorwärtsstreuung (FSC) bestimmt. Diese ist in direkter Linie des ausgesandten Lichtes angeordnet und detektiert das durch die Zelle hervorgerufene Beugungsmuster des Lichtes, welches von der Größe der Zelle abhängig ist.

Die Granularität wird über das seitliche Streulicht (SSC) gemessen. Dieses misst die Intensität des um 90° gestreuten Lichtes, welches über Linsen gesammelt und über Spiegel an den Detektor weiter gegeben wird. Je mehr Granula in der Zelle vorhanden sind, desto stärker wird das Licht gestreut.

Sind an die Zellen Fluorochrome gebunden, z.B. in Form von Antikörpern oder von Fusionsproteinen, oder enthalten die Zellen intrazelluläre Fluorochrome, wird das von ihnen

emittierte Licht über Spiegel nach Wellenlängen getrennt und von einem Detektor die Intensität gemessen. Dadurch ermöglicht die gemessene Fluoreszenz Aussagen über die Bindung von Antikörpern oder der jeweiligen Fusionsproteine und damit über die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle auf der Zelle.

Intrazelluläre Fluorochrome können für eine Proliferationskontrolle oder für die Bestimmung lebender und toter Zellen in einer Probe eingesetzt werden.

Da auch unmarkierte Zellen eine Autofluoreszenz besitzen und die gegen das gewünschte Antigen spezifischen Antikörper geringfügig auch unspezifisch über Fc-Rezeptoren gebunden werden, werden sog. Isotypkontrollen verwendet. Dabei handelt es sich um einen Antikörper, der den gleichen Isotyp aufweist wie der gegen das gewünschte Antigen spezifische Antikörper, und in gleicher Weise fluoreszenzmarkiert ist. Da die Isotypkontrolle über eine spezifische Bindungsstelle verfügt, die in der Probe nicht vorkommt, kann sie nur unspezifisch über den Fc-Anteil gebunden werden. Die in einem solchen Ansatz gemessene Fluoreszenzintensität kann dann bei der Auswertung der eigentlichen Proben berücksichtigt werden.

Für die gleichzeitige Untersuchung verschiedener Fluoreszenzen werden Multicolor durchflusszytometrische Analysen durchgeführt.

### 3.2.17.1 Messung von Oberflächenmarkern im FACS

#### **Prinzip:**

Der Nachweis von Oberflächenproteinen erfolgt mit Hilfe von Antikörpern, die mit Fluoreszeinisothiozyanat (FITC, Anregungswellenlänge 488 nm, Emissionsmaximum 519 nm) markiert sind.

Über den durchflusszytometrischen Nachweis des T-Zell-spezifischen Oberflächenmoleküls CD3, welches Teil des Signalkomplexes des TCR ist, ist es möglich, den Anteil von T-Zellen in PBMC bzw. den Reinheitsgrad angereicherter T-Zellen zu bestimmen. Dabei ist es notwendig eine Isotypkontrolle mitzuführen.

CD45 ist ein genereller Leukocyten-Marker und eine membranständige Tyrosinphosphatase, die in der Signaltransduktion von T-Zellen eine wichtige Rolle spielt.

Exemplarisch ist hier die Durchführung zur Messung der Expression von CD3 beschrieben. Die Färbung von CD45 erfolgt nach dem gleichen Prinzip.

#### **Reagenzien:**

- PBS (1% FCS)

- Anti-human-CD3-FITC konjugiert
- Isotypkontrolle IgG<sub>1</sub> κ-FITC konjugiert

**Durchführung:**

- 1) Einstellen der angereicherten T-Zellen auf  $1 \times 10^6$  Zellen/mL und Verteilung zu jeweils 500  $\mu$ L auf zwei FACS-Röhrchen
- 2) Zentrifugation bei 300 g und RmT für 10 min und Aufnahme der Pellets in jeweils 100  $\mu$ L PBS (1% FCS)
- 3) 1:5 Verdünnung des Antikörpers für die Isotypkontrolle mit PBS (1% FCS)
- 4) Danach jeweils 20  $\mu$ L der verdünnten Isotypkontrolle oder 20  $\mu$ L des anti-CD3 Antikörpers in die T-Zellansätze pipettieren
- 5) Inkubation für 20 min bei RmT im Dunkeln
- 6) Zugabe von 2 mL PBS (1% FCS) zu den Proben und Zentrifugation bei 300 g und RmT für 10 min
- 7) Aufnahme der Pellets in jeweils 500  $\mu$ L PBS (1% FCS)
- 8) Messung der Fluoreszenz mit dem FACS

3.2.17.2 Toxizitätstest mit Propidiumiodid

**Prinzip:**

Propidiumiodid (PI) interkaliert in doppelsträngige DNA und färbt tote Zellen, während es intakte Plasmamembranen lebender Zellen nicht passieren kann. Es fluoresziert bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm mit einem Emissionsmaximum von 635 nm und kann im FACS gemessen werden. Um den Einfluss der verschiedenen Substanzen auf die Vitalität von Jurkat Zellen, PBMC und primären T-Zellen zu überprüfen, wurden alle verwendeten Substanzen mit Hilfe des Toxizitätstests untersucht.

**Reagenzien:**

- Propidiumiodid (1 mg/mL)
- PBS

**Durchführung:**

- 1) Einstellen der jeweiligen Zellen auf  $1 \times 10^6$  Zellen/mL und Überführung zu je 1 mL in eine 24-Loch Platte
- 2) Zugabe der einzelnen Substanzen und Inkubation für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>

- 3) Überführen der Ansätze in FACS-Röhrchen und Zentrifugation bei 300 g und RmT für 10 min
- 4) Aufnahme der Pellets in 1 mL PBS
- 5) Nach Zugabe von 10 µg/mL PI Inkubation der Zellen für 10 min bei 4°C
- 6) Zentrifugation bei 300 g und RmT für 10 min
- 7) Aufnahme der Pellets in 500 µL PBS
- 8) Messung der Fluoreszenz am FACS

### 3.2.18 Messung von intrazellulärem Zink und Calcium

#### **Prinzip:**

Mit Hilfe spezifischer Fluoreszenzsonden ist es möglich, sowohl die intrazelluläre Konzentration freier Ionen zu untersuchen als auch deren Veränderung nach Stimulation der Zellen. Durch Einsatz der Fluoreszenzsonde FluoZin-3 kann eine quantitative Freisetzung von Zinkionen mit Hilfe des Fluoreszenzplattenlesers nachgewiesen werden. FluoZin-3 ist ein fluoreszenter Chelator für zweiwertige Metallionen, der nach Bindung des jeweiligen Ions seine Fluoreszenzeigenschaft ändert. Daraus kann anschließend auf eine Veränderung des intrazellulär verfügbaren Zinks geschlossen werden.

FluoZin-3 liegt als Acetoxymethyl Ester vor und kann frei durch die Plasmamembran diffundieren. Innerhalb der Zellen wird die Estergruppe durch unspezifische zelluläre Esterasen abgespalten. Dabei entstehen an der Fluoreszenzsonde freie Carboxylgruppen, woraufhin die Sonde nicht mehr in der Lage ist, die Plasmamembran zu passieren. Nach Zink-Bindung emittiert FluoZin-3 bei einer Anregungswellenlänge von 494 nm Licht mit dem Emissionsmaximum von 516 nm. Mittels Inkubation mit dem Zink-Chelator TPEN (50 µM) wird die Autofluoreszenz der Zellen bestimmt. Die Fluoreszenz bei vollständiger Sättigung der Sonde wird durch Inkubation der Zellen mit 100 µM Zink und 50 µM Pyrithion ermittelt.

Die Fluoreszenzsonde Fluo-4 ermöglicht eine Quantifizierung der intrazellulären Calciumkonzentration. Dabei wird mittels Inkubation mit dem Calcium-Chelator EGTA (5 mM) die Autofluoreszenz der Zellen bestimmt. Die Fluoreszenz bei vollständiger Sättigung der Sonde wird durch Inkubation der Zellen mit 5 µM Calcimycin ermittelt.

#### **Reagenzien:**

- FluoZin-3 AM (1 mM in DMSO)
- Fluo-4 AM (1 mM in DMSO)
- RPMI1640-Medium

- PBS
- Inkubationspuffer (5 mM Glucose; 1mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,3 mM CaCl<sub>2</sub>; 25 mM Hepes; 120 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 0,3 g BSA; pH 7,35)
- Messpuffer (Inkubationspuffer ohne BSA)
- ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O (1 mM)
- Pyrithion (5 mM)
- TPEN (500 μM)
- Calcimycin, A23187 (100 μM)
- EGTA (500 mM)
- PHA (100 μg/mL)
- Okt3 (1 μg/mL)
- PMA (1 μg/mL)

**Durchführung (alle Ansätze in Dreifachbestimmung):**

- 1) Einstellen der Jurkat Zellen auf 2x10<sup>6</sup> Zellen/mL mit Inkubationspuffer
- 2) Zugabe der jeweiligen Sonde (1 μM Endkonzentration)
- 3) Inkubation der Zellen für 30 min bei 37°C im Wasserbad unter Schütteln
- 4) Zentrifugation bei 300 g und RmT für 10 min und zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS
- 5) Pelletaufnahme in 1 mL Messpuffer und Verteilen der Zellen zu je 100 μL auf eine 96-Loch Mikrotiterplatte
- 6) Zur Bestimmung der Maximal- und der Autofluoreszenz zwei Ansätze wie in Tabelle 3.2.12 beschrieben behandeln und 10 min bei 37°C im Dunkeln inkubieren. Für die Calcium-Messung werden zusätzlich zwei Ansätze mit 2,5 μM TPEN und 7,5 μM Zn/10 μM Pyr vorinkubiert.

**Tab. 3.2.12: Fluoreszenzsonden zur Detektion von Zink (FluoZin-3) und Calcium (Fluo-4)**

	<b>FluoZin-3</b>	<b>Fluo-4</b>
Konzentration Sonde	1 μM	1 μM
Maximalfluoreszenz	100 μM ZnSO <sub>4</sub> 50 μM Pyrithion	5 μM Calcimycin, A23187
Autofluoreszenz	50 μM TPEN	5 mM EGTA
Anregungswellenlänge	485 nm	485 nm
Emissionswellenlänge	535 nm	535 nm

- 7) Messung der basalen Ionenkonzentration im vorgeheizten Fluoreszenzplattenleser (37°C) mit optimierter Z-Position. Anregungs- und Emissionswellenlänge sind Tabelle 3.2.12 zu entnehmen. Es werden fünf Messungen im Abstand von zwei Minuten (Zink) bzw. fünf Messungen im Abstand von einer Minute (Calcium) durchgeführt, wobei die 5. Messung als basale Ionenkonzentration in die Auswertung einbezogen wird
- 8) Im Anschluss an die Baselinemessung werden zur Stimulation der Zellen 10 µg/mL PHA, 100 ng/mL Okt3 und 25 ng/mL PMA in die entsprechenden Ansätze gegeben
- 9) Unter Beibehaltung der Einstellungen wird eine Kinetik mit 10 Messungen im Intervall von 2 min (Zink) bzw. 1 min (Calcium) durchgeführt

### 3.2.19 FluoZin-3A Messung

#### **Prinzip:**

FluoZin-3A ist die freie Säure des fluoreszenten Chelators FluoZin-3, welche freies Zink bindet. In dieser Arbeit wird die FluoZin-3A Messung verwendet um die Menge von freiem Zink in Zelllysaten nachzuweisen. Zur Berechnung der freien Zink-Konzentration, werden die minimale bzw. maximale Fluoreszenz mit 50 µM TPEN bzw. 100 µM Zink bestimmt.

#### **Reagenzien:**

- FluoZin-3A (1 mM in DMSO)
- ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O (1mM)
- TPEN (2 mM)

#### **Durchführung (alle Ansätze in Dreifachbestimmung):**

- 1) Jurkat Zellen auf 1x10<sup>6</sup>/mL einstellen und zur Herstellung von Zelllysaten sonifizieren (10 sec)
- 2) Zugabe von 1 µL FluoZin-3A zum Zelllysat (=1 µM FluoZin-3A) und Inkubation für 15 min bei 37°C
- 3) Anschließend jeweils 100 µL in eine 96-Loch Mikrotiterplatte pipettieren
- 4) Je nach Stimulationsansatz wird außerdem zugegeben:
  - Negativkontrolle: /
  - Unterschiedliche Zink-Konzentrationen
  - TPEN (50 µM)
  - Zink (100 µM)
- 5) Inkubation für fünf Minuten bei 37°C



- 6) Messung im Fluoreszenzplattenleser bei 485 nm Anregungs- und 535 nm Emissionswellenlänge

### **3.2.20 Statistische Auswertung**

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse basieren auf der Auswertung einer Reihe von Einzelergebnissen. Die Ergebnisse sind dabei als Mittelwerte (Anzahl der Einzelergebnisse  $n=x$ ) dargestellt und der Standardfehler der Mittelwerte ( $\pm$  SEM) ist angegeben.

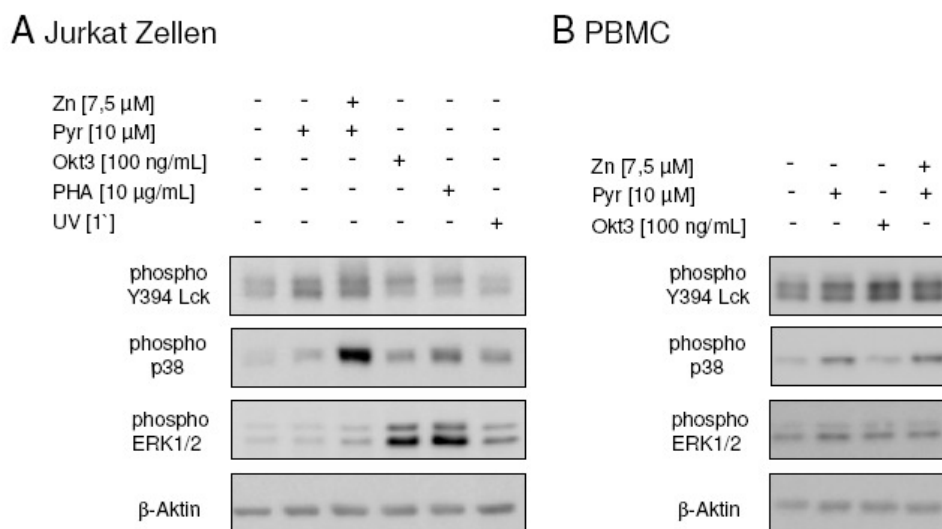
Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte bei Einfachvergleichen mit dem Students  $t$ -Test, wobei Signifikanzen mit dem Programm EXCEL berechnet und wie folgt dargestellt wurden: \*\* :  $p < 0,01$ ; \* :  $p < 0,05$ . Unter Nutzung der SPSS Software wurde bei Mehrfachvergleichen eine Auswertung mit Oneway ANOVA (Least Significant Difference (LSD), post hoc Test) durchgeführt. Dabei sind die Mittelwerte ohne signifikanten Unterschied durch gleiche Buchstaben gekennzeichnet. Unterschiedliche Buchstaben stehen für einen signifikanten Unterschied mit  $p < 0,05$ .

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Signaltransduktion nach TCR-Stimulation

#### 4.1.1 Stimulationsstudie der MAPK p38 und ERK1/2 und der Src-Kinase Lck

Zur Untersuchung der Stimulation wichtiger T-Zell-Kinasen wurden Jurkat Zellen und PBMC mit unterschiedlichen Stimulantien behandelt. Der Phosphorylierungsgrad der Kinasen wurde mittels Western Blot detektiert. Sowohl die Zelllinie als auch die primären Zellen zeigen eine von der Art des Stimulus abhängige, deutlich voneinander abweichende Aktivierung der einzelnen Kinasen. Der Antikörper gegen das phosphorylierte Tyrosin 394 erkennt aufgrund hoher Sequenzhomologien der einzelnen Kinasen an dieser Position die gesamte Src-Kinase-Familie. Aufgrund des Molekulargewichts wurden zwei Kinasen näher identifiziert: die obere Bande entspricht mit 59 kDa der Fyn-Kinase und die untere Bande mit 56 kDa der Lck. Während die Phosphorylierung der p38, ERK1/2 und der Fyn durch den anti-CD3 Antikörper Okt3 und PHA zunimmt, erfolgt durch die Inkubation mit Zink und dem Ionophor Pyrithion eine alleinige Aktivierung der p38 und der beiden Src-Kinasen, nicht aber der ERK1/2 (Abb. 4.1.1 A und B). Das Ionophor Pyrithion wurde verwendet, um einen Anstieg von freiem intrazellulärem Zink auszulösen. Es hat selbst nur einen geringen Einfluss auf die Phosphorylierung der Kinasen.



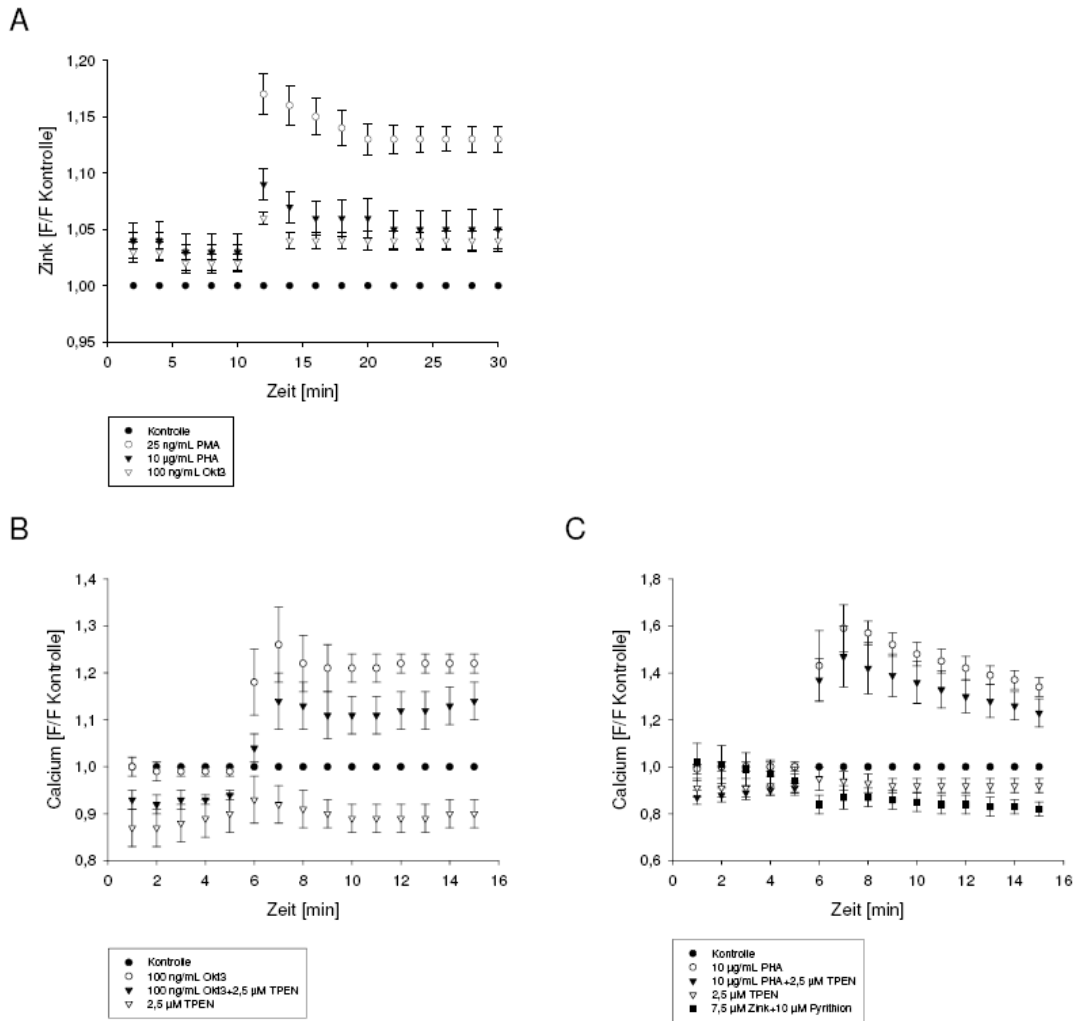
**Abb. 4.1.1: Stimulationsnachweis der MAPK p38 und ERK1/2 und der Src Kinasen in Jurkat Zellen und PBMC.** Jurkat Zellen (A) und PBMC (B) wurden mit unterschiedlichen Stimulantien für 10 min inkubiert. Die Phosphorylierung der Src-Kinasen, der p38 und der ERK1/2 wurde mittels Western Blot detektiert (A, B). Repräsentative Ergebnisse aus n=3 Experimenten (A, B).

Um die T-Zellen optimal zu stimulieren, wurden im Vorfeld verschiedene Stimulationsansätze ausgetestet, bei denen unter anderem die Konzentrationen der einzelnen Stimulantien variierten, über CD28 costimuliert wurde, zusätzlich ein Sekundärantikörper zur Verstärkung der Antwort eingesetzt wurde und die Inkubationszeiten variierten (Daten nicht dargestellt). Dabei wurden die dargestellten Ansätze unter Verwendung von 100 ng/mL Okt3 und 7,5  $\mu$ M Zink mit 10  $\mu$ M Pyrithion als optimal definiert. Alle Ansätze sind sowohl für die Zelllinie als auch für die PBMC nicht toxisch (siehe Anhang 2).

#### **4.1.2 Einfluss des intrazellulären Zinks auf die Signaltransduktion**

Nach Stimulation von T-Zellen wird intrazelluläres Calcium freigesetzt, welches daraufhin als Second Messenger in die Signaltransduktion eingreift. Ebenfalls konnte in Leukocyten eine Freisetzung von intrazellulärem Zink nachgewiesen werden (83). Um zu untersuchen, ob nach TCR-Stimulation intrazelluläres Zink freigesetzt wird, wurden Jurkat Zellen mit Okt3, PHA und PMA behandelt und mit Hilfe der spezifischen Fluoreszenzsonde FluoZin-3 der Anstieg an freiem Zink detektiert. Sowohl Okt3 als auch PMA und PHA induzieren einen Zink-Flux, der nach PMA-Stimulation am höchsten ausfällt (Abb. 4.1.2 A).

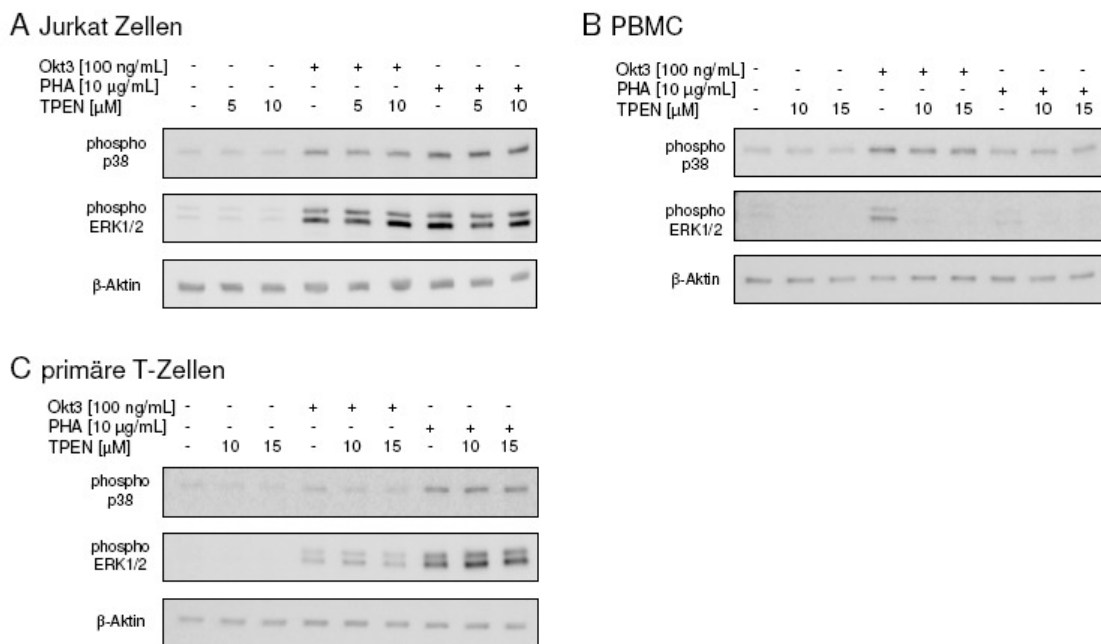
Sowohl nach Okt3- als auch nach PHA-Stimulation wird intrazellulär Calcium freigesetzt, wobei die Okt3-induzierte Freisetzung nach einem kurzen Abfall konstant gehalten wird (Abb. 4.1.2. B). Durch Inkubation mit dem Zink-Chelator TPEN wird das basale Calcium reduziert und auch der durch Okt3-induzierte Calcium-Flux ist verringert (Abb. 4.1.2 B). Der PHA-abhängige Calcium-Flux erreicht eine höhere Konzentration an freiem Calcium und wird ebenfalls durch TPEN reduziert (Abb. 4.1.2 C). Demnach könnte die Fluoreszenzsonde Fluo-4 auch Zink detektieren. Zur Überprüfung der Spezifität der Fluoreszenzsonde Fluo-4 für Calcium wurde in einem Ansatz parallel Zink/Pyrrhion gemessen (Abb. 4.1.2 C). Die detektierten Werte liegen noch unter den basalen Werten der Kontrolle und weisen in diesem Fall auf eine spezifische Detektion von Calcium hin.



**Abb. 4.1.2: Zink- und Calciumfreisetzung nach TCR-Stimulation.** Jurkat Zellen wurden mit FluoZin-3 (A) bzw. Fluo-4 (B, C) beladen. Die Messung der Baseline erfolgte nach 10 minütiger Inkubation mit TPEN und Zink/Pyrrithion (A) bzw. mit EGTA und Calcimycin (B, C) in einem Intervall von zwei Minuten (A) bzw. jede Minute (B, C) 10 min lang. Nach Zugabe von Okt3, PMA und PHA wurde die Freisetzung von intrazellulärem Zink und Calcium in einem Intervall von zwei Minuten (A) bzw. jede Minute (B, C) 15 Zyklen lang bestimmt (A, B, C). Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$ SEM aus  $n=3$  unabhängigen Experimenten (A, B, C).

Um zu untersuchen, ob das freigesetzte Zink nach Okt3- und PHA-Stimulation einen Einfluss auf die Signaltransduktion hat, wurden Jurkat Zellen, PBMC und primäre T-Zellen mit dem Zink Chelator TPEN vorinkubiert und anschließend mit Okt3 und PHA stimuliert. Der Phosphorylierungsgrad der MAPK p38 und ERK1/2 wurde mittels Western Blot detektiert. Obwohl die Phosphorylierung der Kinasen durch Stimulation mit Okt3 und PHA zunimmt, hat die Vorinkubation mit TPEN in Jurkat Zellen und primären T-Zellen keinen Einfluss auf die Aktivierung von p38 und ERK1/2 (Abb. 4.1.3 A und C). Die PBMC zeigen allerdings eine Signalabnahme nach TPEN-Inkubation für die MAPK ERK1/2 (Abb. 4.1.3 B).

Die Ergebnisse zeigen, dass das nach TCR-Stimulation freigesetzte Zink keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von p38 und ERK1/2 in T-Zellen hat. Um den Einfluss von Zink auf die Signaltransduktion TCR-nachgeschalteter Kinasen im Gegensatz zur TCR-Stimulation untersuchen zu können, liegt in den nachfolgenden Versuchen der Schwerpunkt auf der Stimulation der T-Zellen mit Zink/Pyrrhion.



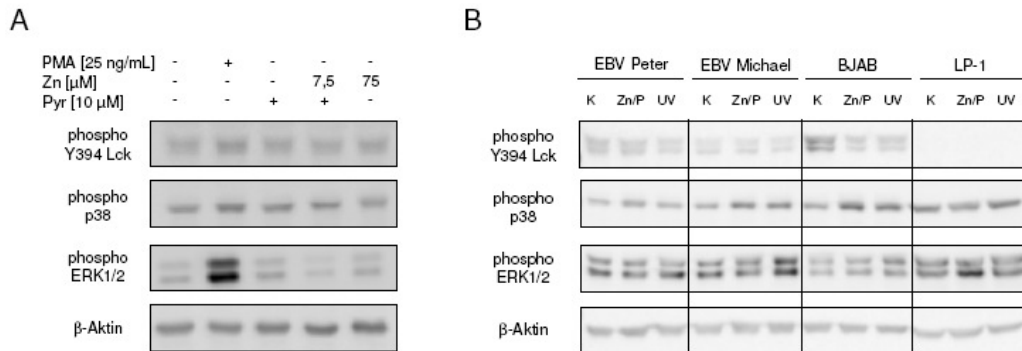
**Abb. 4.1.3: Einfluss von intrazellulärem Zink auf die Signaltransduktion.** Jurkat Zellen (A), PBMC (B) und primäre T-Zellen (C) wurden für 30 min mit den entsprechenden Konzentrationen TPEN vorinkubiert. Nach Stimulation mit Okt3 und PHA für 10 min wurden Zellysate hergestellt und die Phosphorylierung der MAPK mittels Western Blot detektiert. Repräsentative Ergebnisse aus n=3 Experimenten (A, B, C).

## 4.2 Signaltransduktion nach Stimulation mit Zink/Pyrrhion

### 4.2.1 Charakterisierung des beobachteten Zink-Effektes

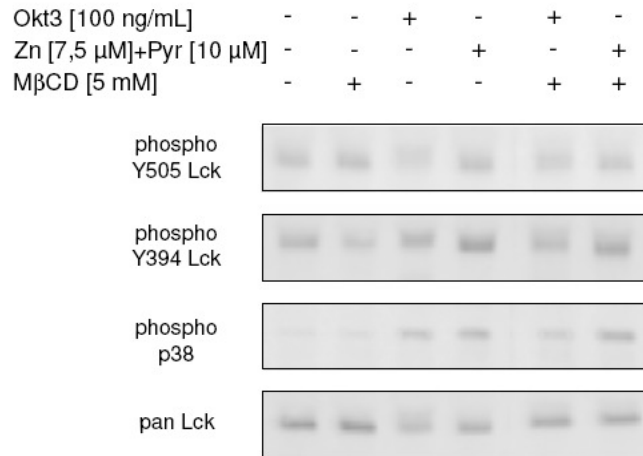
Um zu untersuchen, ob der beobachtete Zink-Effekt spezifisch ist für T-Zellen, wurde die B-Zelllinie Raji mit PMA und Zink/Pyrrhion bzw. Zink stimuliert und die Phosphorylierung der Lck und der MAPK mittels Western Blot detektiert. Obwohl nach PMA-Stimulation eine Zunahme der Phosphorylierung von Lck, p38 und ERK1/2 zu beobachten ist, führt die Inkubation der Zellen mit Zink/Pyrrhion bzw. Zink zu keiner Signalzunahme (Abb. 4.2.1 A). In einem weiteren Ansatz wurden

exemplarisch verschiedene B-Zelllinien hinsichtlich eines möglichen Zink-Effektes untersucht. Dabei zeigt die Lck der Zelllinien BJAB und LP-1 eine leichte Zunahme des Phosphorylierungssignals nach Zink/Pyrrhion-Stimulation, während die EBV transformierten B-Zellen keinen Effekt aufweisen (Abb. 4.2.1 B).



**Abb. 4.2.1 Zink-Effekt in B-Zellen.** Die B-Zelllinie Raji wurde mit PMA und Zink/Pyrrhion bzw. Zink für 10 min stimuliert. Die Phosphorylierung der aktivierenden Position (Y394) der Lck und der p38 und ERK1/2 wurde im Western Blot detektiert (**A**). EBV transformierte B-Zellen zweier unterschiedlicher Spender, sowie die B-Zelllinien BJAB und LP-1 wurden für 10 min mit Zink/Pyrrhion bzw. für 1 min mit UV-Licht (312 nm) stimuliert. Die Detektion der phosphorylierten Kinasen erfolgte im Western Blot (**B**). Repräsentatives Ergebnis aus n=3 Experimenten (**A**) bzw. exemplarisches Ergebnis (**B**).

Durch die Inkubation mit Zink/Pyrrhion werden die Kinasen Lck und p38 aktiviert. Zur Erklärung des beobachteten Effektes wurde zunächst ein möglicher Einfluss von Zink auf die Stabilisierung von Lipid Rafts und den darin enthaltenen Signalkomponenten untersucht. Dafür wurden Jurkat Zellen mit Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (M $\beta$ CD) vorinkubiert, welches die Struktur der Lipid Rafts durch Entfernen des Cholesterols zerstört, und anschließend mit Okt3 und Zink/Pyrrhion stimuliert. Detektiert wurden sowohl die Phosphorylierung des inhibierenden Tyrosins (Y505) als auch des aktivierenden Tyrosins (Y394) der Lck und die Phosphorylierung der p38 mittels Western Blot. Während die Signaltransduktion nach Okt3-Stimulation durch die M $\beta$ CD-Vorinkubation bei beiden Kinasen beeinträchtigt ist, wird der stimulierende Effekt von Zink/Pyrrhion auf die Phosphorylierung nicht beeinflusst (Abb. 4.2.2).

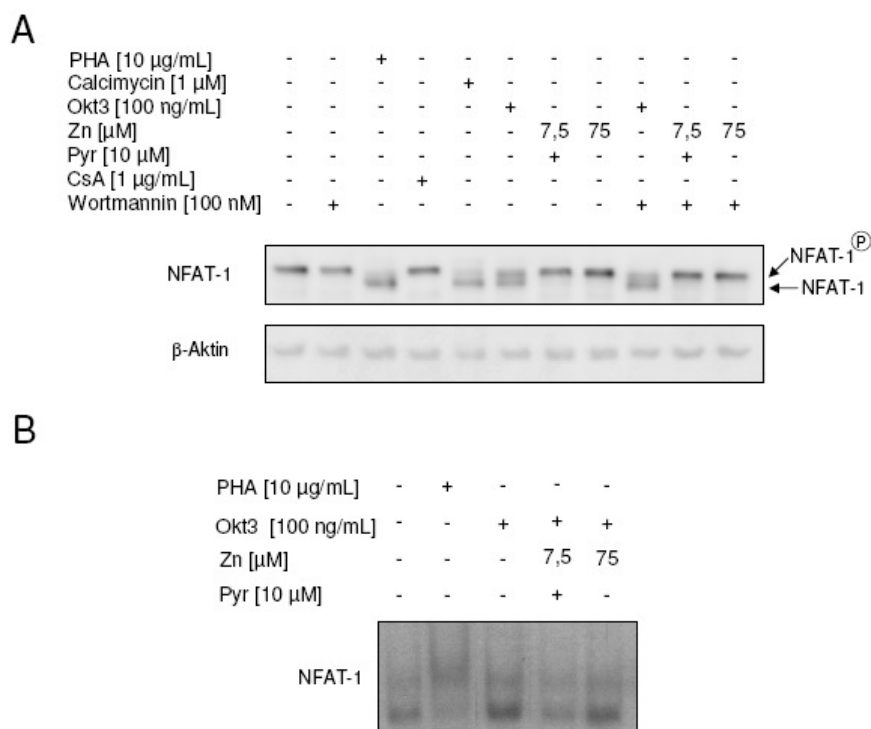


**Abb. 4.2.2: Einfluss von Zink auf die Lipid Raft-vermittelte Signaltransduktion.** Jurkat Zellen wurden 15 min mit MβCD vorinkubiert. Nach Stimulation mit Okt3 und Zink/Pyrrhion für 10 min wurde die Phosphorylierung der inhibierenden (Y505) und aktivierenden (Y394) Position der Lck und der p38 im Western Blot detektiert. Zur Kontrolle des Gesamtproteins wurde ein Antikörper gegen das Gesamtprotein der Lck eingesetzt. Repräsentatives Ergebnis aus n=3 Experimenten.

NFAT-1 kommt im Vergleich zu den anderen NFAT-Isoformen in T-Zellen am häufigsten vor und gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die in T-Zellen Calcium-abhängig an der Signalweiterleitung nach TCR-Stimulation beteiligt sind (103). Dabei liegt NFAT-1 im Ruhezustand phosphoryliert im Zytoplasma vor und ist inaktiv. Nach Stimulation findet mit Hilfe der Phosphatase Calcineurin die Dephosphorylierung und damit die Translokation in den Zellkern stattfindet. Zink inhibiert Calcineurin (114, 115) und könnte über den Signalweg Lck/PI3K/Akt ebenfalls die Kinase GSK3-β inhibieren, welche NFAT normalerweise phosphoryliert und damit inaktiviert. Beide Wege haben einen Einfluss auf den Grad der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors und damit auf die Aktivität. Um zu untersuchen, welchen Einfluss Zink auf die NFAT-Aktivierung hat, wurde im Western Blot die NFAT-1 Phosphorylierung von Jurkat Zellen detektiert. Um eine mögliche Beteiligung des Lck/PI3K/GSK3-β-Signalwegs auszuschließen, wurde zusätzlich mit dem PI3K-Inhibitor Wortmannin vorinkubiert. Als Positivkontrolle fungiert Calcimycin, welches zu einer Dephosphorylierung von NFAT-1 führt (Abb. 4.2.3 A, untere Bande im Western Blot). Als Negativkontrolle wurde Cyclosporin A eingesetzt, welches eine vollständige Phosphorylierung von NFAT-1 nach sich zieht (Abb. 4.2.3 A, obere Bande im Western Blot). Während PHA und Calcimycin zu einer vollständigen Dephosphorylierung und damit Aktivierung von NFAT-1 führen, liegen nach Okt3-Stimulation beide Aktivierungszustände vor; es gibt keine vollständige Aktivierung (Abb. 4.2.3 A). Der Einsatz von Zink/Pyrrhion bzw. Zink zeigt vergleichbar zur Negativkontrolle eine phosphorylierte, inaktive NFAT-1 Form. Die Verwendung von Wortmannin hat weder nach Okt3-

noch nach Zink/Pyrrhion- bzw. Zink-Stimulation einen Einfluss auf den Aktivierungsgrad (Abb. 4.2.3 A).

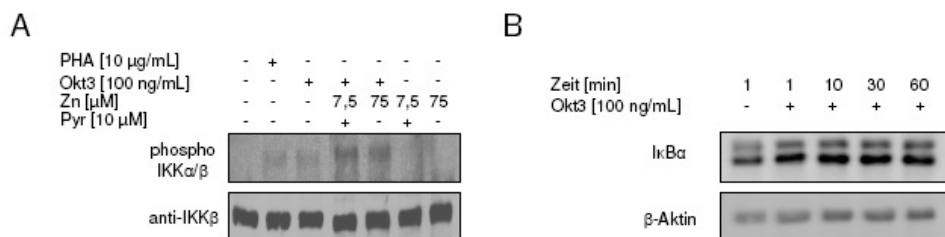
Eine andere Möglichkeit den Effekt von Zink auf die Aktivierung von NFAT-1 zu untersuchen, stellt der EMSA dar. Dabei wurde in Kernextrakten von Jurkat Zellen die Bildung von NFAT-1-DNA-Komplexen nach Stimulation mit PHA, Okt3 und Okt3+Zink/Pyrrhion bzw. Okt3+Zink untersucht. Während nach Stimulation mit PHA ein Shift detektierbar ist, ist das Signal nach Okt3-Stimulation vergleichbar zu den Western Blot-Ergebnissen nur schwach zu erkennen (Abb. 4.2.3 B). Dennoch ist nach Vorinkubation mit Zink/Pyrrhion eine Abnahme des Signals erkennbar, was unter Berücksichtigung der Western Blot-Daten eher auf eine Zink-abhängige Inhibition von Calcineurin hinweist als auf eine Inhibition der GSK3- $\beta$ .



**Abb. 4.2.3: Einfluss von Zink auf die NFAT-Signaltransduktion.** Jurkat Zellen wurden in den entsprechenden Ansätzen mit Wortmannin für 30 min vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation der Zellen mit PHA, Calcimycin, Okt3, Zink/Pyrrhion, Zink und Cyclosporin A (CsA). Nach Herstellung von Zelllysaten wurde die Phosphorylierung von NFAT-1 im Western Blot detektiert, wobei die phosphorylierte Form die obere und die nicht phosphorylierte Form die untere Bande darstellt (A). Zum Nachweis von NFAT-DNA-Komplexen in Kernextrakten wurden Jurkat Zellen 10 min mit Zink/Pyrrhion bzw. Zink vorinkubiert. Danach wurden die Zellen mit Okt3 und PHA stimuliert. Anschließend wurden Kernextrakte hergestellt, die mittels EMSA auf das Vorhandensein von NFAT-DNA-Komplexen in den einzelnen Ansätzen hin untersucht wurden (B). Repräsentative Ergebnisse aus n=3 Experimenten (A, B).



NF $\kappa$ B ist ebenfalls in T-Zellen ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der die Expression vieler Gene kontrolliert. Es gibt unterschiedliche Aussagen über den Effekt von Zink auf den Signalweg von NF $\kappa$ B, wobei meistens die Kinasen IKK $\alpha/\beta$  oder der Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  beeinflusst werden (112). Um zu untersuchen ob Zink die Aktivierung des Transkriptionsfaktors beeinflusst, wurden Jurkat Zellen mit PHA, Okt3 und Zink/Pyrrhion bzw. Zink stimuliert und die Phosphorylierung von IKK $\alpha/\beta$  detektiert. Die Stimulation mit PHA und Okt3 führt nur zu einer schwachen Aktivierung der IKK $\beta$ , die mit einem Molekulargewicht von 87 kDa im Vergleich zur IKK $\alpha$  mit 85 kDa als einzige Isoform detektiert wird. Bei Vorinkubation mit Zink/Pyrrhion bzw. Zink nimmt die Phosphorylierung nach Aktivierung mit PHA oder Okt3 zu. Die alleinige Aktivierung mit Zink/Pyrrhion bzw. Zink hat keinen Einfluss (Abb. 4.2.4 A). Da die Detektion des phosphorylierungsspezifischen Antikörpers gegen IKK $\alpha/\beta$  in den Jurkat Zellen nicht konstant gewesen ist, wurde der Abbau des Inhibitors I $\kappa$ B $\alpha$  untersucht. Exemplarisch dargestellt ist die Stimulation von Jurkat Zellen im zeitlichen Verlauf nach Okt3-Stimulation. Die Daten zeigen, dass das Signal des Inhibitors im zeitlichen Verlauf zunimmt (Abb. 4.2.4.B). Auch die Stimulation mit PHA zeigte keinen Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$ , während nur die Stimulation mit TNF $\alpha$  einen Abbau induzierte (Daten nicht dargestellt).



**Abb. 4.2.4: Einfluss von Zink auf die NF $\kappa$ B Signaltransduktion.** Jurkat Zellen wurden auf  $1 \times 10^6$  Zellen/mL eingestellt und 10 min mit Zink/Pyrrhion bzw. Zink vorinkubiert. Anschließend wurde mit PHA, Okt3, Zink/Pyrrhion bzw. Zink für 10 min stimuliert. Die Phosphorylierung und das Gesamtprotein der IKK $\beta$  wurden mittels Western Blot detektiert (A). Für den Nachweis des I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbaus wurden Jurkat Zellen auf  $1 \times 10^6$  Zellen/mL eingestellt und für unterschiedliche Zeiten mit Okt3 stimuliert. Der Abbau des NF $\kappa$ B-Inhibitors wurde mittels Western Blot detektiert (B). Repräsentatives Ergebnis aus n=2 Experimenten (A) und exemplarisches Ergebnis (B).

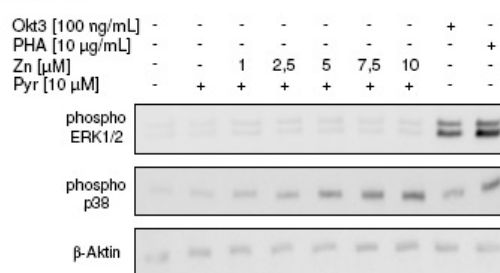
#### 4.2.1.1 Einfluss von Zink auf die Phosphorylierung der MAPK

Zu Beginn wurde eine differentielle Aktivierung der MAPK p38 und ERK1/2 in Jurkat Zellen und PBMC detektiert (Abb. 4.1.1). Abb. 4.2.5 A zeigt eine konzentrationsabhängige Zunahme der p38 Phosphorylierung nach Zink/Pyrrhion-Stimulation in Jurkat Zellen, während ERK1/2 nur nach PHA- und Okt3-Inkubation aktiviert wird. Die MAPK JNK2 wird in Jurkat Zellen zwar durch Okt3 stimuliert,

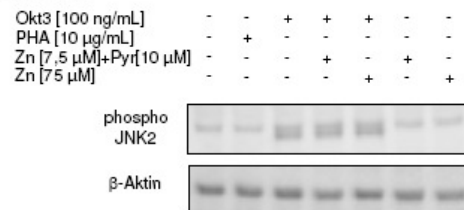
aber nicht durch Zink/Pyrrithion-Inkubation. Auch hat eine Zink/Pyrrithion-Vorinkubation keinen Einfluss auf die Aktivierung durch Okt3 (Abb. 4.2.5 B).

Die primären T-Zellen zeigen ebenfalls ein differentielles Aktivierungsmuster der beiden MAPK p38 und ERK1/2. Während die p38 durch Zink/Pyrrithion stimuliert wird, hat dies keinen Einfluss auf die ERK1/2. Erfolgt allerdings eine Vorinkubation mit Zink/Pyrrithion und eine anschließende Okt3-Stimulation wird die TCR-abhängige Aktivierung der ERK1/2 durch Zink inhibiert, während das Aktivierungssignal der p38 zunimmt (Abb. 4.2.5 C). Die JNK2 konnte in primären T-Zellen nicht detektiert werden (Daten nicht dargestellt).

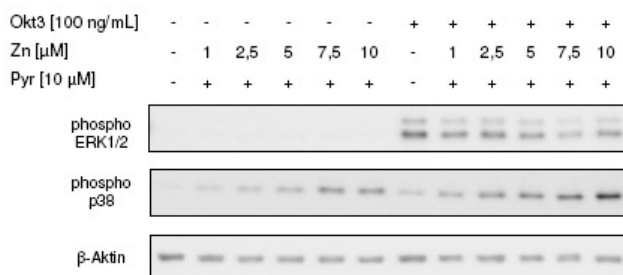
### A Jurkat



### B Jurkat



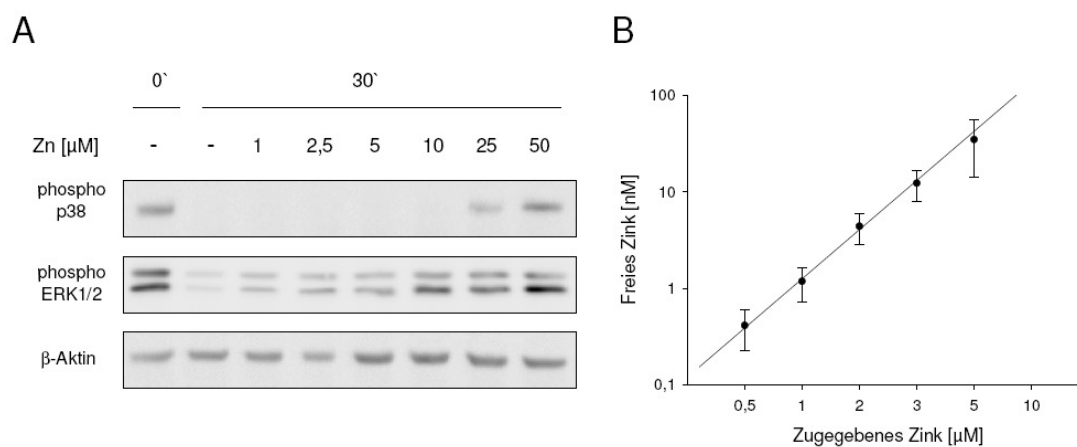
### C primäre T-Zellen



**Abb. 4.2.5: Einfluss von Zink auf die Phosphorylierung der MAPK.** Jurkat Zellen wurden mit Okt3, PHA und unterschiedlichen Zink-Konzentrationen mit Pyrrithion für 10 min stimuliert. Die Phosphorylierung der ERK1/2 und p38 (A) bzw. der JNK2 (B) wurde mittels Western Blot nachgewiesen. Primäre T-Zellen wurden mit unterschiedlichen Zink-Konzentrationen und 10 µM Pyrrithion für 10 min vorinkubiert. Anschließend wurde mit Okt3 und unterschiedlichen Zink-Konzentrationen mit Pyrrithion für 10 min stimuliert. Die Phosphorylierung der p38 und ERK1/2 wurde im Western Blot detektiert (C). Repräsentative Ergebnisse aus n=3 Experimenten (A, B, C).

Eine mögliche Erklärung für den beobachteten Zink-Effekt wäre eine Zink-abhängige Inhibition von MKP, die in der Literatur bereits beschrieben wurde (94, 95). Zur Untersuchung einer möglichen MKP-Inhibition wurden Jurkat Zellen mit PHA stimuliert, um eine vollständige Aktivierung der Kinasen zu gewährleisten. Anschließend wurden Zellysate hergestellt, die mit unterschiedlichen Zink-Konzentrationen für weitere 30 min inkubiert wurden. Die Detektion der MAPK

Phosphorylierung wurde mittels Western Blot durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Dephosphorylierung der ERK1/2 schon ab niedrigen Konzentrationen durch Zink inhibiert wird, während die p38 erst durch höhere Zink-Konzentrationen in ihrer Aktivität beeinflusst wird (Abb. 4.2.6 A). Da die verwendeten Zink-Konzentrationen über den physiologischen Konzentrationen liegen, wurde untersucht wie viel freies Zink nach Inkubation mit den verwendeten Konzentrationen tatsächlich in den Proben vorhanden ist. Dafür wurde das zugegebene Zink mittels FluoZin-3A im Lysat von Jurkat Zellen gemessen. Dabei stellte sich heraus, dass das zugegebene Zink vom Lysat stark gepuffert wird und die tatsächliche Konzentration des freien Zink im nM-Bereich liegt (Abb. 4.2.6 B).



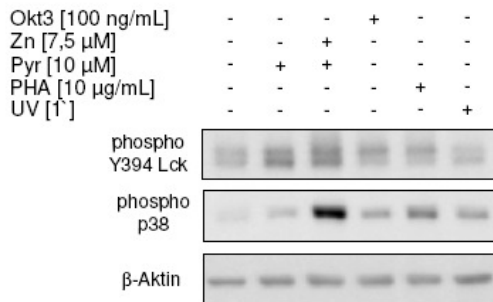
**Abb. 4.2.6: Einfluss von Zink auf die MAPK-Dephosphorylierung.** Um die Dephosphorylierung der MAPK p38 und ERK1/2 zu untersuchen, wurde eine *in vitro* Dephosphorylierung durchgeführt. Dafür wurden Jurkat Zellen für 30 min mit PHA (10  $\mu$ g/mL) stimuliert. Anschließend wurden Zelllysate hergestellt, die mit unterschiedlichen Zink-Konzentrationen für weitere 30 min inkubiert wurden. Die *in vitro* Dephosphorylierung der p38 und ERK1/2 wurde dann mittels Western Blot detektiert (A). Zur Bestimmung der Konzentration des freien Zinks nach Inkubation mit unterschiedlichen Zink-Konzentrationen wurden Jurkat Zellen lysiert und anschließend mit der Fluoreszenzsonde FluoZin-3A inkubiert. Das freie Zink wurde mit Hilfe des Fluoreszenzplattenlesers gemessen (B). Repräsentatives Ergebnis aus n=3 Experimenten (A). Die Werte in (B) stellen Mittelwerte  $\pm$ SEM aus n=3 unabhängigen Experimenten dar.

#### 4.2.1.2 Einfluss von Zink auf die TCR-Signaltransduktion

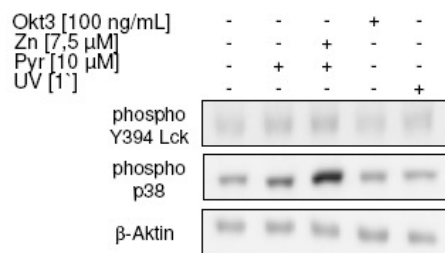
Da die p38 in Jurkat Zellen nicht nur durch Zink/Pyrition sondern auch nach Stimulation des TCR mit Okt3 phosphoryliert wird (Abb. 4.2.7 A), wurde in einem nächsten Ansatz untersucht, ob Zink einen Einfluss auf die Signalweiterleitung durch den CD3-Signalkomplex des TCRs hat. Dafür wurde mit MOLT-4 Zellen gearbeitet, eine T-Zelllinie, die im Gegensatz zu Jurkat Zellen CD3 nicht exprimiert (Abb. 4.2.7 C). Die Ergebnisse zeigen, dass ohne CD3 keine Aktivierung nach Okt3-

Stimulation mehr stattfindet. Sowohl die Src Kinase Lck, die als erste Kinase nach TCR-Aktivierung stimuliert wird, als auch die p38 werden nicht mehr phosphoryliert. Die Stimulation der p38 mit Zink/Pyrrithion ist allerdings nicht beeinträchtigt, so dass CD3 nicht für die Phosphorylierung durch Zink notwendig ist (Abb. 4.2.7 B).

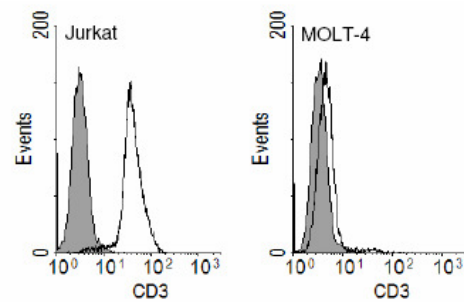
### A Jurkat



### B MOLT-4

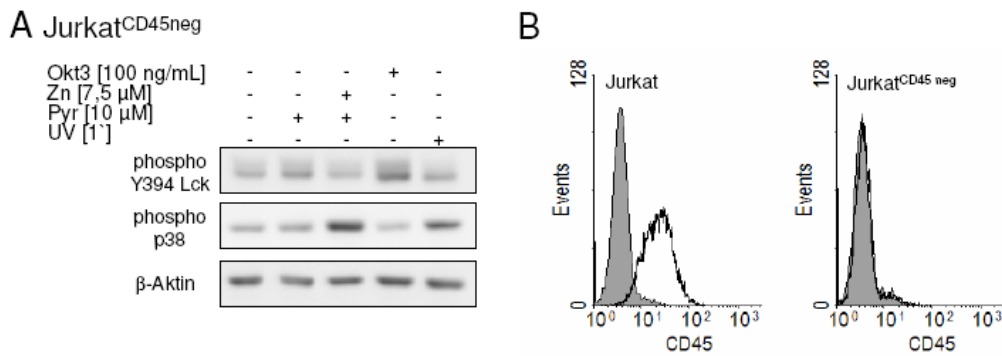


### C



**Abb. 4.2.7: Einfluss von Zink auf die TCR Signaltransduktion.** Jurkat Zellen (A) und die humane T-Zelllinie MOLT-4 (B) wurden für 10 min mit Okt3, PHA, Zink/Pyrrithion bzw. für 1 min mit UV-Licht (312 nm) stimuliert. Die Phosphorylierung der Lck (Y394) und der p38 wurde mittels Western Blot detektiert. Die CD3 Expression (schwarze Linie) und die Isotypkontrolle (graues, gefülltes Histogramm) wurden für Jurkat und MOLT-4 Zellen bestimmt (C). Repräsentative Ergebnisse aus n=3 Experimenten (A, B) bzw. exemplarisches Ergebnis (C).

Die membranständige PTP CD45 dephosphoryliert die Src-Kinase Lck und aktiviert sie dadurch. Da PTPs in verschiedenen Zellen durch Zink inhibiert werden (116), wurde überprüft, ob der stimulierende Zink-Effekt auf die Lck und die p38-Phosphorylierung durch eine Inhibition der CD45 erklärt werden kann. Dafür wurden Jurkat Zellen, die kein CD45 exprimieren (Jurkat<sup>CD45neg</sup>, Abb. 4.2.8 B), mit Okt3 und Zink/Pyrrithion stimuliert. Als Positivkontrolle diente die Exposition mit UV-Licht. Während der aktivierende Tyrosinrest der Lck nach Okt3-Inkubation phosphoryliert ist, findet nach Zink/Pyrrithion-Stimulation keine Phosphorylierung statt (Abb. 4.2.8 A). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die CD45 für die Zink-abhängige Aktivierung der Lck in Jurkat Zellen notwendig ist. Der stimulierende Zink-Effekt auf die p38-Phosphorylierung ist dahingegen nicht beeinträchtigt (Abb. 4.2.8 A).

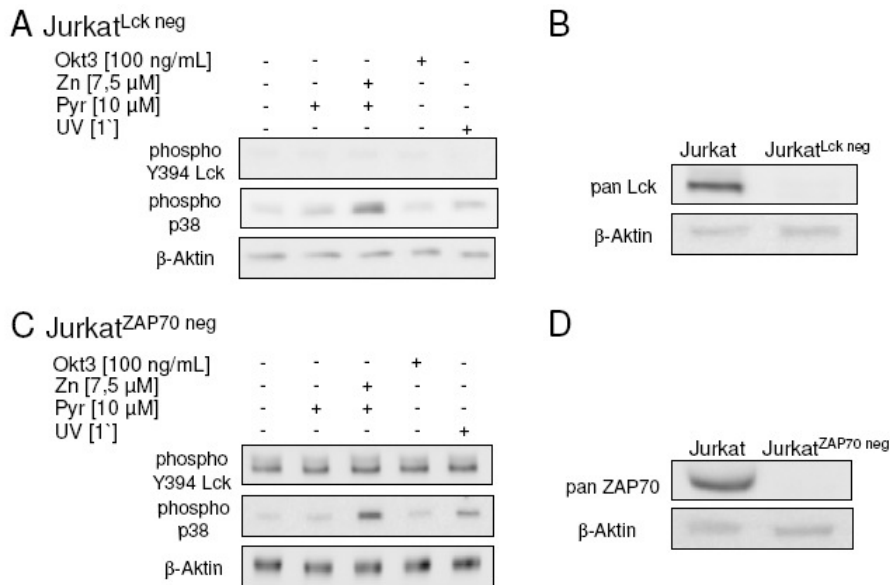


**Abb. 4.2.8: Einfluss von Zink auf die PTP CD45.** CD45 defiziente Jurkat Zellen (Jurkat<sup>CD45neg</sup>) wurden für 10 min mit Okt3, Zink/Pyrrithion bzw. für 1 min mit UV-Licht (312 nm) stimuliert. Die Detektion der Lck (Y394) und p38 Phosphorylierung erfolgte mittels Western Blot (A). Die CD45 Expression (schwarze Linie) und die Isotypkontrolle (graues, gefülltes Histogramm) wurden für Jurkat und Jurkat<sup>CD45neg</sup> Zellen bestimmt (B). Repräsentatives Ergebnis aus n=3 Experimenten (A) bzw. exemplarisches Ergebnis (B).

#### 4.2.1.3 Einfluss von Zink auf die alternative Aktivierung der p38

Die MAPK p38 wird in T-Zellen nicht nur über die klassische MAPK Kaskade aktiviert, sondern auch durch eine alternative Aktivierung, die ausgehend von der Lck über die Syk Kinase ZAP70 zur Phosphorylierung der p38 an dem Tyrosinrest 323 führt. Anschließend erfolgt eine Autophosphorylierung an den klassischen Resten Tyrosin 182 und Threonin 180.

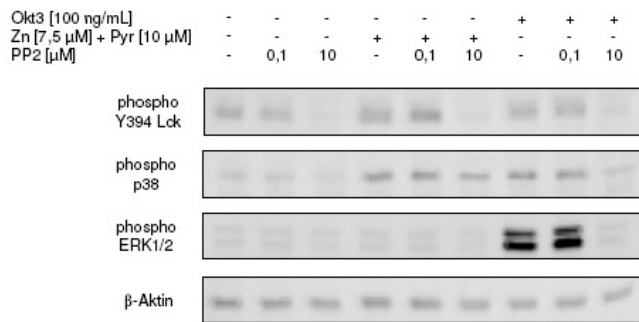
Um zu untersuchen, ob der beobachtete Zink-Effekt von den Kinasen Lck und ZAP70 abhängt, wurden Jurkat<sup>Lckneg</sup> und Jurkat<sup>ZAP70neg</sup> Zellen (Abb. 4.2.9 B, D) mit Okt3, UV-Licht und Zink/Pyrrithion stimuliert. Aufgrund der fehlenden Lck wird in den Jurkat<sup>Lckneg</sup> Zellen keine Phosphorylierung an Position Y394 detektiert, während die p38-Phosphorylierung nach Zink/Pyrrithion-Stimulation nicht beeinträchtigt wird (Abb. 4.2.9 A). In den Jurkat<sup>ZAP70neg</sup> Zellen verhält es sich ähnlich. Obwohl die ZAP70 nicht vorhanden ist, findet eine Signalzunahme der p38 nach Zink/Pyrrithion-Stimulation statt (Abb. 4.2.9 C).



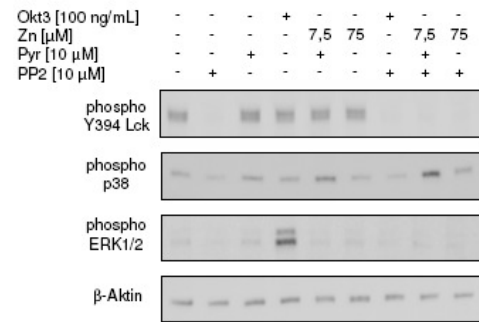
**Abb. 4.2.9: Zink Effekt auf die p38 Phosphorylierung in Jurkat<sup>Lck neg</sup> und Jurkat<sup>ZAP70 neg</sup> Zellen.** Lck-defiziente Jurkat Zellen (Jurkat<sup>Lck neg</sup>) und ZAP70-defiziente Jurkat Zellen (Jurkat<sup>ZAP70 neg</sup>) wurden für 10 min mit Okt3, Zink/Pyrrithion bzw. für 1 min mit UV-Licht (312 nm) stimuliert. Die Phosphorylierung der Kinasen wurde mittels Western Blot analysiert (A, C). Jurkat<sup>Lck neg</sup> und Jurkat<sup>ZAP70 neg</sup> Zellen wurden hinsichtlich ihrer Lck und ZAP70 Expression im Western Blot untersucht (B, D). Repräsentative Ergebnisse aus n=3 Experimenten (A, C) bzw. exemplarische Ergebnisse (B, D).

Zur Untermauerung der erhaltenen Daten wurden Jurkat Zellen und PBMC mit dem Lck-Inhibitor PP2 vorinkubiert und anschließend mit Okt3, Zink/Pyrrithion und Zink stimuliert. Die verwendeten Inhibitor-Konzentrationen sind für die Zellen nicht toxisch gewesen (siehe Anhang 2). Die Ergebnisse mit den Jurkat Zellen zeigen, dass nach Verwendung von 10 µM PP2 die Okt3- und Zink/Pyrrithion-abhängige Phosphorylierung der Lck reduziert wird, während die Phosphorylierung der p38 nach Zink/Pyrrithion-Stimulation nicht betroffen ist. 10 µM PP2 verringern allerdings auch die p38- und ERK1/2-Phosphorylierung nach Okt3-Inkubation (Abb. 4.2.10 A). Die Daten mit den primären Zellen sind vergleichbar (Abb. 4.2.10 B) und verdeutlichen, dass der beobachtete Zink-Effekt der p38 vermutlich nicht auf eine alternative Aktivierung durch die Lck und ZAP70 zurückzuführen ist.

## A Jurkat

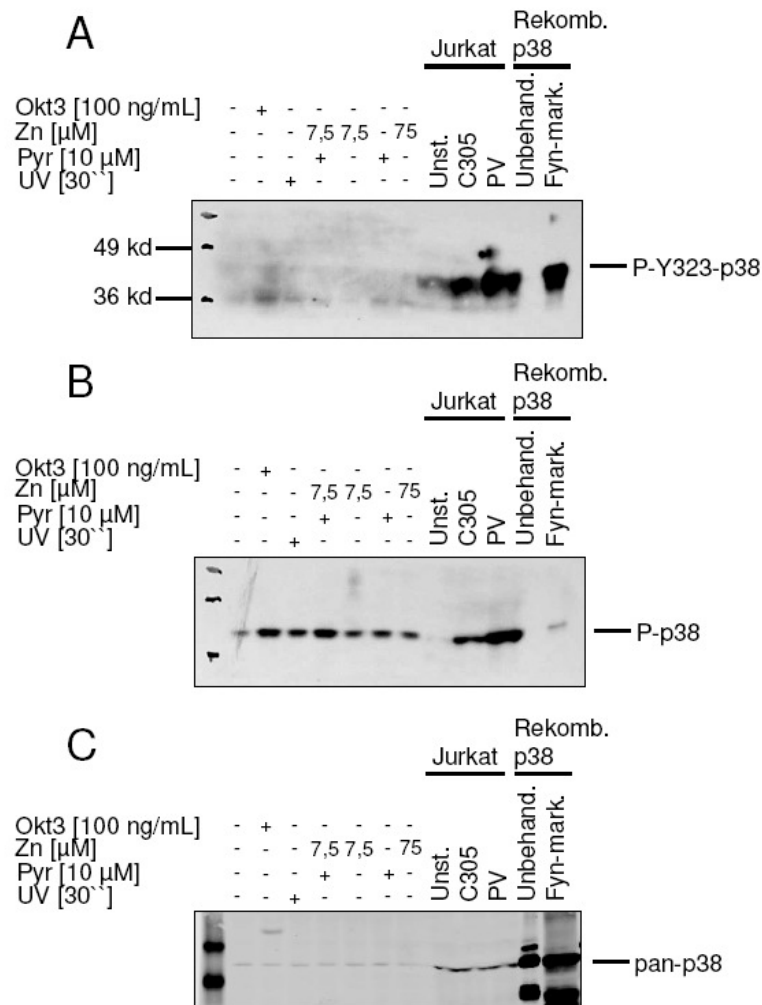


## B PBMC



**Abb. 4.2.10: Zink-Effekt auf die p38 Phosphorylierung in PP2-behandelten Jurkat Zellen und PBMC.** Jurkat Zellen (A) und PBMC (B) wurden für 30 min mit PP2 vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Okt3 und Zink/Pyrrithion für 10 min stimuliert. Die Detektion der phosphorylierten Kinasen erfolgte im Western Blot. Repräsentative Ergebnisse aus n=3 Experimenten (A, B).

Um eindeutig eine alternative Aktivierung der p38 ausschließen zu können, wurde die Phosphorylierung des alternativen Tyrosinrestes an Position 323 mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe von Dr. Mittelstadt in den USA untersucht. Als Kontrolle wurden unstimulierte, mit C305 (anti-CD3 Überstand) und Pervanadat (Phosphatase-Inhibitor) behandelte Jurkat Zellen, als auch rekombinante p38 (unbehandelt und Fyn-markiert) verwendet.



**Abb. 4.2.11: Zink-Effekt auf die Phosphorylierung an Position Y323 der p38.** Jurkat Zellen wurden für 10 min mit Okt3, Zink/Pyrrithion, Zink und Pyrrithion stimuliert. Die Phosphorylierung der Position Y323 wurde mittels Western Blot detektiert (A). Nach dem Strippen der Membran wurden die Proben mit dem Antikörper gegen Tyrosin 182 und Threonin 180 inkubiert und mittels Western Blot detektiert (B). Das Gesamtprotein wurde mit einem pan p38 Antikörper kontrolliert (C). Exemplarisches Ergebnis (A, B, C).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation der Jurkat Zellen mit C305-Überstand und Pervanadat zu einer Phosphorylierung an Position Y323 führt, während die Okt3- und Zink/Pyrrithion-behandelten Proben keine Phosphorylierung an dieser Position zeigen (Abb. 4.2.11 A).

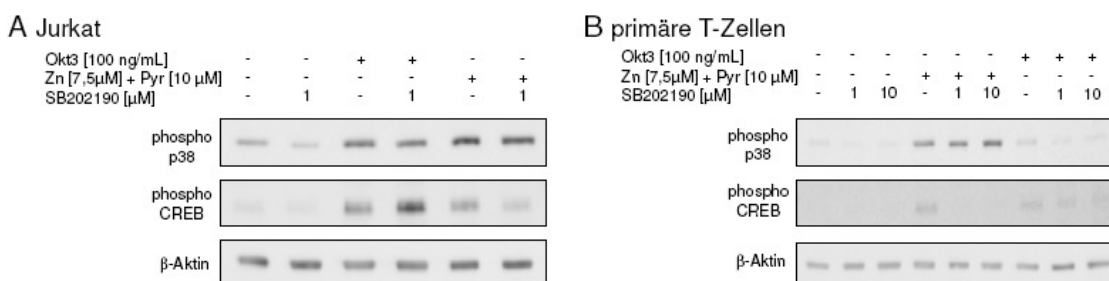
Die gestrippte Membran wurde anschließend mit dem p38 Antikörper gegen Tyrosin 182 und Threonin 180 inkubiert und zeigte, in Übereinstimmung mit den bisher erhaltenen Daten, dass die p38 nach Okt3- und Zink/Pyrrithion Stimulation phosphoryliert wird (Abb. 4.2.11 B). Zur Kontrolle der Proteinmenge wurde gleichzeitig ein Antikörper gegen das Gesamtprotein p38 (pan p38) mitgeführt (Abb. 4.2.11 C).



Unter Berücksichtigung der Ergebnisse mit den Lck- und ZAP70-defizienten Zelllinien und den PP2-Daten kann die alternative Aktivierung der p38 nach Zink/Pyrrhion Stimulation als Mechanismus für den beobachteten Zink-Effekt ausgeschlossen werden.

#### 4.2.1.4 Einfluss von Zink auf die CREB Phosphorylierung

CREB ist ein Transkriptionsfaktor, der unter anderem durch die p38-vermittelte MSK-1-Phosphorylierung aktiviert wird (117). Da die Stimulation der T-Zellen mit Zink/Pyrrhion zu einer p38-Phosphorylierung und damit Aktivierung führt, lag die Frage nahe, ob ebenfalls p38-abhängige Transkriptionsfaktoren durch Zink/Pyrrhion beeinflusst werden. Um dies zu untersuchen, wurden Jurkat Zellen und primäre T-Zellen mit dem p38-Inhibitor SB202190 vorinkubiert und anschließend mit Okt3 und Zink/Pyrrhion stimuliert. Die verwendeten Inhibitor-Konzentrationen hatten keinen negativen Einfluss auf die Zellvitalität (siehe Anhang 2). Die Ergebnisse in den Jurkat Zellen zeigen, dass die Zink/Pyrrhion-Stimulation zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB führt und dass diese Aktivierung p38-abhängig ist (Abb. 4.2.12 A). Die Daten mit den primären T-Zellen untermauern die erhaltenen Resultate mit den Jurkat Zellen. Die Phosphorylierung von CREB nach Zink/Pyrrhion-Stimulation wird hier reduziert (Abb. 4.2.12 B).

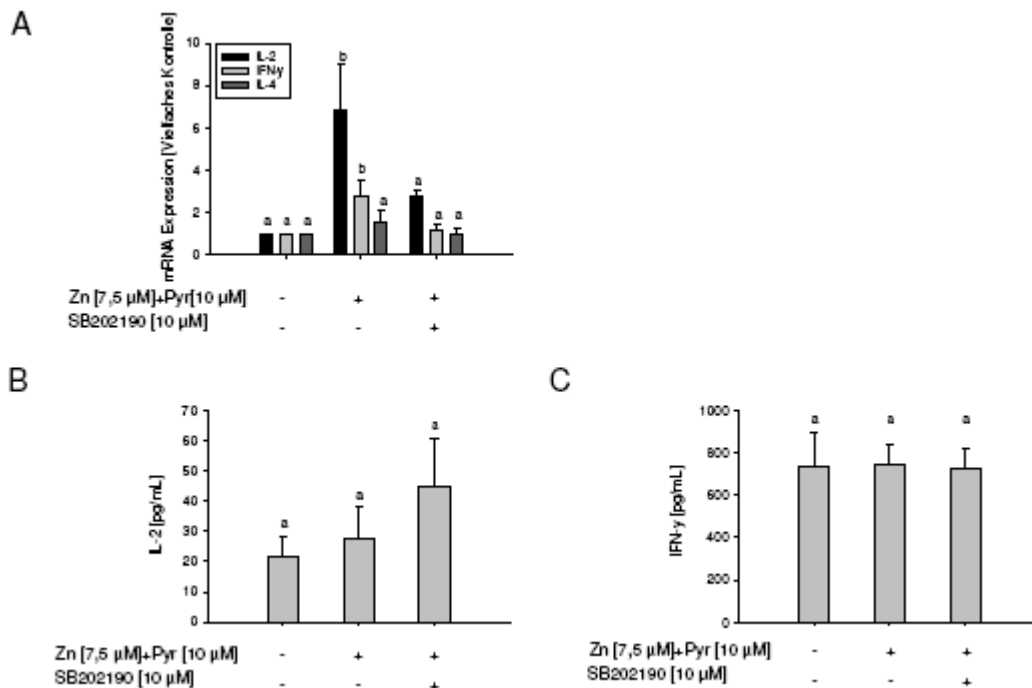


**Abb. 4.2.12: Einfluss von Zink auf die CREB Phosphorylierung.** Jurkat Zellen (A) und primäre T-Zellen (B) wurden mit dem p38 Inhibitor SB202190 für 30 min vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Okt3 und Zink/Pyrrhion für weitere 10 min stimuliert. Die Phosphorylierung der p38 und des Transkriptionsfaktors CREB wurde mittels Western Blot detektiert. Repräsentative Ergebnisse aus n=3 Experimenten (A, B).

#### 4.2.1.5 Einfluss von Zink auf die p38-abhängige Cytokinproduktion

Da eine p38-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB nach Zink/Pyrrhion-Stimulation in T-Zellen nachgewiesen werden konnte und die p38 in T-Effektorzellen die Expression des Th1-Cytokins IFN- $\gamma$  vermittelt (118), lag es nahe, die Produktion von Th1- und Th2-Cytokinen (IL-2 und

IFN- $\gamma$  bzw. IL-4) auf mRNA- und Protein-Ebene zu untersuchen. Dafür wurden primäre T-Zellen mit dem p38-Inhibitor SB202190 vorinkubiert und anschließend mit Zink/Pyrrhion stimuliert. Während Zink/Pyrrhion signifikant die Expression der Th1-Cytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  induziert, wird die Expression des Th2-Cytokins IL-4 nicht beeinflusst (Abb. 4.2.13 A). Dass die Zink/Pyrrhion-induzierte Expression der Th1-Cytokine p38 abhängig ist, zeigt die Vorinkubation mit SB202190 (Abb. 4.2.13 A). Auf Proteinebene wurden für die Th1-Cytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  keine signifikanten Unterschiede detektiert (Abb. 4.2.13 B, C).

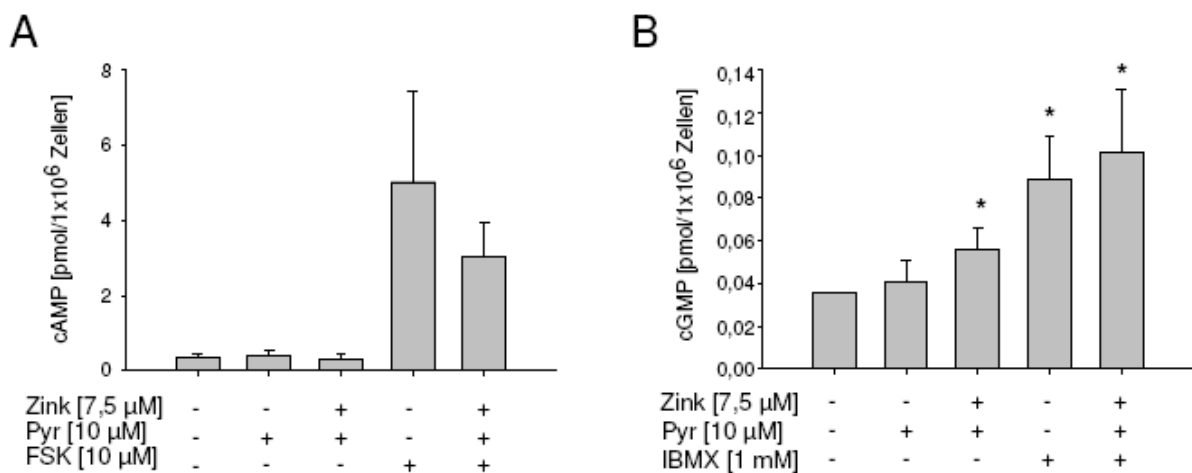


**Abb. 4.2.13: Einfluss von Zink auf die p38-abhängige Cytokinproduktion.** Primäre T-Zellen wurden für 30 min mit SB202190 vorinkubiert. Anschließend wurde mit Zink/Pyrrhion für 4 h stimuliert. Durch eine quantitative RT-PCR wurde die Expression der Cytokine IL-2, IFN- $\gamma$  und IL-4 bestimmt (A). Zur Bestimmung der Cytokinproduktion auf Proteinebene wurden primäre T-Zellen mit SB202190 für 30 min vorinkubiert und mit Zink/Pyrrhion für 24 h stimuliert. Anschließend wurde mittels ELISA die IL-2- (B) und die IFN- $\gamma$ -Produktion (C) bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$ SEM aus n=7 unabhängigen Experimenten (A, B, C). Die Ansätze mit unterschiedlichen Buchstaben sind mit  $p \leq 0,05$  signifikant unterschiedlich (Oneway ANOVA, LSD post hoc Test).

#### 4.2.1.6 Einfluss von Zink auf die cAMP und cGMP Akkumulation in T-Zellen

Über eine Zink-abhängige PDE-Inhibition und die daraus folgende Akkumulation des zyklischen Nukleotids cGMP wird in humanen Monocyten die Kinase PKA aktiviert (100). Da die PKA in T-Zellen den Raf/MEK/ERK Signalweg inhibiert (97) und über die p38 CREB aktiviert (117), wäre dies eine weitere Möglichkeit den beobachteten, differentiellen Zink-Effekt auf die MAPK p38 und

ERK1/2 zu erklären. Um die Hypothese einer PDE-Inhibition durch Zink zu testen, wurden Jurkat Zellen mit dem Adenylatzyklase Aktivator Forskolin (FSK) und Zink/Pyrrithion stimuliert und anschließend die cAMP Konzentration bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Positivkontrolle FSK zwar eine Steigerung der cAMP-Konzentration initiiert, die Inkubation mit Zink/Pyrrithion aber keinen Effekt hat (Abb. 4.2.14 A). Im Gegensatz dazu induziert die Stimulation mit Zink/Pyrrithion einen Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration, vergleichbar mit dem unspezifischen PDE-Inhibitor IBMX (Abb. 4.2.14 B). Sowohl FSK als auch IBMX wurden hinsichtlich ihrer Toxizität für die Zellen überprüft und haben keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen (siehe Anhang 2).

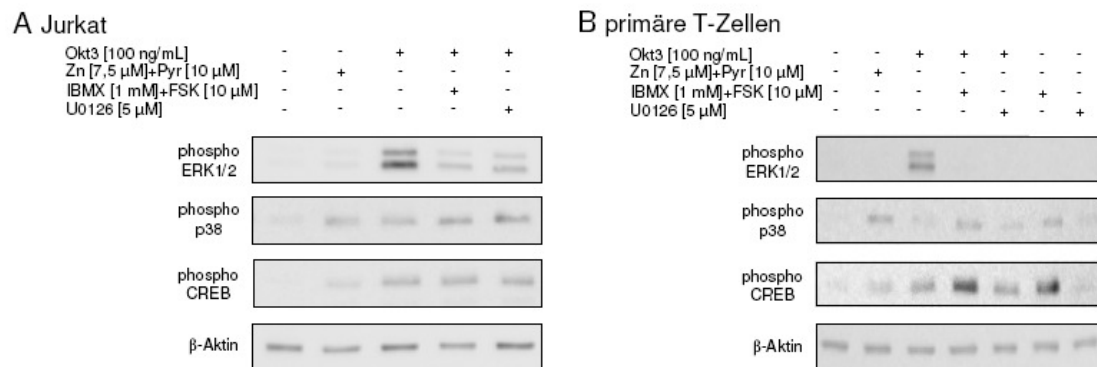


**Abb. 4.2.14: Einfluss von Zink auf die cAMP- und cGMP-Akkumulation in T-Zellen.** Zur Bestimmung der cAMP-Konzentration wurden Jurkat Zellen für 1 h mit Pyrrithion, Zink/Pyrrithion und FSK stimuliert (A). Zur Überprüfung der cGMP-Konzentration wurden Jurkat Zellen für 1 h mit Pyrrithion, Zink/Pyrrithion und IBMX stimuliert (B). Gezeigt sind Mittelwerte±SEM aus n=3 (A) bzw. n=7 (B) unabhängigen Experimenten. Die zur Kontrolle signifikant unterschiedlichen Ansätze sind mit \* markiert ( $p \leq 0,05$ , Student's *t* test) (B).

#### 4.2.1.7 Einfluss von Zink auf die p38 und ERK1/2 Phosphorylierung in Abhängigkeit von der Kinase PKA

Um einen möglichen Zink-abhängigen Effekt auf die p38 und ERK1/2 Phosphorylierung durch den PKA-abhängigen Signalweg zu untersuchen, wurden Jurkat Zellen und primäre T-Zellen sowohl mit IBMX/FSK als auch mit dem MEK-Inhibitor U0126 vorinkubiert und anschließend mit Okt3 und Zink/Pyrrithion stimuliert. Zur Detektion der Phosphorylierung der beiden MAPK wurde ein Western Blot durchgeführt. Die Ergebnisse in Jurkat Zellen zeigen, dass die TCR-induzierte

Phosphorylierung der ERK1/2 nach U0126- und IBMX/FSK-Vorinkubation reduziert wird, während die p38-Phosphorylierung nicht beeinflusst wird (Abb. 4.2.15. A). In primären T-Zellen werden die p38 und der Transkriptionsfaktor CREB durch die alleinige Inkubation mit IBMX/FSK aktiviert, während die TCR-abhängige Phosphorylierung der ERK1/2 wie bei den Jurkat Zellen durch IBMX/FSK verringert wird (Abb. 4.2.15. B). Die Verwendung des MEK-Inhibitors ist für die Zellen nicht toxisch gewesen (siehe Anhang 2).



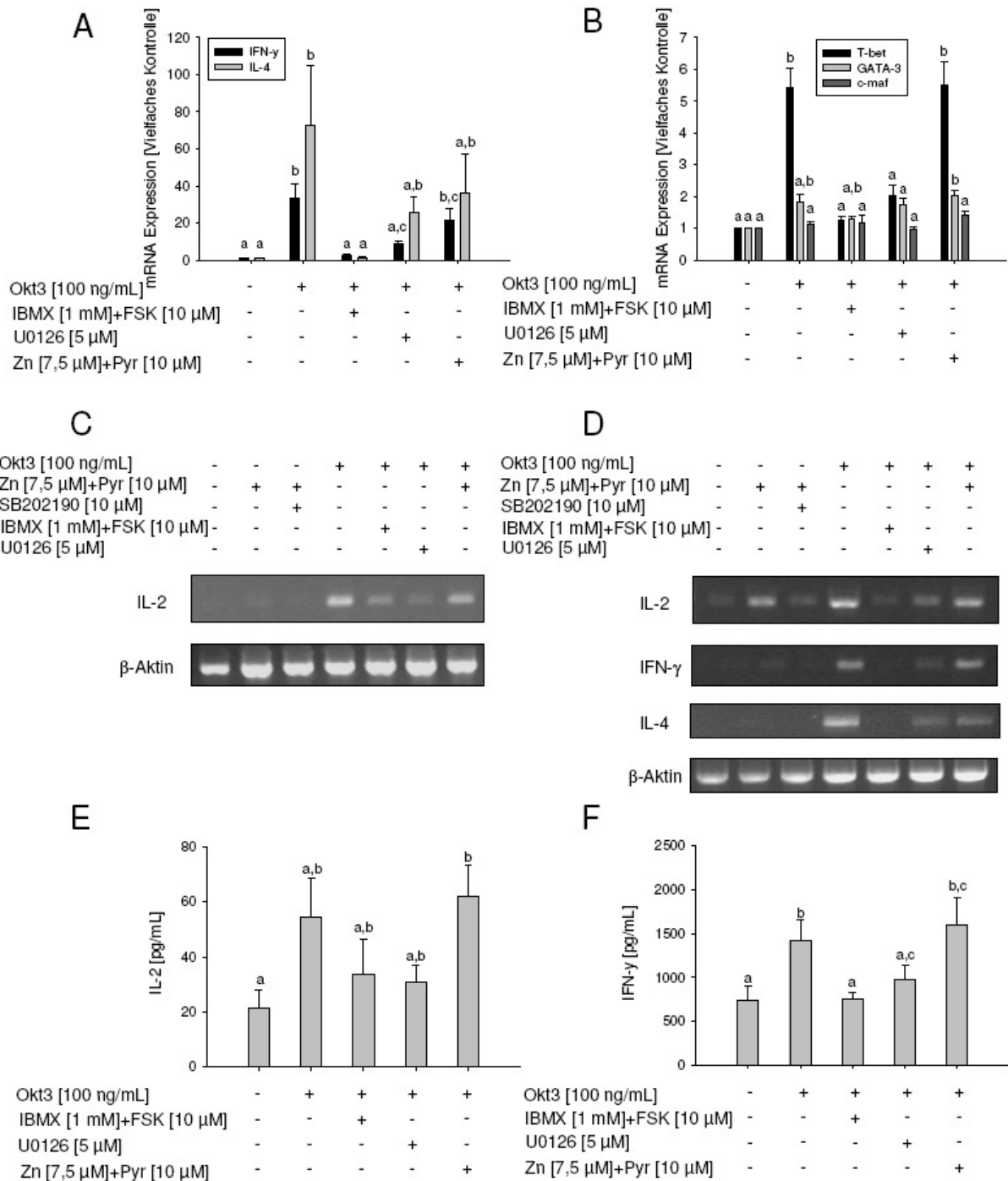
**Abb. 4.2.15 Zink-Effekt auf die p38- und ERK1/2-Phosphorylierung im Western Blot.** Jurkat Zellen (A) und primäre T-Zellen (B) wurden mit IBMX/FSK bzw. U0126 für 30 min vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation der Zellen mit Okt3 bzw. Zink/Pyrrithion für 10 min. Zwei weitere Ansätze wurden nur mit IBMX/FSK bzw. U0126 für 30 min stimuliert (B). Die Phosphorylierung der p38, der ERK1/2 und von CREB wurden mittels Western Blot detektiert (A, B). Repräsentative Ergebnisse aus n=3 Experimenten (A, B).

Um die funktionale Bedeutung des induzierten ERK1/2 Signalwegs zu untersuchen, wurde die Cytokinproduktion in TCR-stimulierten primären T-Zellen nach Vorinkubation mit den verwendeten Inhibitoren IBMX und U0126 und dem Aktivator FSK bestimmt. Die Expression der Cytokine IFN- $\gamma$  und IL-4 war signifikant erhöht nach TCR-Stimulation (Abb. 4.2.16 A), während die IL-2 Expression keine signifikanten Unterschiede zeigte (Daten nicht dargestellt). Der Anstieg der IFN- $\gamma$  und IL-4 Expression nach Okt3-Stimulation wurde durch U0126 reduziert, was eine TCR-abhängige ERK1/2-Aktivierung bestätigt. Zusätzlich führte die PDE-Inhibition zu einer signifikanten Abnahme der Okt3-induzierten IFN- $\gamma$  und IL-4 Expression. Dagegen war die Expression beider Cytokine nach Zink/Pyrrithion- Vorinkubation lediglich schwach reduziert (Abb. 4.2.16 A).

Aufgrund des unterschiedlichen Einflusses der Zink/Pyrrithion-Vorinkubation auf die Expression der Th1- und Th2-Cytokine wurden in einem nachfolgenden Versuch die Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet, GATA-3 und c-maf, die Subtyp-spezifisch sind (Th1=T-bet, Th2=GATA-3 und c-maf) unter gleichen Bedingungen untersucht. Das Expressionsprofil für den

Transkriptionsfaktor T-bet ähnelte dabei der Expression von IFN- $\gamma$  ohne einen reduzierenden Effekt von Zink/Pyrithion, während GATA-3 und c-maf keine relevanten Unterschiede zeigten (Abb. 4.2.16 B).

Die Darstellung der Cytokinexpression in Jurkat Zellen mit semiquantitativer PCR zeigt, dass IL-2 durch Okt3-Stimulation induziert und die Expression nach Vorinkubation mit IBMX/FSK bzw. U0126 reduziert wird (Abb. 4.2.16 C). Da die verwendeten Jurkat Zellen kein IFN- $\gamma$  und IL-4 exprimierten, wurden die Ansätze in primären T-Zellen wiederholt. Dabei wurden die Ergebnisse der quantitativen PCR erneut bestätigt, da nach IBMX/FSK- bzw. U0126-Vorinkubation und nachfolgender Okt3-Stimulation die Expression von IFN- $\gamma$  und IL-4 reduziert wurde, während die Vorinkubation mit Zink/Pyrithion allein die IL-4 Expression verringerte (Abb. 4.2.16 D).



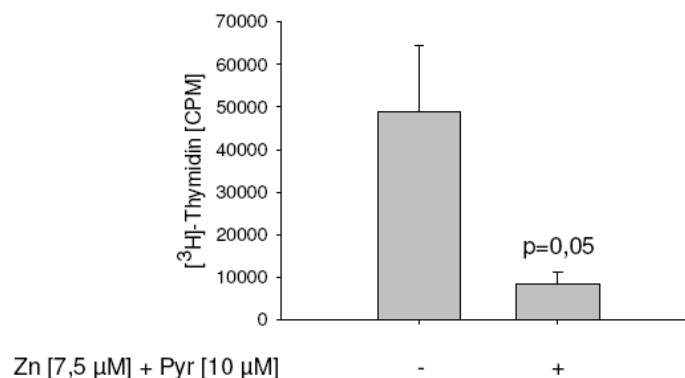
**Abb. 4.2.16 Zink-Effekt auf die Cytokinproduktion in Abhängigkeit von der Kinase PKA.** Primäre T-Zellen wurden für 30 min mit IBMX/FSK bzw. U0126 und für 10 min mit Zink/Pyrrithion vorinkubiert. Anschließend wurde mit Okt3 für 4 h stimuliert. Durch eine quantitative RT-PCR wurde die Expression der Cytokine IFN- $\gamma$  und IL-4 bestimmt (A). Mit dem gleichen Stimulationsansatz wurde die Expression des Th1-spezifischen Transkriptionsfaktors T-bet und der Th2-assoziierten Transkriptionsfaktoren GATA-3 und c-maf in einer quantitativen RT-PCR bestimmt (B). Zur qualitativen Überprüfung der Cytokinexpression wurden Jurkat Zellen für 30 min mit IBMX/FSK bzw. U0126 und für 10 min mit Zink/Pyrrithion vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit Okt3 bzw. Zink/Pyrrithion für 4 h. Durch eine semiquantitative RT-PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese wurde die Expression von IL-2 und dem

Housekeeping Gen  $\beta$ -Aktin bestimmt (C). Mit dem gleichen Stimulationsansatz wurde die Expression der Cytokine IL-2, IFN- $\gamma$  und IL-4 in primären T-Zellen bestimmt (D). Zur Bestimmung der Cytokinproduktion auf Protein-Ebene wurden primäre T-Zellen mit IBMX/FSK bzw. U0126 für 30 min und Zink/Pyrrhion für 10 min vorinkubiert und mit Okt3 für 24 h stimuliert. Anschließend wurde mittels ELISA die IL-2- (E) und die IFN- $\gamma$ -Produktion (F) bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$ SEM aus  $n=7$  (A, B, E, F) bzw.  $n=3$  (C, D) unabhängigen Experimenten. Die Ansätze mit unterschiedlichen Buchstaben sind mit  $p \leq 0,05$  signifikant unterschiedlich (Oneway ANOVA, LSD post hoc Test).

Die Produktion der Cytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  in primären T-Zellen auf Proteinebene folgt dem gleichen Schema wie die Expression der Cytokine. Während Die Okt3-induzierte Produktion durch IBMX/FSK- und U0126-Vorinkubation reduziert wird, hat die Zink/Pyrrhion-Vorinkubation keinen Einfluss auf die Produktion der beiden Th1-Cytokine (Abb. 4.2.16 E, F).

#### 4.2.1.8 Einfluss von Zink auf die Proliferation von Jurkat Zellen

Die MAPK ERK1/2 ist wichtig für zelluläre Funktionen wie Differenzierung und Proliferation und die Kinase PKA ist in T-Zellen bekannt für ihren anti-proliferativen Effekt über die Raf/MEK/ERK-Kaskade [Novak und Rothenberg, 1990]. Um zu testen, ob die Inkubation mit Zink/Pyrrhion die Zellproliferation beeinflusst, wurden Jurkat Zellen mit Zink/Pyrrhion inkubiert und ein [ $^3$ H] Thymidin Proliferationsstest durchgeführt. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reduziert Zink/Pyrrhion die Proliferation (Abb. 4.2.17).

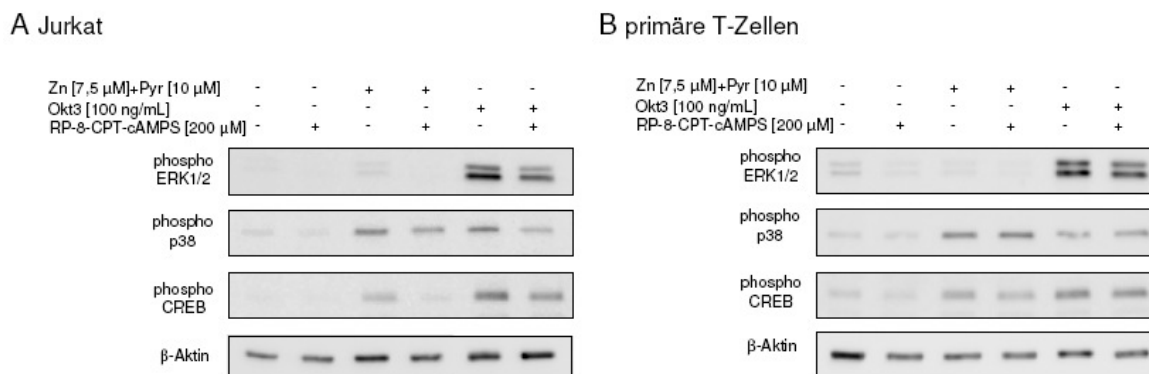


**Abb. 4.2.17: Einfluss von Zink auf die Proliferation in T-Zellen.** Jurkat Zellen wurden für 10 min mit Zink/Pyrrhion inkubiert. Nach Zugabe von [ $^3$ H]-Thymidin erfolgte eine weitere Inkubation für 16 h. Der Einbau des [ $^3$ H]-Thymidins als Maß für die Proliferation der Zellen wurde mit Hilfe des  $\beta$ -Zerfalls bestimmt und als count per minute (CPM) detektiert. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$ SEM aus  $n=3$  unabhängigen Experimenten (Student's *t* test,  $p=0,05$ ).

#### 4.2.1.9 Einfluss von Zink auf den PKA Signalweg

Um zu untersuchen, ob der Zink-Effekt in T-Zellen über den PKA- Signalweg läuft, wurden in den nachfolgenden Versuchen verschiedene Aktivatoren und Inhibitoren der Kinase PKA im Western Blot getestet.

Zunächst wurde der PKA-Inhibitor RP-8-cpt-cAMPS verwendet. Dabei wurden Jurkat Zellen und primäre T-Zellen mit RP-8-cpt-cAMPS vorinkubiert und anschließend mit Okt3 und Zink/Pyrrithion stimuliert. In Jurkat Zellen werden sowohl die p38 als auch CREB durch die Stimulation mit Zink/Pyrrithion phosphoryliert. Dennoch erfolgt durch Inhibition der PKA ausschließlich eine Abnahme des Signals für den Transkriptionsfaktor CREB (Abb. 4.2.18 A). Die primären T-Zellen werden zwar auch durch Zink/Pyrrithion stimuliert zeigen aber weder für die p38 noch für CREB eine Verringerung des Phosphorylierungssignals (Abb. 4.2.18 B). Die Anwendung des Inhibitors hatte keinen negativen Einfluss auf die Vitalität der Zellen (siehe Anhang 2).



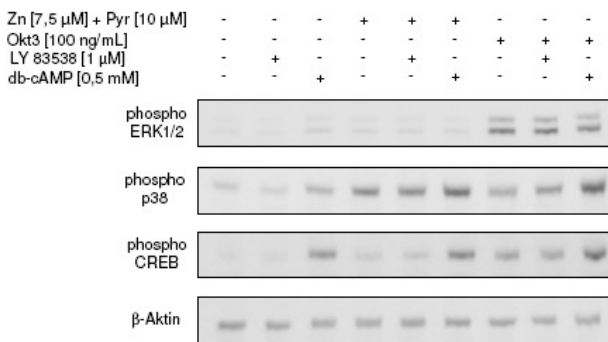
**Abb. 4.2.18 Effekt des PKA- Inhibitors Rp-8-cpt-cAMPS.** Jurkat Zellen (A) und primäre T-Zellen (B) wurden für 30 min mit Rp-8-cpt-cAMPS vorinkubiert und danach mit Okt3 bzw. Zink/Pyrrithion für 10 min stimuliert. Die Detektion der Phosphorylierung der ERK1/2, p38 und von CREB erfolgte mittels Western Blot. Repräsentative Ergebnisse aus n=4 Experimenten (A, B).

Zur weiteren Untersuchung des PKA Signalweges wurde der Inhibitor LY83583 der löslichen Guanylatzyklase verwendet, um die Neubildung von cGMP zu unterbinden. Weiterhin wurde der PKA Aktivator db cAMP eingesetzt. Jurkat Zellen und primäre T-Zellen wurden mit LY83583 und db cAMP vorinkubiert und anschließend mit Okt3 und Zink/Pyrrithion stimuliert. Die verwendeten Inhibitoren und Aktivatoren sind für die Zellen nicht toxisch gewesen (siehe Anhang 2). Die Ergebnisse der Jurkat Zellen zeigen, dass die Verwendung von LY83583 weder nach Okt3- noch nach Zink/Pyrrithion-Stimulation einen Einfluss auf die p38-Phosphorylierung hat (Abb. 4.2.19 A).

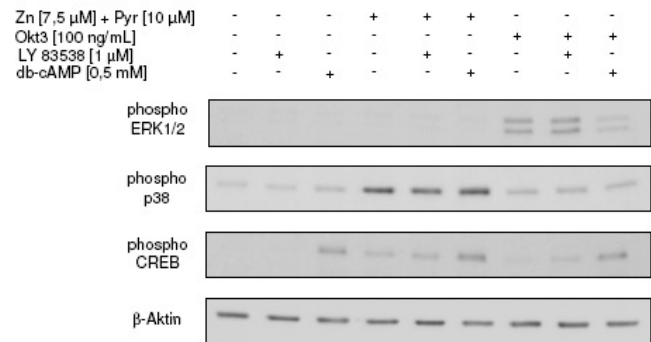


Der PKA Aktivator db cAMP führt nach alleiniger Inkubation zur Phosphorylierung von p38 und CREB und steigert die Zink/Pyrrhion-induzierte p38-Aktivierung (Abb. 4.2.19 A). In primären T-Zellen hat LY 83583 ebenfalls keinen Einfluss auf die Aktivität der p38 und obwohl CREB durch die alleinige Inkubation mit db cAMP phosphoryliert wird, hat der PKA-Aktivator keinen Einfluss auf die p38-Phosphorylierung (Abb. 4.2.19 B).

## A Jurkat



## B primäre T-Zellen



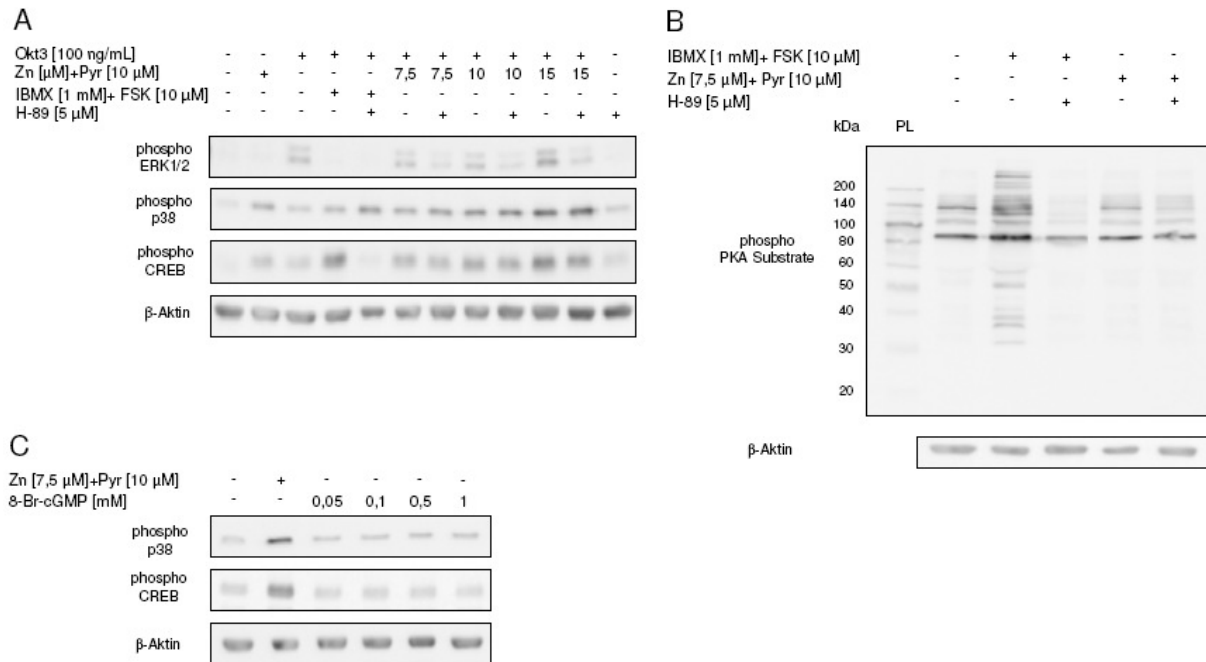
**Abb. 4.2.19 Effekt des PKA-Aktivators db cAMP und des GC-Inhibitors LY83583.** Jurkat Zellen (A) und primäre T-Zellen (B) wurden für 30 min mit db cAMP bzw. LY 83583 vorinkubiert und danach mit Okt3 bzw. Zink/Pyrrhion für 10 min stimuliert. Die Detektion der Phosphorylierung der ERK1/2, p38 und von CREB erfolgte mittels Western Blot. Repräsentative Ergebnisse aus n=4 Experimenten (A, B).

Der PKA Inhibitor H-89 wurde als weitere Alternative eingesetzt, um einen möglichen Effekt der Zink/Pyrrhion Stimulation auf den PKA Signalweg zu untersuchen. Dabei wurden primäre T-Zellen mit H-89, IBMX/FSK und Zink/Pyrrhion vorinkubiert und anschließend mit Okt3 stimuliert. Die Ergebnisse zeigen, dass die TCR-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung durch IBMX/FSK-Vorinkubation reduziert wird, während die zusätzliche Inkubation mit H-89 nicht zu einer Wiederherstellung des Signals führt (Abb. 4.2.20 A). Außerdem konnte die Zink/Pyrrhion-induzierte Phosphorylierung der p38 nicht reduziert werden. Dennoch zeigt der Transkriptionsfaktor CREB bei Inkubation mit H-89 und Zink/Pyrrhion eine verringerte Phosphorylierung (Abb. 4.2.20 A).

Zur Überprüfung der Funktionalität des PKA Inhibitors H-89 wurden primäre T-Zellen mit IBMX/FSK und H-89 oder mit Zink/Pyrrhion und H-89 inkubiert. Die Daten zeigen, dass der Inhibitor funktional gewesen ist, da die IBMX/FSK-induzierte Phosphorylierung verschiedener PKA-Substrate nach H-89-Inkubation reduziert wird (Abb. 4.2.15.3 B).

Der PKG-Aktivator 8-Br-cGMP wurde verwendet, um eine mögliche Kreuzaktivierung der PKA durch das cGMP Analogon zu induzieren. Der Vergleich zur Zink/Pyrrhion Stimulation allerdings

zeigt, dass durch 8-Br-cGMP weder die p38 noch der Transkriptionsfaktor CREB aktiviert werden (Abb. 4.2.20 C). Alle verwendeten Inhibitor-Konzentrationen sind nicht toxisch gewesen (siehe Anhang 2).



**Abb. 4.2.20 Effekt des PKA-Inhibitors H-89 und des PKG-Aktivators 8-Br-cGMP.** Primäre T-Zellen wurden für 30 min mit IBMX/FSK und H-89 bzw. für 10 min mit Zink/Pyridithion und H-89 vorinkubiert. Danach wurde mit Okt3 für 10 min stimuliert. Die Detektion der Phosphorylierung der ERK1/2, p38 und von CREB erfolgte mittels Western Blot (**A**). Primäre T-Zellen wurden für 30 min mit H-89 vorinkubiert. Anschließend wurde mit IBMX/FSK bzw. Zink/Pyridithion für 30 bzw. 10 min stimuliert. Die Detektion phosphorylierter PKA-Substrate erfolgte mittels Western Blot (**B**). Primäre T-Zellen wurden 10 min mit Zink/Pyridithion und 30 min mit 8-Br-cGMP stimuliert. Die Phosphorylierung der p38 und von CREB erfolgte mittels Western Blot (**C**). Repräsentative Ergebnisse aus n=3 Experimenten (**A, B, C**).

## 5 Diskussion

Zink ist als Spurenelement essentiell für T-Zellen. T-Zellfunktionen werden in Abhängigkeit von der Zink-Menge im Serum reguliert. Dabei fördern niedrige Zink-Konzentrationen die zellulären Funktionen, während Konzentrationen ab 100  $\mu\text{M}$  Zink die T-Zellfunktionen inhibieren. Da T-Zellen eine niedrigere intrazelluläre Zink-Konzentration aufweisen als z.B. Monocyten (119), scheinen sie auf Veränderungen des extrazellulären Zink-Gehaltes empfindlicher zu reagieren. Ein Zink-Mangel, hervorgerufen durch erhöhte Exkretion, verminderte Aufnahme oder reduzierte Resorption im Dünndarm, beeinflusst die Entwicklung der T-Zellen im Thymus, die Polarisierung zu Effektorzellen (Th1/Th2-Gleichgewicht) und die Produktion der Th1-Cytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  (120). Durch Zink-Supplementierung erfolgt eine Wiederherstellung der Th1-abhängigen Zellfunktionen, so dass das erhöhte Infektionsrisiko reduziert wird (34, 121).

Zink spielt eine große Rolle in der Signaltransduktion, vergleichbar mit dem Second Messenger Calcium, und beeinflusst so z.B. die IL-2-abhängige Signaltransduktion in primären T-Zellen (95). Auch die Signalweiterleitung durch den TCR wird auf unterschiedlichen Ebenen durch Zink beeinflusst. Zink wird nach Rezeptor-Stimulation intrazellulär freigesetzt und kann so die Signalweiterleitung beeinflussen (83). Die vorliegende Arbeit trägt dazu bei den *in vivo* beobachteten Zink-Effekt in T-Zellen im Vergleich zur TCR-induzierten Signaltransduktion zu charakterisieren.

Die Ergebnisse bestätigen, dass nach Stimulation über den TCR Signalkomplex CD3 mit dem Antikörper Okt3 die Src Kinase Lck und die MAP Kinasen p38, JNK2 und ERK1/2 phosphoryliert werden. Dass die Phosphorylierung der JNK2 in primären T-Zellen nicht detektiert werden konnte, kann durch eine verminderte Expression in primären T-Zellen erklärt werden (122). Das nach Okt3-Behandlung induzierte Zellsterben nach 24 h (siehe Anhang 2) in Jurkat Zellen ist durch den in leukämischen T-Zellen bekannten Aktivierungsinduzierten Zelltod zu erklären. Dabei wird nach Aktivierung des TCR-Komplexes die Apoptose ausgelöst (123). Da die Zellen für alle weiteren Versuche allerdings nur 10 min mit dem Antikörper stimuliert wurden, kann der Effekt keinen Einfluss auf die untersuchte Signaltransduktion besitzen.

Die Calcium-Messungen mit dem Zink-Chelator TPEN zeigen, dass die Sonde Fluo-4 wahrscheinlich auch unspezifisch intrazellulär Zink bindet. Viele Fluorophore binden nicht nur Calcium, sondern auch andere Metallionen wie Zink (124). Der Membran-permeable Chelator TPEN hat eine höhere Selektivität für Zink im Vergleich zum Calcium, wodurch eine Differenzierung zwischen beiden Ionen sehr einfach ist (18). Arslan et al. setzten TPEN ein um zu zeigen, dass Zink

die Messung des basalen Calciums mit dem Fluorophor Quin-2 stört. Dabei bindet Quin-2 Zink mit einer 3000fach höheren Affinität als Calcium, was zum Quenchen der Fluoreszenz und einer daraus folgenden Unterschätzung der freien Calcium-Konzentration führte (18).

Obwohl im Kontrollansatz Zink/Pyrithion nicht durch Fluo-4 detektiert wird, weisen die vorliegenden Daten der TPEN-Versuche daraufhin, dass Fluo-4 Zink detektiert. Dies konnte in Jurkat Zellen bereits gezeigt werden (125). Damit würde sowohl die Menge des basalen Calciums als auch die Menge des freigesetzten Calciums nach Stimulation überschätzt werden.

Vergleichbar zum Calcium wird nach TCR-Stimulation ebenfalls intrazellulär Zink freigesetzt. Der hohe Anstieg im freien Zink durch die Stimulation mit dem Phorbol ester PMA ist darauf zurückzuführen, dass nach PMA-Behandlung PKC-abhängig eine Zink-Freisetzung aus dem Kern und den Mitochondrien in das Cytosol erfolgt (109). Im Vergleich zur *in vitro* Zink-Stimulation ist das freigesetzte Zink in Jurkat Zellen und primären T-Zellen allerdings nicht relevant für die Aktivierung der MAPK p38 und ERK1/2, was die Western Blot Versuche mit dem Zink-Chelator TPEN nach Okt3- und PHA-Stimulation zeigen. Weder die p38 noch die ERK1/2 werden in ihrer Phosphorylierung beeinträchtigt. Die PBMC zeigen allerdings eine reduzierte Phosphorylierung der p38 und der ERK1/2 nach TPEN-Vorinkubation. PBMC bestehen als gemischte Zellpopulation aus T-Zellen, B-Zellen, Monocyten und NK-Zellen. Daher könnte eine mögliche Beeinflussung eines anderen Zelltyps durch die TPEN-Behandlung vermutet werden. Um dies auszuschließen wurde mit dem T-Zellspezifischen Antikörper Okt3 aktiviert. Während die T-Zellen in der PBMC-Zellpopulation allerdings unverändert in den Versuch eingesetzt wurden, wurden die primären T-Zellen über eine PHA-Stimulation mit anschließender IL-2-Inkubation angereichert. Vermutlich ist für eine erneute Zink-Freisetzung aus den intrazellulären Speichern und einen sichtbaren TPEN-Effekt nach Okt3-Stimulation nicht mehr ausreichend Zink vorhanden. Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Signalübertragung vom TCR bis zur Aktivierung der MAPK p38 und ERK1/2 kein intrazelluläres, freies Zink benötigt und Zink zumindest für diesen Signalweg nicht als Second Messenger fungiert.

Im Gegensatz zur TCR-Stimulation führt die Stimulation der T-Zellen mit Zink und dem Ionophor Pyrithion, welches einen raschen Anstieg von intrazellulärem Zink ermöglicht, zu einem abweichenden Aktivierungsprofil. Während die Lck und die p38 durch Zink/Pyrithion phosphoryliert werden, wird die JNK2 nicht aktiviert. Die durch den TCR aktivierte ERK1/2 wird durch eine Vorinkubation mit Zink/Pyrithion in ihrer Phosphorylierung konzentrationsabhängig inhibiert, während die p38 konzentrationsabhängig eine Signalzunahme verzeichnet. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Zink einen differentiellen Effekt auf die Phosphorylierung der MAPK hat.

Zur Aufklärung des molekularen Mechanismus der Zink-abhängigen Lck Phosphorylierung in T-Zellen, wurden einige Wirkmechanismen von Zink untersucht. Chvapil zeigte 1976, dass Zink einen

---

Einfluss auf die Lipidfluidität der Membranen hat (126). Eine daraus folgende Membranstabilisierung würde die Struktur und die Zusammensetzung von Oberflächenmolekülen stark beeinflussen (127). Die in den Lipid Rafts befindlichen Signalsosome würden demnach während der T-Zellaktivierung durch Inkubation mit Zink stabilisiert und damit ebenfalls die Aktivierung der Rezeptor-nahen Kinase Lck. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass die durch Zink induzierte Signaltransduktion nicht durch eine Stabilisierung der Lipid Raft Struktur hervorgerufen wird, während die Okt3 initiierte Signalweiterleitung nach Zerstörung der Lipid rafts mit M $\beta$ CD reduziert wird.

Die TCR-Signaltransduktion wird auf verschiedenen Ebenen durch Zink beeinflusst. Der TCR weist keine intrinsische Kinaseaktivität auf und ist in Bezug auf die Signalweiterleitung in die Zelle abhängig von der Src Kinase Lck. Die Lck wird auf unterschiedliche Weise durch Zink in ihrer Aktivität beeinflusst. Lck assoziiert Zink-abhängig an die beiden Corezeptoren CD4 und CD8 (69) und wird in Abwesenheit von Phosphatasen direkt durch Zink aktiviert (70). Diese direkte Aktivierung ist vermutlich auf eine Homodimerisierung zweier Lck Moleküle mit einer anschließenden Autophosphorylierung zurückzuführen, die innerhalb der Src-Familie für die Lck spezifisch ist (69, 71). Weiterhin inhibiert Zink Proteintyrosinphosphatasen (116). Die TCR-Signalweiterleitung und die Lck-Phosphorylierung werden in besonderem Maße durch PTPs reguliert (55). Diese PTPs gelten somit als potenzielle Ansatzpunkte des beobachteten Zink Effektes. Die membranständige PTP CD45 reguliert die Aktivität der Lck durch Dephosphorylierung des inhibierenden Tyrosins an Position 505. Zusätzlich fungiert die CD45 als negativer Regulator der Lck Aktivität durch Dephosphorylierung der Position 394 (55, 86). Wird die CD45 durch Zink inhibiert, hat dies demnach einen Einfluss auf beide Phosphorylierungspositionen im Enzym. Die Ergebnisse mit den CD45 defizienten Jurkat Zellen zeigen eindeutig, dass die Lck in CD45 Abwesenheit nicht mehr durch Zink/Pyrrithion phosphoryliert wird. Durch die vorliegende Arbeit konnte demnach gezeigt werden, dass die Regulation der Lck Aktivierung nach Zink/Pyrrithion Stimulation zusätzlich zu den bereits bekannten Mechanismen abhängig von der PTP CD45 ist.

Zink beeinflusst die Aktivierung der MAPK in verschiedenen Zellen. Während in C6 Gliomzellen der Ratte die ERK1/2 durch Zink und Pyrrithion aktiviert wird (82), erfolgt in Leukocyten eine Phosphorylierung beider MAPK, ERK1/2 und p38, durch Zink und Pyrrithion (83). Da noch kein direkter Zink-Effekt auf die MAPK Aktivität nachgewiesen werden konnte, werden die MAPK vermutlich über indirekte, Zink-abhängige Mechanismen reguliert. Kim und Kollegen erklären den aktivierenden Zink Effekt auf die MAPK in bronchialen Epithelzellen dadurch, dass MKPs, welche die Aktivität der MAPK durch Dephosphorylierung regulieren, durch Zink inhibiert werden (94). Die vorliegenden Ergebnisse in T-Zellen machen deutlich, dass die Dephosphorylierung der ERK1/2

durch Zink-Konzentrationen ab 1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  inhibiert wird. Bei der p38 zeigen erst höhere Konzentrationen einen inhibierenden Effekt. Zur Überprüfung der physiologischen Relevanz, wurde das freie Zink in den Proben mittels der Fluoreszenzsonde Fluo-Zin3 quantifiziert. Die Messung zeigt, dass das zugegebene Zink durch die im Lysat enthaltenen Proteine gepuffert wird. Die durch Zink beobachtete Dephosphorylierung der ERK1/2 erfolgt demnach im physiologischen, nanomolaren Konzentrationsbereich. Die Inhibition der MKPs erklärt dennoch nicht den beobachteten Zink-Effekt auf die p38.

Die in dieser Arbeit verwendeten Zink-Konzentrationen liegen zwar nicht im inhibitorischen Bereich aber über den physiologischen Konzentrationen. Die T-Zellen, die eine niedrigere intrazelluläre Zink-Konzentration aufweisen als z.B. Monocyten (119), reagieren daher nach Stimulation mit Zink und dem Ionophor Pyrithion mit einem kurzfristigen Anstieg an freiem Zink in der Zelle, dessen Konzentration normalerweise im pM bis nM Bereich liegt. Während das freie Zink nach TCR-Stimulation für die Signaltransduktion keine Rolle spielt, beeinflusst das zugegebene Zink die intrazelluläre Homöostase und die Signalweiterleitung. Im Falle der ERK1/2 verweisen die Daten auf eine MKP-Inhibition, während der Mechanismus der p38-Stimulation noch näher untersucht werden musste.

Da die p38 auch durch Okt3-Stimulation phosphoryliert wird, galt es zu prüfen, ob die Signaltransduktion über den TCR durch Zink beeinflusst wird. Die Daten zeigen jedoch, dass die Zink-induzierte Phosphorylierung der p38 weder CD3 abhängig ist noch ein T-Zellspezifisches Phänomen darstellt. Somit scheint der molekulare Mechanismus intrazellulär abzulaufen und Zelltypübergreifend wirksam zu sein.

Durch eine Zink-abhängige Aktivierung der Lck könnte unter Berücksichtigung der alternativen p38 Aktivierung die Phosphorylierung der MAPK p38 erklärt werden. Die p38 wird nach TCR-Stimulation über die klassische MAPK-Kaskade aktiviert oder über die Lck und die nachgeschaltete Syk Kinase ZAP70, was in T-Zellen als alternative Aktivierung bezeichnet wird (79). Dabei aktiviert die Lck die ZAP70 Kinase, welche die p38 an dem alternativen Tyrosinrest 323 phosphoryliert. Dadurch wird eine Autophosphorylierung der p38 an Tyrosin 182 und Threonin 180 ermöglicht. Zur Überprüfung einer alternativen p38 Aktivierung nach Zink/Pyrrithion Stimulation wurde mit Lck und ZAP70 defizienten Zellen gearbeitet. Allerdings konnte auch in diesen Zellen eine Zink/Pyrrithion-abhängige Stimulation der p38 nachgewiesen werden. Der Einsatz des Lck Inhibitors PP2 und die Kontrolle der alternativen Tyrosin Phosphorylierung an Position 323 bestätigten die Ergebnisse mit den defizienten Zelllinien. Die Zunahme der p38 Phosphorylierung nach Zink/Pyrrithion Stimulation kann demnach nicht durch die alternative Aktivierung erklärt werden.

---

Eine weitere mögliche Erklärung für den beobachteten Zink-Effekt auf die MAPK p38 und ERK1/2 stellt der PKA Signalweg dar. In Monocyten inhibiert Zink reversibel die PDEs 1, 3 und 4, von denen die PDEs 3 und 4 zwei wichtige Isoformen in T-Zellen darstellen (99, 100). Zusätzlich zu den PDEs wird die Adenylatzyklase (AC) durch Zink inhibiert, während die Synthese von cGMP durch die Guanylatzyklase (GC) nicht beeinflusst wird. Die PDE-Inhibition führt zu einer Akkumulation des zyklischen Nukleotids cGMP mit einer anschließenden Kreuzaktivierung der PKA (102). In T-Zellen beeinflusst die PKA die MAPK Aktivität und inhibiert den Raf/MEK/ERK Signalweg, wodurch die Zellproliferation beeinträchtigt wird (97, 98). Über den PKA-Signalweg könnte demnach gleichzeitig der Raf/MEK/ERK Signalweg inhibiert und die p38/CREB Kaskade aktiviert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, dass der Transkriptionsfaktor CREB p38-abhängig durch Zink/Pyrrithion aktiviert und die TCR-stimulierte ERK1/2 durch Zink/Pyrrithion Inkubation inhibiert wird. Zusätzlich hat Zink in T-Zellen eine anti-proliferative Funktion und führt zur Akkumulation intrazellulären cGMPs, die vermutlich auf eine PDE-Inhibition zurückzuführen ist. Die Versuche mit den unterschiedlichen Aktivatoren und Inhibitoren des PKA-Signalweges im Western Blot schließen allerdings eine Zink-abhängige PDE Inhibition mit anschließender PKA-Aktivierung als molekularen Mechanismus für den differentiellen Zink Effekt aus.

Da in dieser Arbeit in T-Zellen ein Zink-abhängiger Einfluss auf die MAPK p38 und ERK1/2 gezeigt werden konnte, lag die Frage nahe, was für einen Einfluss der Zink-Effekt auf die Funktionalität der T-Zellen hat. Der Transkriptionsfaktor CREB, der p38-abhängig durch Zink/Pyrrithion aktiviert wird, kontrolliert Th1 Immunantworten durch die Induktion der Th1 Cytokinexpression (114, 128). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, dass die Stimulation der T-Zellen mit Zink/Pyrrithion die Expression der Th1 Cytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  induziert, während die Expression des Th2 Cytokins IL-4 nicht beeinflusst wird. Dabei ist die Induktion der Th1-Cytokinexpression p38-abhängig und läuft vermutlich über die Stimulation des Transkriptionsfaktors CREB, der ebenfalls durch Zink/Pyrrithion aktiviert wird. Die Induktion der Th1-Cytokinexpression verdeutlicht damit den Zusammenhang zwischen Zink-Supplementierung und p38-Aktivierung. In Pankreas Zellen wird CREB in Abhängigkeit von dem Zinkimporter Zip4 phosphoryliert. Dies verdeutlicht einen Zusammenhang zwischen Zink-Influx und CREB-Aktivierung (129). Cousins und seine Kollegen konnten zeigen, dass nach TCR-Stimulation Zink die Phosphatase Calcineurin inhibiert und somit die Aktivierung von CREB mit anschließender IFN- $\gamma$  Expression induziert (114). Die zusätzlich in dieser Arbeit beobachtete Induktion der CREB Phosphorylierung durch Zink/Pyrrithion in T-Zellen macht deutlich, dass Zink sowohl auf die Phosphorylierung als auch auf die Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors einen Einfluss hat. Demnach können beide Mechanismen einen Einfluss auf die Th1-Cytokinexpression haben. Nach Stimulation der T-Zellen über den TCR mit Okt3

---

werden die Cytokine IFN- $\gamma$  und IL-4 in ihrer Expression induziert. Durch Inkubation der Zellen mit dem PDE Inhibitor IBMX kombiniert mit dem AC-Aktivator FSK erfolgt eine Inhibition der Cytokinexpression. Da jedoch durch Zink/Pyrithion keine Inhibition stattfindet, wurde erneut bestätigt, dass dem molekularen Mechanismus keine Zink-abhängige PDE-Inhibition zugrunde liegt. Während auf mRNA-Ebene deutlich Zink-abhängige Effekte detektierbar sind, zeigen die Daten der IL-2- und IFN- $\gamma$ -Produktion auf Protein-Ebene keine signifikanten Unterschiede. Die p38 phosphoryliert unter anderem die beiden Kinasen MK2 und MK3, welche die eEF2 Kinase aktivieren. Diese phosphoryliert wiederum den eukaryotischen Elongationsfaktor (eEF2), der dadurch inaktiviert wird (80, 130). Durch die Zink-abhängige Aktivierung der p38 könnte auf diesem Wege Einfluss auf die Translation genommen werden, was die Ergebnisse auf Protein-Ebene erklären würde.

Die PI3 Kinase ist ein negativer Regulator der GSK-3 $\beta$ , welche den Transkriptionsfaktor NFAT-1 phosphoryliert und inaktiviert. Eine Zink-abhängige Lck Aktivierung mit anschließender Stimulation der PI3 Kinase würde demnach zu einer Aktivierung von NFAT-1 führen. Die Ergebnisse mit dem PI3 Kinase Inhibitor Wortmannin im Western Blot zeigen allerdings, dass Zink in der PI3 Kinase vermittelten Regulation keinen Einfluss auf die NFAT-1 Phosphorylierung hat. Vielmehr scheint Zink die Phosphatase Calcineurin direkt zu inhibieren, was in Jurkat Zellen unter anderem zu einer Reduktion der IL-2 Expression führen kann (115). Die Zink-abhängige Inhibition von Calcineurin und die daraus resultierende Inhibition des Transkriptionsfaktors NFAT würden einen negativen Einfluss auf die IL-2 Expression bedeuten. Da in dieser Arbeit aber eine Zink-abhängige Stimulation der IL-2 Expression detektiert wurde, müssen andere, positive Zink-abhängige Mechanismen wie z.B. die Aktivierung von CREB die NFAT-Inhibition überlagern.

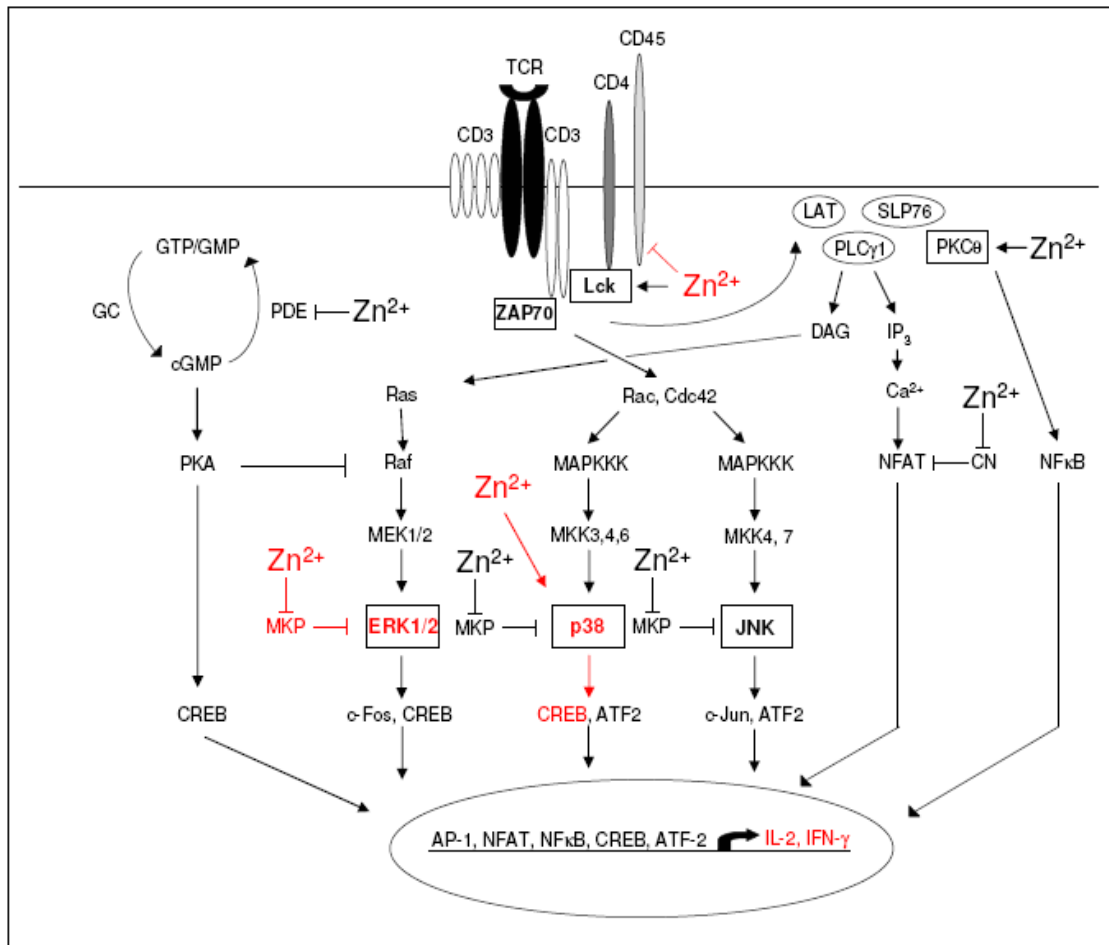
Der NF $\kappa$ B Signalweg wird in T-Zellen durch die PKC $\theta$  vermittelt. Eine Behandlung mit Zink stimuliert unterschiedliche Ebenen der PKC-Aktivierung. Zum einen wird die Kinaseaktivität erhöht und die Affinität zu Phorbolestern und zum anderen wird die Bindung an die Plasmamembran gefördert (131, 132). Durch die Aktivierung der PKC könnte Zink demnach einen Einfluss auf die NF $\kappa$ B-Signaltransduktion haben. Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B ist an dem beobachteten Zink-Effekt wahrscheinlich nicht direkt beteiligt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass in der TH0-Zelllinie HUT-78 Zink die I $\kappa$ B-Phosphorylierung und das IKK $\alpha$  Protein erhöht (112). Die Ergebnisse in dieser Arbeit weisen daraufhin, dass Zink einen aktivierenden Einfluss auf die IKK $\beta$  hat. Die Transkriptionsfaktoren NFAT und NF $\kappa$ B konnten nach Stimulation der T-Zellen mit Okt3 nicht vollständig aktiviert werden. In weiterführenden Versuchen sollte daher mit costimulierenden Agenzien gearbeitet werden.



Ziel dieser Arbeit war es, den molekularen Mechanismus der Zink/Pyrithion Stimulation im Vergleich zur TCR-induzierten Signaltransduktion zu untersuchen. Dabei konnte festgestellt werden, dass das nach TCR-Stimulation freigesetzte Zink keinen Effekt auf die Signaltransduktion hat. Im Gegensatz dazu hat die *in vitro* Verabreichung von Zink/Pyrithion einen differentiellen Einfluss auf die Aktivität der Src Kinase Lck und der MAPK p38, JNK2 und ERK1/2. Das Ionophor Pyrithion, welches selbst keinen Einfluss auf die Signaltransduktion zeigte, sorgt für einen raschen Anstieg intrazellulären Zinks. Dadurch wird die intrazelluläre Zink-Konzentration, deren Homöostase normalerweise durch das Zusammenspiel von Expression, Lokalisation und Affinität von Zinktransportern und Zink-bindenden Proteinen eng reguliert wird, kurzfristig erhöht. Dieser temporäre Anstieg scheint im Gegensatz zum TCR-freigesetzten Zink und zu Zink-stimulierten Ansätzen ohne Pyrithion (Daten nicht dargestellt) auf die p38-abhängige Signaltransduktion Einfluss zu nehmen, ohne dabei die Vitalität der Zellen zu beeinträchtigen. Dabei sind höhere Zink-Konzentrationen, wie sie vorübergehend nach Zink/Pyrithion Stimulation auftreten, nicht ungewöhnlich. In Zink-reichen Geweben wie der Prostata liegt Zink sogar in millimolaren Konzentrationen vor (Vartsky et al., 2003). Uzzo et al. zeigten 2006, dass Zink-Supplementierung in humanen Prostata-Krebszelllinien unter anderem zur Phosphorylierung der MAPK p38 führt. Demnach scheint die ERK1/2 eher durch niedrigere Zink-Konzentrationen beeinflusst zu werden (82), während die p38 in ihrer Aktivität durch kurzfristig erhöhte Zink-Konzentrationen reguliert wird.

Mehrere bekannte Wirkmechanismen von Zink in anderen Zellen wurden in dieser Arbeit für T-Zellen überprüft (Abb. 5.1). Dabei wurde gezeigt, dass der beobachtete Zink-Effekt nicht T-Zellspezifisch ist und intrazellulär abläuft. Dennoch scheint der Zink-Effekt in T-Zellen auf keinen bisher bekannten molekularen Mechanismus zurückzuführen zu sein. Dass Zink sowohl Phosphorylierung als auch Dephosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie CREB beeinflusst, zeigt, dass der initiierte Signalweg komplex ist. Dies verdeutlicht, dass der Zink-Effekt vermutlich auf eine Wechselwirkung verschiedener Mechanismen zurückzuführen ist.

Die vorliegende Studie trägt dazu bei, die Rolle von Zink in der Signaltransduktion von T-Zellen zu charakterisieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Th1-Cytokinexpression nach Zink/Pyrithion Stimulation p38-abhängig ist. Die zukünftige Aufklärung des genauen Mechanismus für die beobachtete Wiederherstellung optimaler Immunfunktionen Zink-defizienter Menschen nach Zink-Supplementation würde helfen den Einfluss von Zink auf das Th1/Th2-Gleichgewicht nachvollziehen zu können.



**Abb. 5.1: Übersicht des Zink-Effektes in der Signaltransduktion.** Zink beeinflusst unterschiedliche Signalwege. Die Lck-Assoziation an den Corezeptor ist Zink-abhängig und induziert eine direkte Aktivierung der Lck durch Homodimerisierung zweier Lck Moleküle. Die Regulation der Lck Aktivität nach Zink/Pyrithion Stimulation ist abhängig von der PTP CD45. Die alternative Aktivierung der p38 in T-Zellen, welche über die Lck und die ZAP70 läuft, wird nicht durch Zink initiiert. Zink inhibiert in Monocyten PDEs und induziert über die Akkumulation zyklischer Nucleotide wie cGMP die Aktivierung der PKA. Es beeinflusst in T-Zellen differenziell die Aktivität der MAPK p38, JNK2 und ERK1/2 und die Signaltransduktion durch NFκB und NFAT. Dabei regulieren niedrige Zink-Konzentrationen die ERK1/2-Phosphorylierung durch Inhibition von MKPs, während höhere Zink-Konzentrationen p38-abhängig den Transkriptionsfaktor CREB aktivieren und die Expression der Th1 Cytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  induzieren. Die in Rot dargestellten Komponenten geben die in dieser Arbeit erstmals beschriebenen Zusammenhänge in der T-Zell Signaltransduktion nach Zink/Pyrithion Stimulation wieder (eigene Darstellung).

## 6 Zusammenfassung

Zink ist für die zellulären Funktionen von T-Zellen essentiell. Ein Zink-Mangel beeinträchtigt u.a. die T-Zellfunktionen. Zum Beispiel ist das Th1/Th2 Gleichgewicht gestört, was zu einer reduzierten Produktion von Th1-Cytokinen wie IFN- $\gamma$  und IL-2 führt. Eine Zink-Supplementierung *in vivo* führt zur Wiederherstellung der Immunfunktionen und zu einem Ausgleich zwischen Th1- und Th2-Zellen.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollte die Rolle von Zink in der Signaltransduktion von T-Zellen charakterisiert werden. Dabei konnte anhand von Phosphorylierungsnachweisen in primären T-Zellen und der humanen T-Zelllinie Jurkat festgestellt werden, dass die gängige Aktivierung über den TCR und eine Stimulation mit Zink in Kombination mit dem Ionophor Pyrithion zu einer unterschiedlichen Aktivierung der Kinasen Lck, p38, JNK2 und ERK1/2 führt. Die Untersuchungen zeigen, dass TCR-stimulierte T-Zellen intrazellulär Zink freisetzen, welches selbst keinen Einfluss auf die Signalweiterleitung in die Zelle hat. Werden die Zellen allerdings mit Zink/Pyrithion stimuliert, werden die Kinasen Lck und p38 aktiviert, während die TCR-stimulierte ERK1/2-Phosphorylierung inhibiert wird. Um diesen differentiellen Zink-Effekt aufzuklären, wurden im Anschluss verschiedene, in anderen Zelltypen bereits bekannte Wirkmechanismen von Zink hinsichtlich ihrer Gültigkeit in T-Zellen untersucht. Die Lck wird durch Zink in ihrer Aktivität auf unterschiedlichen Ebenen beeinflusst. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung nach Zink/Pyrithion Stimulation zusätzlich abhängig ist von der PTP CD45. Desweiteren ist der beobachtete Zink-Effekt unabhängig von CD3 und stellt damit ein intrazelluläres Ereignis dar. Eine Inhibition von MAPK Phosphatasen durch Zink als mögliche Erklärung für die p38-Aktivierung ist auszuschließen. Eine Zink-induzierte Phosphorylierung der p38 durch die alternative Aktivierung konnte durch Inhibitorstudien und den Einsatz von defizienten Zelllinien ebenfalls ausgeschlossen werden. Auch die Beteiligung des PKA-Signalweges konnte unter Verwendung verschiedener Aktivatoren und Inhibitoren ausgeschlossen werden.

Nach Überprüfung unterschiedlicher Signalwege muss festgehalten werden, dass der molekulare Mechanismus des beobachteten Zink-Effektes in T-Zellen von den gängigen Mechanismen in anderen Zellen abweicht. Trotz unvollständiger Aufklärung des Mechanismus, konnte ein Zusammenhang zwischen der Induktion von Th1-Antworten und der Aktivierung der p38/CREB Kaskade nachgewiesen werden. Durch die vorliegende Arbeit wird erstmals der Einfluss von Zink auf Th1-Zellen mit der Aktivierung der MAPK p38 in Zusammenhang gebracht. Die weitere Aufklärung des molekularen Mechanismus könnte Einfluss auf die Behandlung T-Zell vermittelter Erkrankungen haben und demnach neue Therapieperspektiven eröffnen.

---

## 7 Literatur

1. Janeway C.A., Travers P., Walport M. & Shlomchik M. (2002) Immunologie., 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag.
2. Fraser, I. P., Koziel, H. & Ezekowitz, R. A. (1998) The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin. Immunol.* 10: 363-372.
3. DeVries, M. E., Ran, L. & Kelvin, D. J. (1999) On the edge: the physiological and pathophysiological role of chemokines during inflammatory and immunological responses. *Semin. Immunol.* 11: 95-104.
4. Kirchner H, Kruse A, Neustock P & Rink L (1993) Cytokine and Interferone., 1. Auflage, Akademischer Verlag Heidelberg.
5. Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7: 145-173.
6. Raulin J (1869) Etudes chimiques sur la vegetation (Chemical studies on plants). *Ann. Sci. Natl. Botan. Biol. Veget.* 11: 293-299.
7. Todd WK, Elvelym A & Hart EB (1934) Zinc in the nutrition of the rat. *Am. J. Physiol.* 107: 146-156.
8. Rink, L. & Gabriel, P. (2001) Extracellular and immunological actions of zinc. *Biometals* 14: 367-383.
9. Favier A & Favier M (1990) Consequences des deficits en zinc durant la grossesse pour la mère et le nouveau-ne. *Rev. Fr. Gynecol. Obstet.* 85: 13-27.
10. Mills CF (1989) Zinc in human biology. London: Springer Verlag.
11. Scott, B. J. & Bradwell, A. R. (1983) Identification of the serum binding proteins for iron, zinc, cadmium, nickel, and calcium. *Clin. Chem.* 29: 629-633.
12. Vallee, B. L. & Falchuk, K. H. (1993) The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev.* 73: 79-118.
13. Rink, L. & Gabriel, P. (2000) Zinc and the immune system. *Proc. Nutr. Soc.* 59: 541-552.
14. Lee, H. H., Prasad, A. S., Brewer, G. J. & Owyang, C. (1989) Zinc absorption in human small intestine. *Am. J. Physiol* 256: G87-G91.
15. Van Wouwe, J. P. & Uijlenbroek, J. J. (1994) The role of the pancreas in the regulation of zinc status. *Biol. Trace Elem. Res.* 42: 143-149.
16. Klug, A. & Rhodes, D. (1987) Zinc fingers: a novel protein fold for nucleic acid recognition. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 52: 473-482.
17. Smeyers-Verbeke, J., May, C., Drochmans, P. & Massart, D. L. (1977) The determination of Cu, Zn, and Mn in subcellular rat liver fractions. *Anal. Biochem.* 83: 746-753.

18. Arslan, P., Di, V. F., Beltrame, M., Tsien, R. Y. & Pozzan, T. (1985) Cytosolic Ca<sup>2+</sup> homeostasis in Ehrlich and Yoshida carcinomas. A new, membrane-permeant chelator of heavy metals reveals that these ascites tumor cell lines have normal cytosolic free Ca<sup>2+</sup>. *J. Biol. Chem.* 260: 2719-2727.
19. Haase, H. & Beyersmann, D. (1999) Uptake and intracellular distribution of labile and total Zn(II) in C6 rat glioma cells investigated with fluorescent probes and atomic absorption. *Biometals* 12: 247-254.
20. Haase, H., Hebel, S., Engelhardt, G. & Rink, L. (2006) Flow cytometric measurement of labile zinc in peripheral blood mononuclear cells. *Anal. Biochem.* 352: 222-230.
21. Wellinghausen, N. & Rink, L. (1998) The significance of zinc for leukocyte biology. *J. Leukoc. Biol.* 64: 571-577.
22. Prasad, A. S., Miale, A., Jr., Farid, Z., Sandstead, H. H. & Schulert, A. R. (1963) Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypogonadism. *J. Lab Clin. Med.* 61: 537-549.
23. Wang, K., Zhou, B., Kuo, Y. M., Zemansky, J. & Gitschier, J. (2002) A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. *Am. J. Hum. Genet.* 71: 66-73.
24. Neldner, K. H. & Hambidge, K. M. (1975) Zinc therapy of acrodermatitis enteropathica. *N. Engl. J. Med.* 292: 879-882.
25. Halsted, J. A. & Smith, J. C., Jr. (1970) Plasma-zinc in health and disease. *Lancet* 1: 322-324.
26. Grüngreiff K (1993) Zink: Bedeutung in der ärztlichen Praxis., 1. Auflage ed., Köhler Pharma GmbH, Alsbach.
27. Fosmire, G. J. (1990) Zinc toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 51: 225-227.
28. Plum LM, Rink L & Haase H (2010) The essential toxin: impact of zinc on human health. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7: 1342-1365.
29. Bao, B., Prasad, A. S., Beck, F. W. & Godmere, M. (2003) Zinc modulates mRNA levels of cytokines. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 285: E1095-E1102.
30. Bulgarini, D., Habetswallner, D., Boccoli, G., Montesoro, E., Camagna, A., Mastroberardino, G., Rosania, C., Testa, U. & Peschle, C. (1989) Zinc modulates the mitogenic activation of human peripheral blood lymphocytes. *Ann. Ist. Super. Sanita* 25: 463-470.
31. Fernandes, G., Nair, M., Onoe, K., Tanaka, T., Floyd, R. & Good, R. A. (1979) Impairment of cell-mediated immunity functions by dietary zinc deficiency in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76: 457-461.
32. Fraker, P. J., Osati-Ashtiani, F., Wagner, M. A. & King, L. E. (1995) Possible roles for glucocorticoids and apoptosis in the suppression of lymphopoiesis during zinc deficiency: a review. *J. Am. Coll. Nutr.* 14: 11-17.
33. Osati-Ashtiani, F., King, L. E. & Fraker, P. J. (1998) Variance in the resistance of murine early bone marrow B cells to a deficiency in zinc. *Immunology* 94: 94-100.

34. Prasad, A. S. (2000) Effects of zinc deficiency on Th1 and Th2 cytokine shifts. *J. Infect. Dis.* 182 Suppl 1: S62-S68.
35. Allen, J. I., Perri, R. T., McClain, C. J. & Kay, N. E. (1983) Alterations in human natural killer cell activity and monocyte cytotoxicity induced by zinc deficiency. *J. Lab Clin. Med.* 102: 577-589.
36. Driessen, C., Hirv, K., Rink, L. & Kirchner, H. (1994) Induction of cytokines by zinc ions in human peripheral blood mononuclear cells and separated monocytes. *Lymphokine Cytokine Res.* 13: 15-20.
37. Wellinghausen, N., Driessen, C. & Rink, L. (1996) Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells by zinc and related cations. *Cytokine* 8: 767-771.
38. Wellinghausen, N., Fischer, A., Kirchner, H. & Rink, L. (1996) Interaction of zinc ions with human peripheral blood mononuclear cells. *Cell Immunol.* 171: 255-261.
39. Flynn, A. (1984) Control of in vitro lymphocyte proliferation by copper, magnesium and zinc deficiency. *J. Nutr.* 114: 2034-2042.
40. Fraker, P. J. & Telford, W. G. (1997) A reappraisal of the role of zinc in life and death decisions of cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 215: 229-236.
41. Pasquale-Jardieu, P. & Fraker, P. J. (1984) Interference in the development of a secondary immune response in mice by zinc deprivation: persistence of effects. *J. Nutr.* 114: 1762-1769.
42. Fraker, P. J., Pasquale-Jardieu, P., Zwickl, C. M. & Luecke, R. W. (1978) Regeneration of T-cell helper function in zinc-deficient adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 75: 5660-5664.
43. Moulder, K. & Steward, M. W. (1989) Experimental zinc deficiency: effects on cellular responses and the affinity of humoral antibody. *Clin. Exp. Immunol.* 77: 269-274.
44. Bach JF (1981) The multi-faceted zinc dependency of the immune system. *Immunol. Today* 4: 225-227.
45. Bach JF (1983) Thymulin (FTS-Zn). *Clin. Immunol. Allerg.* 3: 133-150.
46. Saha, A. R., Hadden, E. M. & Hadden, J. W. (1995) Zinc induces thymulin secretion from human thymic epithelial cells in vitro and augments splenocyte and thymocyte responses in vivo. *Int. J. Immunopharmacol.* 17: 729-733.
47. Coto, J. A., Hadden, E. M., Sauro, M., Zorn, N. & Hadden, J. W. (1992) Interleukin 1 regulates secretion of zinc-thymulin by human thymic epithelial cells and its action on T-lymphocyte proliferation and nuclear protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89: 7752-7756.
48. Simkin, P. A. (1976) Oral zinc sulphate in rheumatoid arthritis. *Lancet* 2: 539-542.
49. Wellinghausen, N., Martin, M. & Rink, L. (1997) Zinc inhibits interleukin-1-dependent T cell stimulation. *Eur. J. Immunol.* 27: 2529-2535.
50. Stoltze, L., Nussbaum, A. K., Sijts, A., Emmerich, N. P., Kloetzel, P. M. & Schild, H. (2000) The function of the proteasome system in MHC class I antigen processing. *Immunol. Today* 21: 317-319.

51. Long, E. O. (1992) Antigen processing for presentation to CD4+ T cells. *New Biol.* 4: 274-282.
52. Stevanovic, S. (2002) Structural basis of immunogenicity. *Transpl. Immunol.* 10: 133-136.
53. Cherukuri, A., Dykstra, M. & Pierce, S. K. (2001) Floating the raft hypothesis: lipid rafts play a role in immune cell activation. *Immunity.* 14: 657-660.
54. Horejsi, V. (2003) The roles of membrane microdomains (rafts) in T cell activation. *Immunol. Rev.* 191: 148-164.
55. Mustelin, T. & Tasken, K. (2003) Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochem. J.* 371: 15-27.
56. Huppa, J. B. & Davis, M. M. (2003) T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 973-983.
57. Lindquist, J. A., Simeoni, L. & Schraven, B. (2003) Transmembrane adapters: attractants for cytoplasmic effectors. *Immunol. Rev.* 191: 165-182.
58. Huang, Y. & Wange, R. L. (2004) T cell receptor signaling: beyond complex complexes. *J. Biol. Chem.* 279: 28827-28830.
59. Palacios, E. H. & Weiss, A. (2004) Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene* 23: 7990-8000.
60. Wange, R. L. & Samelson, L. E. (1996) Complex complexes: signaling at the TCR. *Immunity.* 5: 197-205.
61. Williams, J. C., Wierenga, R. K. & Saraste, M. (1998) Insights into Src kinase functions: structural comparisons. *Trends Biochem. Sci.* 23: 179-184.
62. Cooke, M. P. & Perlmutter, R. M. (1989) Expression of a novel form of the fyn proto-oncogene in hematopoietic cells. *New Biol.* 1: 66-74.
63. Thomas, S. M. & Brugge, J. S. (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 513-609.
64. Gauen, L. K., Zhu, Y., Letourneur, F., Hu, Q., Bolen, J. B., Matis, L. A., Klausner, R. D. & Shaw, A. S. (1994) Interactions of p59fyn and ZAP-70 with T-cell receptor activation motifs: defining the nature of a signalling motif. *Mol. Cell Biol.* 14: 3729-3741.
65. Samelson, L. E., Phillips, A. F., Luong, E. T. & Klausner, R. D. (1990) Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87: 4358-4362.
66. Thomas, M. L. & Brown, E. J. (1999) Positive and negative regulation of Src-family membrane kinases by CD45. *Immunol. Today* 20: 406-411.
67. Ashwell, J. D. & D'Oro, U. (1999) CD45 and Src-family kinases: and now for something completely different. *Immunol. Today* 20: 412-416.
68. Hermiston, M. L., Xu, Z. & Weiss, A. (2003) CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 107-137.

- 
69. Kim, P. W., Sun, Z. Y., Blacklow, S. C., Wagner, G. & Eck, M. J. (2003) A zinc clasp structure tethers Lck to T cell coreceptors CD4 and CD8. *Science* 301: 1725-1728.
  70. Pernelle, J. J., Creuzet, C., Loeb, J. & Gacon, G. (1991) Phosphorylation of the lymphoid cell kinase p56lck is stimulated by micromolar concentrations of Zn<sup>2+</sup>. *FEBS Lett.* 281: 278-282.
  71. Romir, J., Lilie, H., Egerer-Sieber, C., Bauer, F., Sticht, H. & Muller, Y. A. (2007) Crystal structure analysis and solution studies of human Lck-SH3; zinc-induced homodimerization competes with the binding of proline-rich motifs. *J. Mol. Biol.* 365: 1417-1428.
  72. Klein, C., Sunahara, R. K., Hudson, T. Y., Heyduk, T. & Howlett, A. C. (2002) Zinc inhibition of cAMP signaling. *J. Biol. Chem.* 277: 11859-11865.
  73. Sun, G. & Budde, R. J. (1999) Substitution studies of the second divalent metal cation requirement of protein tyrosine kinase CSK. *Biochemistry* 38: 5659-5665.
  74. Vang, T., Torgersen, K. M., Sundvold, V., Saxena, M., Levy, F. O., Skalhegg, B. S., Hansson, V., Mustelin, T. & Tasken, K. (2001) Activation of the COOH-terminal Src kinase (Csk) by cAMP-dependent protein kinase inhibits signaling through the T cell receptor. *J. Exp. Med.* 193: 497-507.
  75. Pearson, G., Robinson, F., Beers, G. T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K. & Cobb, M. H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22: 153-183.
  76. Chang, L. & Karin, M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37-40.
  77. Davis, R. J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103: 239-252.
  78. Schaeffer, H. J. & Weber, M. J. (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell Biol.* 19: 2435-2444.
  79. Ashwell, J. D. (2006) The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 532-540.
  80. Roux, P. P. & Blenis, J. (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 320-344.
  81. Haase, H. & Rink, L. (2009) Functional significance of zinc-related signaling pathways in immune cells. *Annu. Rev. Nutr.* 29: 133-152.
  82. Haase, H. & Maret, W. (2005) Fluctuations of cellular, available zinc modulate insulin signaling via inhibition of protein tyrosine phosphatases. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 19: 37-42.
  83. Haase, H., Ober-Blobaum, J. L., Engelhardt, G., Hebel, S., Heit, A., Heine, H. & Rink, L. (2008) Zinc signals are essential for lipopolysaccharide-induced signal transduction in monocytes. *J. Immunol.* 181: 6491-6502.
  84. Denu, J. M. & Dixon, J. E. (1998) Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2: 633-641.
  85. Zhou, G., Denu, J. M., Wu, L. & Dixon, J. E. (1994) The catalytic role of Cys124 in the dual specificity phosphatase VHR. *J. Biol. Chem.* 269: 28084-28090.



86. Mustelin, T., Vang, T. & Bottini, N. (2005) Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 43-57.
87. Camps, M., Nichols, A. & Arkinstall, S. (2000) Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB J.* 14: 6-16.
88. Duchateau, J., Delespesse, G. & Vereecke, P. (1981) Influence of oral zinc supplementation on the lymphocyte response to mitogens of normal subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 34: 88-93.
89. Haase, H. & Maret, W. (2003) Intracellular zinc fluctuations modulate protein tyrosine phosphatase activity in insulin/insulin-like growth factor-1 signaling. *Exp. Cell Res.* 291: 289-298.
90. Hardwick, J. S. & Sefton, B. M. (1997) The activated form of the Lck tyrosine protein kinase in cells exposed to hydrogen peroxide is phosphorylated at both Tyr-394 and Tyr-505. *J. Biol. Chem.* 272: 25429-25432.
91. Ostergaard, H. L., Shackelford, D. A., Hurley, T. R., Johnson, P., Hyman, R., Sefton, B. M. & Trowbridge, I. S. (1989) Expression of CD45 alters phosphorylation of the lck-encoded tyrosine protein kinase in murine lymphoma T-cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86: 8959-8963.
92. Pingel, J. T. & Thomas, M. L. (1989) Evidence that the leukocyte-common antigen is required for antigen-induced T lymphocyte proliferation. *Cell* 58: 1055-1065.
93. Maret, W., Jacob, C., Vallee, B. L. & Fischer, E. H. (1999) Inhibitory sites in enzymes: zinc removal and reactivation by thionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96: 1936-1940.
94. Kim, Y. M., Reed, W., Wu, W., Bromberg, P. A., Graves, L. M. & Samet, J. M. (2006) Zn<sup>2+</sup>-induced IL-8 expression involves AP-1, JNK, and ERK activities in human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 290: L1028-L1035.
95. Kaltenberg, J., Plum, L. M., Ober-Blobaum, J. L., Honscheid, A., Rink, L. & Haase, H. (2010) Zinc signals promote IL-2-dependent proliferation of T cells. *Eur. J. Immunol.* 40: 1496-1503.
96. Torgersen, K. M., Vang, T., Abrahamsen, H., Yaqub, S. & Tasken, K. (2002) Molecular mechanisms for protein kinase A-mediated modulation of immune function. *Cell Signal.* 14: 1-9.
97. Bloom, T. J. & Beavo, J. A. (1996) Identification and tissue-specific expression of PDE7 phosphodiesterase splice variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93: 14188-14192.
98. Novak, T. J. & Rothenberg, E. V. (1990) cAMP inhibits induction of interleukin 2 but not of interleukin 4 in T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87: 9353-9357.
99. Jimenez, J. L., Punzon, C., Navarro, J., Munoz-Fernandez, M. A. & Fresno, M. (2001) Phosphodiesterase 4 inhibitors prevent cytokine secretion by T lymphocytes by inhibiting nuclear factor-kappaB and nuclear factor of activated T cells activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299: 753-759.
100. von Bulow, V., Rink, L. & Haase, H. (2005) Zinc-mediated inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity and expression suppresses TNF-alpha and IL-1 beta production in monocytes by elevation of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *J. Immunol.* 175: 4697-4705.

101. Gao, X., Du, Z. & Patel, T. B. (2005) Copper and zinc inhibit Galphas function: a nucleotide-free state of Galphas induced by Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>. *J. Biol. Chem.* 280: 2579-2586.
102. von Bulow, V., Dubben, S., Engelhardt, G., Hebel, S., Plumakers, B., Heine, H., Rink, L. & Haase, H. (2007) Zinc-dependent suppression of TNF-alpha production is mediated by protein kinase A-induced inhibition of Raf-1, I kappa B kinase beta, and NF-kappa B. *J. Immunol.* 179: 4180-4186.
103. Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J. & Rao, A. (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 17: 2205-2232.
104. Huang, J., Zhang, D., Xing, W., Ma, X., Yin, Y., Wei, Q. & Li, G. (2008) An approach to assay calcineurin activity and the inhibitory effect of zinc ion. *Anal. Biochem.* 375: 385-387.
105. Klee, C. B. & Krinks, M. H. (1978) Purification of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase inhibitory protein by affinity chromatography on activator protein coupled to Sepharose. *Biochemistry* 17: 120-126.
106. Pallen, C. J. & Wang, J. H. (1984) Regulation of calcineurin by metal ions. Mechanism of activation by Ni<sup>2+</sup> and an enhanced response to Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *J. Biol. Chem.* 259: 6134-6141.
107. Takahashi, K., Akaishi, E., Abe, Y., Ishikawa, R., Tanaka, S., Hosaka, K. & Kubohara, Y. (2003) Zinc inhibits calcineurin activity in vitro by competing with nickel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307: 64-68.
108. Weil, R. & Israel, A. (2006) Deciphering the pathway from the TCR to NF-kappaB. *Cell Death. Differ.* 13: 826-833.
109. Csermely, P. & Somogyi, J. (1989) Zinc as a possible mediator of signal transduction in T lymphocytes. *Acta Physiol Hung.* 74: 195-199.
110. Zalewski, P. D., Forbes, I. J., Giannakis, C., Cowled, P. A. & Betts, W. H. (1990) Synergy between zinc and phorbol ester in translocation of protein kinase C to cytoskeleton. *FEBS Lett.* 273: 131-134.
111. Herbein, G., Varin, A. & Fulop, T. (2006) NF-kappaB, AP-1, Zinc-deficiency and aging. *Biogerontology.* 7: 409-419.
112. Bao, B., Prasad, A. S., Beck, F. W. & Sarkar, F. H. (2007) Zinc up-regulates NF-kappaB activation via phosphorylation of IkappaB in HUT-78 (Th0) cells. *FEBS Lett.* 581: 4507-4511.
113. Gryniewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R. Y. (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450.
114. Aydemir, T. B., Liuzzi, J. P., McClellan, S. & Cousins, R. J. (2009) Zinc transporter ZIP8 (SLC39A8) and zinc influence IFN-gamma expression in activated human T cells. *J. Leukoc. Biol.* 86: 337-348.
115. Tanaka, S., Akaishi, E., Hosaka, K., Okamura, S. & Kubohara, Y. (2005) Zinc ions suppress mitogen-activated interleukin-2 production in Jurkat cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335: 162-167.

116. Brautigan, D. L., Bornstein, P. & Gallis, B. (1981) Phosphotyrosyl-protein phosphatase. Specific inhibition by Zn. *J. Biol. Chem.* 256: 6519-6522.
117. Delghandi, M. P., Johannessen, M. & Moens, U. (2005) The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells. *Cell Signal.* 17: 1343-1351.
118. Rincon, M., Ensen, H., Raingeaud, J., Recht, M., Zapon, T., Su, M. S., Penix, L. A., Davis, R. J. & Flavell, R. A. (1998) Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *EMBO J.* 17: 2817-2829.
119. Wellinghausen, N., Kirchner, H. & Rink, L. (1997) The immunobiology of zinc. *Immunol. Today* 18: 519-521.
120. Honscheid, A., Rink, L. & Haase, H. (2009) T-lymphocytes: a target for stimulatory and inhibitory effects of zinc ions. *Endocr. Metab. Immune. Disord. Drug Targets.* 9: 132-144.
121. Mocchegiani, E., Santarelli, L., Muzzioli, M. & Fabris, N. (1995) Reversibility of the thymic involution and of age-related peripheral immune dysfunctions by zinc supplementation in old mice. *Int. J. Immunopharmacol.* 17: 703-718.
122. Rincon, M. & Davis, R. J. (2009) Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases. *Immunol. Rev.* 228: 212-224.
123. Boonen, G. J., van Oirschot, B. A., van, D. A., Mackus, W. J., Verdonck, L. F., Rijksen, G. & Medema, R. H. (1999) Cyclin D3 regulates proliferation and apoptosis of leukemic T cell lines. *J. Biol. Chem.* 274: 34676-34682.
124. Dineley, K. E. (2007) On the use of fluorescent probes to distinguish Ca<sup>2+</sup> from Zn<sup>2+</sup> in models of excitotoxicity. *Cell Calcium* 42: 341-342.
125. Haase, H., Hebel, S., Engelhardt, G. & Rink, L. (2009) Zinc ions cause the thimerosal-induced signal of fluorescent calcium probes in lymphocytes. *Cell Calcium* 45: 185-191.
126. Chvapil M (1976) Effect of zinc on cells and biomembranes. *Medical Clinics of North America* 60: 799-812.
127. Heldin CH (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80: 213-223.
128. Kaiser, M., Wiggin, G. R., Lightfoot, K., Arthur, J. S. & Macdonald, A. (2007) MSK regulate TCR-induced CREB phosphorylation but not immediate early gene transcription. *Eur. J. Immunol.* 37: 2583-2595.
129. Zhang, Y., Bharadwaj, U., Logsdon, C. D., Chen, C., Yao, Q. & Li, M. (2010) ZIP4 regulates pancreatic cancer cell growth by activating IL-6/STAT3 pathway through zinc finger transcription factor CREB. *Clin. Cancer Res.* 16: 1423-1430.
130. Knebel, A., Haydon, C. E., Morrice, N. & Cohen, P. (2002) Stress-induced regulation of eukaryotic elongation factor 2 kinase by SB 203580-sensitive and -insensitive pathways. *Biochem. J.* 367: 525-532.
131. Csermely, P., Szamel, M., Resch, K. & Somogyi, J. (1988) Zinc increases the affinity of phorbol ester receptor in T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154: 578-583.

132. Csermely, P., Szamel, M., Resch, K. & Somogyi, J. (1988) Zinc can increase the activity of protein kinase C and contributes to its binding to plasma membranes in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 263: 6487-6490.
133. Wolf, K., Schulz, C., Riegger, G. A. & Pfeifer, M. (2002) Tumour necrosis factor-alpha induced CD70 and interleukin-7R mRNA expression in BEAS-2B cells. *Eur. Respir. J.* 20: 369-375.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

SI-Einheiten sowie Abkürzungen laut Duden sind nicht aufgeführt.

AC	Adenylatzyklase
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen Präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Differenzierungsmarker
Csk	C-terminale src Kinase
DAG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	Enzymgekoppelter Immunosorbenstest
Fc	Kristallines Fragment
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreuung
FSK	Forskolin
GC	Guanylatzyklase
HRP	Meerrettichperoxidase
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IP <sub>3</sub>	Inositriphosphat
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-basierendes Aktivierungsmotiv
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK Kinase
MAPKKK	MAPK Kinase Kinase
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex
MKP	MAPK-Phosphatase

---

NFAT	Nuclear Factor of activated T-cells
NF $\kappa$ B	Nuclear Factor $\kappa$ B
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatpuffer
PDE	Phosphodiesterase
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidium Jodid
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositbisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC $\gamma$	Phospholipase C $\gamma$
PMA	Phorbol12-Myristat13-Acetat
PTP	Proteintyrosinphosphatase
Pyr	Pyrithion
RmT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH-Domäne	Src-Homologie Domäne
Src	Sarcoma
SSC	Seitwärtsstreuung („Sidescatter“)
TCR	T-Zellrezeptor
TBS	Tris-Puffer („Tris buffered saline“)
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
TH-Zellen	T-Helferzellen
TPEN	N, N, N', N'-Tetrakis-(2-Pyridyl-Methyl)-ethylendiamin

## Anhang 1: Auflistung der verwendeten Primer

### Primer für semiquantitative RT-PCR (3.2.8.1)

Gen	Sequenz forward Primer (5'→3')	Sequenz reverse Primer (5'→3')	Amplifikat größe	Quelle
β-Aktin	ATGGATGATGATATCGCCGCG	CTAGAAGCATTTCGGTGGACGATGGAGGGG CC	1200 bp	*
IL-2	ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTG	TCAAGTCAGTGTTGAGATGATGCTTTG	462 bp	*
IFN-γ	ATGAAATATACAAGTTATATCTTGGCTT T	GATGCTCTTCGACCTCGAAACAGCAT	494 bp	*
IL-4	ATGGGTCTCACCTCCCAACTGCT	CGAACACTTTGAATATTTCTCTCAT	456 bp	*

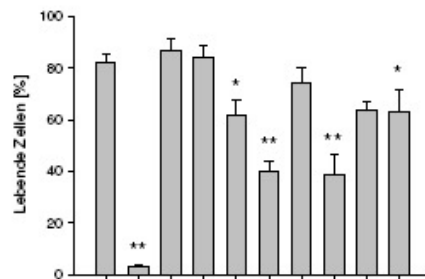
### Primer für Real time quantitative SYBR Green PCR (3.2.8.3)

Gen	Sequenz forward Primer (5'→3')	Sequenz reverse Primer (5'→3')	Quelle
β-Aktin	CGCCCCAGGCACCAGGGC	GCTGGGGTGTGAAGGT	(133)
IL-2	TCCTGTCTTGCATTGCACTAAG	CATCCTGGTGAGTTGGGATTC	*
IFN-γ	AGAATTGGAAGAGGAGAGTGACAG	GTCTTCCTTGATGGTCTCCACAC	*
IL-4	TTGAACAGCCTCACAGAGCAGA	GTTGTGTTCTTGAGGCAGCA	*
T-bet	AGGGACGGCGGATGTCCCA	GCTGCCCTCGGCCTTCCAC	*
GATA-3	GCCCGGTCCAGCACAGAAGG	TGAGGGGCCGGTTCTGTCCG	*
c-maf	TCTCCCGAGTTTTTCATAACTGAGCCC	ACACACTGGTAAGTACACGATGCTGG	*

\* = Institutsbestand

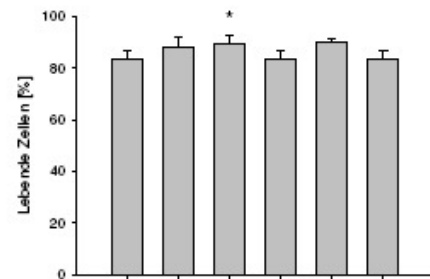
## Anhang 2: Toxizitätstests der verwendeten Substanzen

A Jurkat



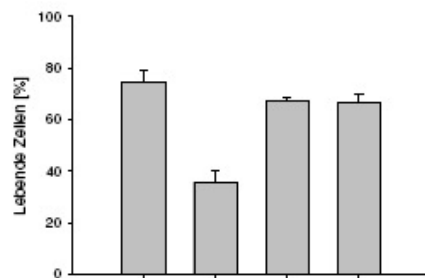
MβCD [5 mM]	-	+	-	-	-	-	-	-	-
db cAMP [0,5 mM]	-	-	+	-	-	-	-	-	-
LY83538 [1 μM]	-	-	-	+	-	-	-	-	-
PP2 [10 μM]	-	-	-	-	+	-	-	-	-
PHA [10 μg/mL]	-	-	-	-	-	+	-	-	-
CsA [1 μg/mL]	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Calcimycin [1 μM]	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Wortmannin [100 nM]	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Zink [75 μM]	-	-	-	-	-	-	-	-	+

B PBMC



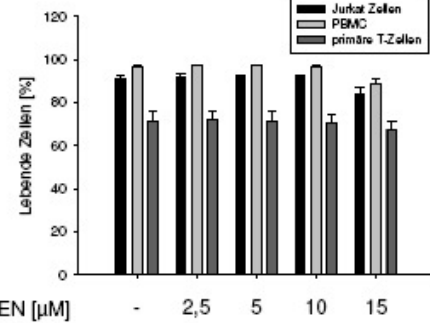
PP2 [10 μM]	-	+	-	-	-	-
Zn [7,5 μM]/Pyr [10 μM]	-	-	+	-	-	-
Zink [75 μM]	-	-	-	+	-	-
Okt3 [100 ng/mL]	-	-	-	-	+	-
PHA [10 μg/mL]	-	-	-	-	-	+

C primäre T-Zellen



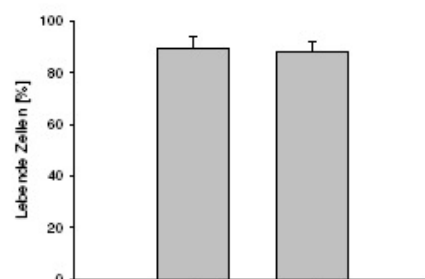
PHA [10 μg/mL]	-	+	-	-
db cAMP [0,5 mM]	-	-	+	-
LY83538 [1 μM]	-	-	-	+

D

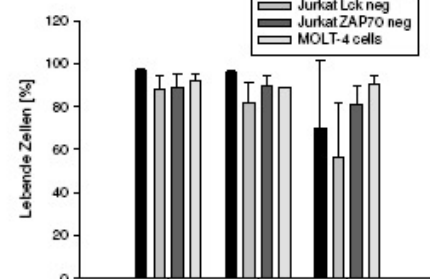


TPEN [μM]

E Raji

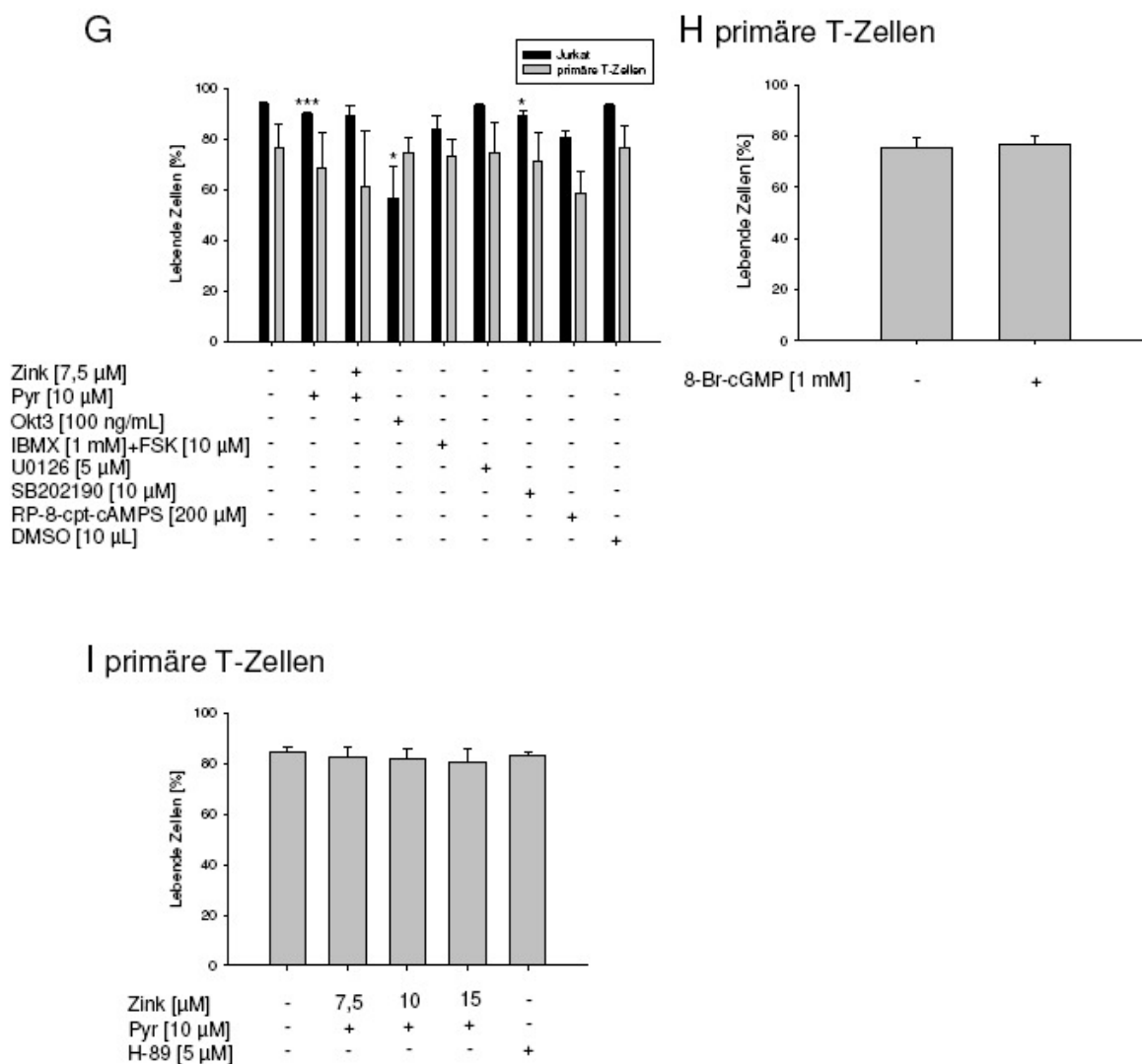
Zink [7,5 μM]  
+ Pyr [10 μM]

F

Zink [7,5 μM]  
Pyr [10 μM]



## Fortsetzung Anhang 2: Toxizitätstests der verwendeten Substanzen



### Toxizitätstests zu den Versuchen in Kapitel 4.

Die Zellen wurden auf  $1 \times 10^6$ /mL eingestellt und jeweils mit den unterschiedlichen Substanzen für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Aufnahme von Propidiumjodid (PI) wurde anschließend durchflusszytometrisch als Maß für die zerstörte Membranintegrität erfasst (A-I). Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$ SEM aus n=3 unabhängigen Experimenten. Die zur Kontrolle signifikant unterschiedlichen Ansätze sind mit \*, \*\*, \*\*\* markiert (\* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \*\*\* =  $p \leq 0,001$  Student's *t* test).

## Lebenslauf

### Person

Andrea Hönscheid

Geboren am 15. Oktober 1977 in Düren

Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schule

08/1984-07/1988                      Grundschule in Düren

08/1988-06/1997                      Stiftisches Gymnasium, Düren

### Freiwilliges Ökologisches Jahr

09/1997-08/1998                      Freiwilliges Ökologisches Jahr, Landschaftsverband Rheinland,  
Kerpen

### Berufsausbildung

08/1998-06/2000                      Ausbildung zur BTA an der Rheinischen Akademie e.V. Köln  
Berufsabschluss als Biologisch Technische Assistentin (BTA)

### Studium und Dissertation

10/2000-07/2006                      Studium der Biologie an der RWTH Aachen  
Abschluss: Diplom-Biologin

08/2006-03/2010                      Dissertation am Institut für Immunologie des Universitätsklinikums der  
RWTH Aachen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hajo Haase

### Berufstätigkeit

seit 04/2010                              wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Tierernährung des  
Friedrich Loeffler Instituts, Braunschweig

## Veröffentlichungen

**Hönscheid A**, Rink L, Haase H (2009) T-lymphocytes: a target for stimulatory and inhibitory effects of zinc ions. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 9: 132-44

**Hönscheid A**, Dubben S, Rink L, Haase H. Differential Regulation of Mitogen Activated Protein Kinases in Human T-cells by Zinc. *J. Nutr. Biochem.* (Accepted)

Kaltenberg J, Plum LM, Ober-Blöbaum JL, **Hönscheid A**, Rink L, Haase H (2010) Zinc signals promote interleukin-2-dependent proliferation of T cells. *Eur. J. Immunol.* 40: 1496-503

Dubben S, **Hönscheid A**, Winkler K, Rink L, Haase H (2010) Cellular zinc-homeostasis is a regulator in the myeloid differentiation of HL-60 cells by 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J. Leukocyte Biol.* 87: 833-44

## Kongressbeitrag

Trinational fall meeting of the societies of Biochemistry and Molecular Biology, Aachen 09/2009  
Posterbeitrag: Differential impact of zinc on MAP kinases p38 and ERK1/2 in primary human T-cells

## DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Lothar Rink für die Möglichkeit bedanken, an seinem Institut zu promovieren. Ich danke ihm für alle Anregungen, Diskussionen und die uneingeschränkte Unterstützung meiner Arbeit.

Bei Prof. Dr. Alan Slusarenko möchte ich mich dafür bedanken, dass er die Zweitgutachterschaft für meine Arbeit übernommen hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Hajo Haase möchte ich mich für die Betreuung meiner Arbeit, seine lebendige Diskussionsbereitschaft und für die Anleitung zum wissenschaftlichen Denken und Handeln bedanken.

Bei allen Institutsmitgliedern bedanke ich mich für eine herzliche, hilfsbereite und entspannte Arbeitsatmosphäre. Bei den Mitgliedern der AG Haase Silke Hebel und Gabriela Engelhard bedanke ich mich für Ihre geduldige Einarbeitung in alle Methoden. Bei meiner Laborpartnerin Birgit Plümäkers möchte ich mich für ihre Geduld mit den Höhen und Tiefen des Forscherdaseins bedanken. Allen ehemaligen und aktuellen Doktoranden sei für die unzähligen Kaffeepausen und ausgedehnten Mensagänge gedankt, die zu meiner Entspannung und guten Laune beigetragen haben!

Meiner Familie danke ich für ihre Unterstützung und ihren Glauben an mich. Durch ihre Zuversicht und unzähligen Gespräche haben sich viele große und kleine Schwierigkeiten relativiert.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin und Kollegin Svenja Dubben. Mit ihr bin ich während meiner Doktorarbeit durch Dick und Dünn gegangen. Ich danke ihr sowohl für den fachlichen Austausch und die unzähligen Diskussionen, die meine Arbeit sehr bereichert haben, als auch für den seelischen Rückhalt, die gemeinsam durchstandenen Tiefpunkte, aber auch für die umjubelten Höhen.

Mein abschließender Dank gilt meinem Lebensgefährten Jan Mikolajczak. Er hat mich stets bedingungslos unterstützt und es in Zeiten der größten Verzweiflung immer verstanden, mich zu beruhigen und zu stärken. Dank seiner Hilfe habe ich das Ziel trotz einiger Widrigkeiten nie aus den Augen verloren.