

# **„Einfluss von Zink auf die Zytokinenregulation“**

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

Veronika Kloubert (M. Sc.)

aus

Aachen

Berichter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Lothar Rink

Univ.-Prof. Ph.D. Alan Slusarenko

Tag der mündlichen Prüfung: 02.10.2018

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek verfügbar.

**Aus dieser Dissertation hervorgegangene Veröffentlichungen:**

- (1) **Veronika Kloubert**, Karoline Blaabjerg, Tina Sørensen Dalgaard, Hanne Damgaard Poulsen, Lothar Rink and Inga Wessels. Influence of zinc supplementation on immune parameters in weaned pigs. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2018; doi: 10.1016/j.jtemb.2018.01.006.
- (2) **Veronika Kloubert**, Inga Wessels, Karoline Blaabjerg, Veerle Janssens, Jan Hapala, Wolfgang Wagner and Lothar Rink. Increased CREM $\alpha$  expression leads to decreased interleukin-2 production via enhanced HDAC1 activity in T cells during zinc deficiency. (eingereicht)
- (3) Leonie Kulik, Martina Maywald, **Veronika Kloubert**, Inga Wessels and Lothar Rink. Zinc deficiency drives Th17 polarization and promotes loss of Treg cell-function. (eingereicht)

---

# Inhaltsverzeichnis

I	Abbildungsverzeichnis .....	1
II	Tabellenverzeichnis .....	4
III	Abkürzungsverzeichnis .....	5
1	Einleitung .....	11
1.1	Das Immunsystem des Menschen.....	11
1.2	Das Immunsystem des Schweins.....	12
1.3	T-Zellen .....	13
1.4	Interleukin (IL)-2 und der IL-2-Rezeptor .....	16
1.5	Das Spurenelement Zink .....	19
1.6	Genregulation .....	20
1.6.1	Regulation durch nicht-kodierende RNAs .....	20
1.6.2	Epigenetik .....	21
1.6.3	DNA-Methylierung.....	22
1.6.4	Acetylierung und Deacetylierung von Histonen.....	23
1.6.5	CREM $\alpha$ .....	24
2	Zielsetzung.....	25
3	Materialien und Methoden.....	26
3.1	Materialien .....	26
3.1.1	Geräte .....	26
3.1.2	Laborbedarf.....	27
3.1.3	Zellkulturmedien und Zusätze .....	28
3.1.4	Antikörper.....	29
3.1.5	Kommerziell erhältliche Kits .....	30
3.1.6	Sonstige Reagenzien .....	30
3.1.7	Software.....	32
3.2	Methoden .....	33

3.2.1	Zellkultivierung und Passagieren von Zellen.....	33
3.2.2	Kurzzeit-Zinkmangelmodell.....	34
3.2.3	Zinkflux-Modell.....	35
3.2.4	Langzeit-Zinkmangelmodell .....	36
3.2.4.1	Herstellung von Zink-freiem Medium mittels Chelex-Kügelchen ....	36
3.2.4.2	Langzeit-Zinkmangel .....	37
3.2.5	Isolierung von <i>peripheral blood mononuclear cells</i> (PBMC) aus Schweineblut.....	38
3.2.6	Zellzahlbestimmung mittels Bürker-Zählkammer .....	39
3.2.7	DNA-Isolierung zur Bestimmung des Methylierungsmusters .....	40
3.2.8	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentrationen.....	40
3.2.9	RNA-Isolierung.....	41
3.2.10	Reverse Transkription (cDNA-Synthese) .....	42
3.2.11	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	43
3.2.12	Agarose-Gelelektrophorese .....	46
3.2.13	miRNA-Isolierung.....	47
3.2.14	TaqMan <sup>®</sup> miRNA Reverse Transkription.....	48
3.2.15	TaqMan <sup>®</sup> PCR .....	49
3.2.16	Proteingewinnung .....	50
3.2.17	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 50	50
3.2.18	Western Blot .....	52
3.2.19	Messung von freiem intrazellulärem Zink mittels Fluoreszenzsonden ..	54
3.2.20	Zinkmessung mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) .....	56
3.2.21	Transfektion von Zelllinien .....	57
3.2.22	Messung der Zinkpufferkapazität .....	58
3.2.23	HDAC1-Enzymaktivitätsmessung .....	60
3.2.24	Bestimmung der Phosphataseaktivität .....	60

3.2.24.1	pNPP-Test.....	61
3.2.24.2	RRApTVA-Test.....	61
3.2.25	Bestimmung von Oberflächenmolekülen am Durchflusszytometer .....	62
3.2.26	Toxizitätsmessung mit Propidiumiodid (PI) .....	63
3.2.27	Fluoreszenzmikroskopie .....	64
3.2.27.1	Färbung des CD3-Rezeptors und des intrazellulären Zinks .....	64
3.2.27.2	Färbung des Zellkerns und des intrazellulären Zinks .....	65
3.2.27.3	Färbung von ER, Zellkern und CD3 .....	66
3.2.28	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ELISA) .....	66
3.2.28.1	Humaner und muriner IL-2-ELISA.....	67
3.2.28.2	Schweine-IL-2-ELISA .....	68
3.2.29	Statistische Methoden.....	68
4	Ergebnisse .....	70
4.1	Identifikation geeigneter IL-2-produzierender T-Zelllinien.....	70
4.2	Kurzzeitmodell .....	75
4.2.1	PI- und Zinkmessung .....	75
4.2.2	IL-2-Produktion .....	76
4.2.3	CREM $\alpha$ -Expression .....	77
4.3	Langzeitmodell .....	78
4.3.1	Vorversuche.....	78
4.3.2	PI- und Zinkmessung .....	82
4.3.3	IL-2-Produktion .....	85
4.3.4	CREM $\alpha$ -Expression .....	86
4.3.5	Zinktransporter-Expression .....	88
4.3.6	Einfluss von Zink auf die CD3- und CD69-Expression.....	89
4.3.7	Einfluss von Zink auf die Phosphataseaktivität .....	90
4.3.8	Mögliche Zielmoleküle von Zink im <i>upstream</i> Signalweg von IL-2 und CREM $\alpha$ 93	
4.3.9	Einfluss von Zink auf die HDAC1-Aktivität .....	96

4.3.10 Einfluss von Zink auf die miR-146a-Expression.....	100
4.3.11 Einfluss von Zink auf den Methylierungsstatus der DNA .....	101
4.4 Schweinemodell .....	104
4.4.1 Zinkmessung.....	104
4.4.2 IL-2-Produktion .....	105
4.4.3 CREM $\alpha$ -Expression .....	106
4.5 MTF-1-Geninaktivierung.....	107
4.6 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Jurkat T-Zellen .....	109
5 Diskussion.....	115
6 Zusammenfassung.....	127
7 Literaturverzeichnis .....	128
Anhang .....	140
Publikationsliste .....	144
Danksagung .....	146
Eidesstattliche Erklärung .....	147

# I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: T-Zell-Aktivierung durch eine antigenpräsentierende Zelle (APZ). ....	14
Abbildung 2: Übersicht der Th-Zell-Differenzierung in unterschiedliche Subtypen.	15
Abbildung 3: Übersicht über den IL-2/IL-2R-Komplex und die intrazelluläre Signalkaskade. ....	18
Abbildung 4: Übersicht über die Entstehung von miRNAs und siRNAs. ....	21
Abbildung 5: Induktion der IL-2-Produktion in T-Zellen. ....	71
Abbildung 6: Zeitkinetik der IL-2-Expression auf RNA- und Proteinebene in T-Zellen. ....	72
Abbildung 7: CREM $\alpha$ -Zeitkinetik auf RNA-Ebene in T-Zellen. ....	73
Abbildung 8: Zeitkinetik der IL-2- und CREM $\alpha$ -Expressionen in T-Zellen. ....	74
Abbildung 9: Toxizitätsmessung nach dreitägigem Zinkmangel (ZnD [3d]). ....	75
Abbildung 10: Verringerte intrazelluläre Zinkkonzentration nach dreitägigem Zinkmangel. ....	76
Abbildung 11: Verringerte IL-2-Produktion in T-Zellen nach dreitägigem Zinkmangel. ....	77
Abbildung 12: Erhöhte CREM $\alpha$ -Expression in T-Zellen nach dreitägigem Zinkmangel. ....	78
Abbildung 13: Analyse des intrazellulären Zinkgehalts, der IL-2-Produktion sowie der Zellviabilität nach T-Zell-Inkubation in Chelexmedium. ....	79
Abbildung 14: Wöchentliche Messung des intrazellulären Zinkgehalts nach Kultivierung in Kontrollmedium, CH50 oder CH75. ....	80
Abbildung 15: Anteil toter Zellen nach dreiwöchiger Kultivierung in Chelexmedium.	81
Abbildung 16: Verringerte IL-2-Produktion nach dreiwöchigem Zinkmangel. ....	82
Abbildung 17: Anteil toter Zellen nach langzeitigem Zinkmangel (ZnD [3 W.]). ....	83
Abbildung 18: Verringerter Zinkgehalt im Medium und in Jurkat Zellen nach Chelex-Behandlung. ....	84
Abbildung 19: Verringerter intrazellulärer Zinkgehalt nach dreiwöchigem Zinkmangel. ....	84
Abbildung 20: Reduzierte IL-2-Expression nach dreiwöchigem Zinkmangel. ....	85
Abbildung 21: Erhöhte CREM $\alpha$ -Expression auf RNA-Ebene nach dreiwöchigem Zinkmangel. ....	86
Abbildung 22: CREM $\alpha$ -Zeitkinetik auf Proteinebene. ....	87

Abbildung 23: Erhöhte CREM $\alpha$ -Expression auf Proteinebene nach dreiwöchigem Zinkmangel.....	87
Abbildung 24: Veränderte Expression der Zinktransporter nach dreiwöchigem Zinkmangel.....	88
Abbildung 25: Analyse der CD3- und CD69-Expressionen in Abhängigkeit vom intrazellulären Zinkgehalt.....	90
Abbildung 26: Einfluss von Zink auf die Phosphataseaktivität in T-Zellen.....	91
Abbildung 27: Bestimmung der Menge an frei verfügbarem Zink im PP2A-Puffer. ...	92
Abbildung 28: Bestimmung des IC <sub>50</sub> -Wertes von Zink auf die PP2A-Aktivität. ....	93
Abbildung 29: Einfluss eines dreiwöchigen Zinkmangels auf das phosphorylierte PKA Substrat und c-Fos. ....	94
Abbildung 30: Einfluss eines dreiwöchigen Zinkmangels auf p-NF- $\kappa$ Bp65(S276) und p-ERK.....	95
Abbildung 31: Einfluss eines dreiwöchigen Zinkmangels auf p-H3S10 und acetyl-H3K18. ....	96
Abbildung 32: Erhöhte HDAC1-Expression nach dreiwöchigem Zinkmangel.....	97
Abbildung 33: Verringerte HDAC1-Aktivität nach Zinksupplementation. ....	97
Abbildung 34: Bestimmung der Menge an frei verfügbarem Zink im HDAC1-Puffer. 98	
Abbildung 35: Bestimmung des IC <sub>50</sub> -Wertes von Zink auf die HDAC1-Aktivität. ....	99
Abbildung 36: Verringerte Acetylierung von H3K9 unter Zinkmangel.....	99
Abbildung 37: Zeitkinetik der miR-146a-Expression.....	100
Abbildung 38: Veränderte miR-146a-Expression nach dreiwöchigem Zinkmangel. 101	
Abbildung 39: Analyse eines Zinkeinflusses auf potenzielle Zielgene, die mittels Methylanalysen identifiziert wurden.....	103
Abbildung 40: Analyse der HLA-ABC-Expression auf der Oberfläche von zinkdefizienten und zinkadäquaten Jurkat Zellen. ....	104
Abbildung 41: Erhöhter Zinkgehalt nach ZnO-Supplementation von Schweinen. ...	105
Abbildung 42: Erhöhte IL-2-Produktion nach Zinksupplementation in Schweine-PBMC. ....	106
Abbildung 43: Verringerte CREM $\alpha$ -Produktion nach Zinksupplementation in Schweine-PBMC. ....	107
Abbildung 44: Der Einfluss einer MTF-1-Gen-Stillegung auf die IL-2-Produktion..	108
Abbildung 45: Detektion des intrazellulären Zinkgehalts in Jurkat Zellen unter verschiedenen Zinkbedingungen.....	109

Abbildung 46: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Jurkat Zellen, die mit FluoZin-3 AM behandelt wurden.....	110
Abbildung 47: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des intrazellulären Zinks mit Zinpyr-1.....	111
Abbildung 48: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des intrazellulären Zinks mit Zinpyr-1 und Zellkernfärbung mit Hoechst.....	112
Abbildung 49: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des intrazellulären Zinks mit Zinpyr-1 und des CD3-Rezeptors.....	113
Abbildung 50: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Jurkat Zellen, deren ER, Zellkern und CD3-Rezeptor mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden.....	114
Abbildung 51: Übersicht über die molekularen Mechanismen, die zu einer verringerten IL-2-Expression unter Zinkmangel in T-Zellen führen..	126

## II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien.....	33
Tabelle 2: Pipettierschema für einen cDNA-Synthese-Ansatz.....	43
Tabelle 3: Temperaturprofil der cDNA-Synthese.....	43
Tabelle 4: Pipettierschema für einen qRT-PCR-Ansatz.....	45
Tabelle 5: qRT-PCR-Temperaturprofil.....	46
Tabelle 6: Trenn- und Sammelgele für Western Blot.....	52
Tabelle 7: Pipettierschema für die Fluoreszenzsonden FluoZin-3 AM und Zinpyr-1.	56

### III Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
A. braun	Aqua braun
ABT1	<i>activator of basal transcription 1</i>
AG	Antigen
Ago	Argonaute
AICD	<i>activation induced cell death</i>
AM	Acetoxymethylester
AP-1	Aktivator Protein 1
AP2A2	<i>adaptor related protein complex 2 <math>\alpha</math> 2 subunit</i>
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
APZ	antigenpräsentierende Zelle
ATF	<i>activating transcription factors</i>
BD	Becton Dickinson
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Cal	Calcimycin
CAMK2A	<i>calcium/calmodulin dependent protein kinase II <math>\alpha</math></i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CH50	Chelexmedium (pH 7,4) supplementiert mit 50 $\mu$ g/L
CH75	Chelexmedium (pH 7,4) supplementiert mit 75 $\mu$ g/L
CRE	<i>cAMP responsive element</i>
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
CREM	<i>cAMP responsive element modulator</i>

---

C <sub>T</sub>	<i>cycle threshold</i>
CTL	cytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte associated protein 4</i>
d	Tag
DC	dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
ds	doppelsträngig
DSMZ	deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	<i>forkhead-Box-Protein P3</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
γ <sub>c</sub>	<i>common cytokine receptor γ chain</i>
H	Histonprotein
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethansulfonsäure
HIVEP1	<i>human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 1</i>

---

HLA	humanes Leukozytenantigen
HRP	Meerrettichperoxidase
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
ICER	<i>inducible cAMP early repressor</i>
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-2R	IL-2-Rezeptor
IS	immunologische Synapse
iTreg	induzierbare regulatorische T-Zelle
JAK	Januskinase
kb	Kilobase
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MC	Mikrocluster
β-ME	β-Mercaptoethanol
MGB	<i>minor groove binder</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
miRNA	<i>micro</i> Ribonukleinsäure
MP	Messpuffer
MRE	<i>metal response element</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MS	Multiple Sklerose
MT	Metallothionein
MTF-1	<i>metal-responsive transcription factor-1</i>
NEAA	nicht essenzielle Aminosäuren

---

NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells</i>
NFQ	nicht-fluoreszierender Quencher
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
nt	Nukleotid
Oct	<i>octamer proteins</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBGD	Porphobilinogen Desaminase
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pDC	plasmacytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
pNPP	<i>p</i> -Nitrophenyl Phosphat
Pol	Polymerase
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PPIA	<i>peptidylprolyl isomerase A</i>
ppm	<i>parts per million</i>
PRR	<i>pattern-recognition-Rezeptor</i>
PTM	post-translationale Modifikation
PTP	Protein Tyrosin Phosphatase
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

---

RA	Rheumatoide Arthritis
rDNase	rekombinante Desoxyribonuklease
RISC	<i>ribonucleic acid-inducing silencing complex</i>
RmT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNAi	Ribonukleinsäure-Interferenz
RPL4	<i>ribosomal protein L4</i>
RPTOR	<i>regulatory associated protein of mechanistic target of rapamycin complex 1</i>
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler
sIL-2R $\alpha$	<i>soluble</i> IL-2 Rezeptor $\alpha$
siRNA	<i>small interfering</i> Ribonukleinsäure
SLC	<i>solute-linked carrier</i>
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SP-1	<i>specificity protein-1</i>
ss	einzelsträngig
SSC	Seitwärtsstreulicht
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
T1D	Diabetes mellitus Typ 1
T <sub>A</sub>	<i>annealing</i> Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBP	<i>TATA box binding protein</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>

---

TBS-T	<i>Tris buffered saline-Tween</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tfh-Zelle	follikuläre T-Helferzelle
Th-Zelle	T-Helferzelle
TMB	Tetramethylbenzidin
TPEN	N,N,N',N'-tetrakis-(2-pyridyl-methyl)ethylenediamine
Treg-Zelle	regulatorische T-Zelle
tRNA	<i>transfer</i> Ribonukleinsäure
TSA	Trichostatin A
TSS	Transkriptionsstartstelle
UBE2K	<i>ubiquitin conjugating enzyme E2 K</i>
W.	Woche
w	<i>with</i> (mit)
wo	<i>without</i> (ohne)
XSCID	<i>X-linked severe combined immunodeficiency</i>
YWHAZ	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta polypeptide</i>
Zip	<i>Zrt-, Irt-like protein</i>
ZnD (3 d)	Zinkdefizienz für drei Tage (induziert durch TPEN)
ZnD (3 W.)	Zinkdefizienz für drei Wochen (induziert durch CH50)
ZnT	<i>zinc transporter</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem des Menschen

Das Immunsystem des Menschen wird in das angeborene, unspezifische sowie in das erworbene, spezifische Immunsystem eingeteilt. Es besteht aus Molekülen und Effektorzellen, die den Körper vor Pathogenen schützen. Außerdem werden durch das Immunsystem körpereigene tote Zellen und Tumorzellen erkannt bzw. unschädlich gemacht. Wenn Tumorzellen bspw. anfangen zu proliferieren oder Pathogene die äußeren Schutzbarrieren, wie die Haut oder die Schleimhäute der Atemwege und des Gastrointestinaltraktes, überwinden, werden andere Körperzellen verletzt. Folglich kommt es zur Aktivierung von Immunzellen (1). Die Immunantwort muss stark sein, um eine potenzielle Bedrohung schnell zu neutralisieren. Außerdem muss sie hoch spezifisch sein, um den Schaden für den Wirt möglichst gering zu halten (2).

Alle Immunzellen entstehen aus einer undifferenzierten und multipotenten hämatopoetischen Stammzelle. Aus dieser Vorläuferzelle entwickeln sich die Zellen der myeloischen sowie der lymphatischen Entwicklungsreihe. Die myeloische Vorläuferzelle differenziert in die drei verschiedenen Zelltypen der Granulozyten (basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten), Monozyten, Makrophagen, Mastzellen sowie myeloide dendritische Zellen (DC). Diese gehören zu den Immunzellen der unspezifischen, angeborenen Immunabwehr. Dagegen differenziert die lymphatische Vorläuferzelle in plasmacytoide dendritische Zellen (pDC), natürliche Killer- (NK), B- und T-Zellen. Die B- und T-Zellen gehören zum spezifischen, adaptiven Immunsystem und besitzen antigenspezifische Rezeptoren. Im Gegensatz dazu fehlt den pDCs und NK-Zellen diese Eigenschaft. Aus diesem Grund werden die letzten beiden Zelltypen dem angeborenen Immunsystem zugeordnet (1).

Im Menschen stellt das angeborene Immunsystem die erste Barriere in der Abwehr von Mikroorganismen dar. Kommt es zu einer Infektion, wird diese eingegrenzt bzw. eliminiert, was die Hilfe von weiteren Effektorsystemen erfordert, wie z.B. dem Komplementsystem und der Antikörperproduktion durch B-Zellen (3). Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen Pathogene mithilfe von *pattern-recognition-Rezeptoren* (PRRs) über die *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), die sich auf den Pathogenen befinden. PAMPs sind molekulare Strukturen, die spezifisch

für Pathogene sind und nicht zum „Selbst“ des Menschen gehören. Zellwandbestandteile, wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS), sind ein typisches bakterielles PAMP (4).

Zellen des adaptiven Immunsystems erkennen dagegen Bestandteile, die nicht zum „Selbst“ gehören, über ihre Antigenrezeptoren. Wichtig ist, dass die Immunantwort nicht die gesunden Teile des Körpers beeinflusst, weshalb eine Regulation der Immunantwort essenziell ist. Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses mithilfe des adaptiven Immunsystems. Dadurch kann bei erneutem Kontakt mit demselben infektiösen Material eine schnellere und stärkere Immunantwort generiert werden (3).

## 1.2 Das Immunsystem des Schweins

Das Immunsystem von Schweinen zeigt hinsichtlich der Anatomie, Organisation und Antwort große Ähnlichkeiten zum menschlichen Immunsystem (5). Es gibt Ähnlichkeiten zwischen dem angeborenen Immunsystem von Schweinen mit dem anderer Säugetiere. Die Effektorfunktionen umfassen ebenfalls die Rekrutierung und Aktivierung zellulärer Komponenten, wie z.B. Makrophagen, neutrophile Granulozyten, NK-Zellen und DCs sowie das Mitwirken extrazellulärer Mediatoren, wie z.B. Zytokine, Chemokine und Komplementfaktoren. Darüber hinaus ähnelt der Thymus im Schwein dem anderer Säugetiere und wirkt als primäres Lymphorgan und ist an der T-Zellentwicklung beteiligt (5, 6). Das Immunsystem von Schweinen weist allerdings auch einige Besonderheiten im Vergleich zum humanen Immunsystem auf. Im Unterschied zum Menschen gibt es bspw. keinen Immunglobulintransfer von der Mutter an den Fetus (6).

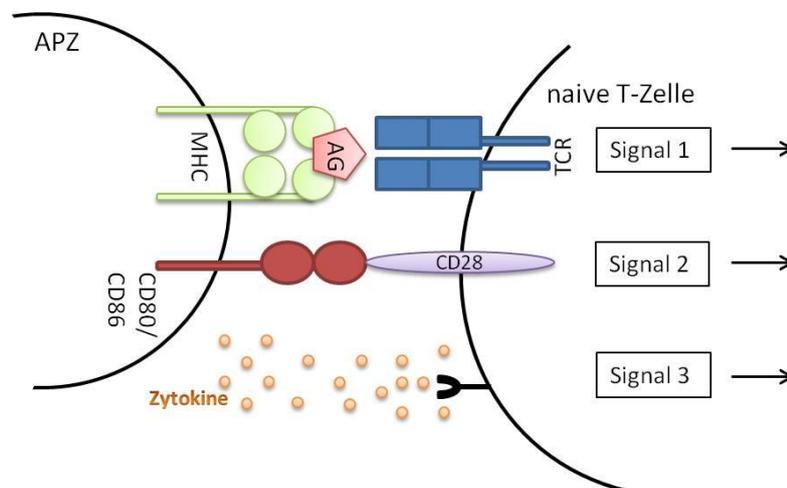
Das Ausmaß der direkten Orthologie verschiedener immunologisch assoziierter Gene wurde in Schweinen, Menschen sowie Mäusen untersucht, d.h. die Anwesenheit eines bestimmten Gens in jeder Spezies. Es zeigte sich, dass das Immunsystem des Schweins dem des Menschen in 80 % der analysierten Faktoren ähnelte, während die Ähnlichkeiten zwischen dem humanen und dem murinen Immunsystem bei unter 10 % lagen (7). Diese Übereinstimmungen machen die Verwendung eines Schweinmodells für die Untersuchung immunologischer Fragestellungen besonders interessant. Forschungsergebnisse, die mit Hilfe von Mäusen erhalten wurden, können somit in einem geeigneten Schweinmodell überprüft und besser auf den Menschen übertragen werden.

### 1.3 T-Zellen

Die T-Zellen wandern bereits in einer frühen Vorläuferstufe aus dem Knochenmark aus und gelangen über die Blutbahn in den Thymus. Dort findet die T-Zell-Reifung zu immunkompetenten Zellen statt. Wie bereits erwähnt, gehören T-Zellen zum spezifischen, adaptiven Immunsystem und besitzen antigenspezifische Rezeptoren. Aus einer antigenspezifischen T-Zelle entstehen nach Aktivierung viele tausende T-Zellen mit derselben Rezeptorspezifität, was als klonale Expansion bezeichnet wird (1). Die Zellaktivierung wird streng reguliert, um sicherzustellen, dass nur schädliche Antigene eine Immunantwort induzieren. Im Rahmen der T-Zell-Aktivierung wird der T-Zelle das Antigen über den *major histocompatibility complex* (MHC) von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APZ), d.h. B-Zellen, DC und Makrophagen, präsentiert und ist in der Lage, eine Immunantwort auszulösen (1, 8). Antigene, die über den MHC I-Komplex präsentiert werden, werden durch zytotoxische *cluster of differentiation* (CD)8<sup>+</sup> T-Zellen (CTL) erkannt, während Antigene, die über den MHC II-Komplex präsentiert werden, durch CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (Th) erkannt werden. Somit wird durch das MHC-Molekül festgelegt, welche Effektorfunktion ausgelöst wird (8).

Für MHC I-Moleküle ist die Präsentation endogener Peptide, die innerhalb der Zelle produziert werden, charakteristisch. MHC II-Moleküle präsentieren dagegen in der Regel exogene Peptide, die aus der Umgebung professioneller APZ stammen (1). Wird das durch MHC-präsentierte Antigen spezifisch durch eine T-Zelle erkannt, erhält diese das erste Signal im Aktivierungsprozess (Abb. 1). Es kommt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und zur Entstehung einer immunologischen Synapse zwischen T-Zelle und APZ, woraufhin ein Informationsaustausch mithilfe von Zytokinen erfolgt. Das erste Signal ist für die Proliferation und Differenzierung zur Effektor-T-Zelle jedoch nicht ausreichend. Als zweites Signal benötigt die T-Zelle die kostimulierenden B7-Moleküle (CD80 und CD86), die auf der Oberfläche der professionellen APZ exprimiert werden. Diese Moleküle binden an das CD28 der naiven T-Zelle (2. Signal) und induzieren zusammen mit dem ersten Signal die Proliferation, die IL-2-Produktion sowie die Synthese der IL-2-Rezeptor  $\alpha$ -Kette (IL-2R $\alpha$ , CD25). Die IL-2R $\alpha$ -Kette verbindet sich mit den  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten des IL-2R, und es kommt zur Bildung des hochaffinen IL-2R (Kap. 1.4). Bereits geringe Mengen des Zytokins IL-2 reichen zur Aktivierung des Rezeptors und damit zur T-Zell-Proliferation aus (1). Die Präsentation von Antigenen ohne kostimulierende Moleküle führt zur

Anergie, d.h. dem Ausbleiben einer Reaktion durch die T-Zelle, und wird als periphere Toleranz bezeichnet (1).



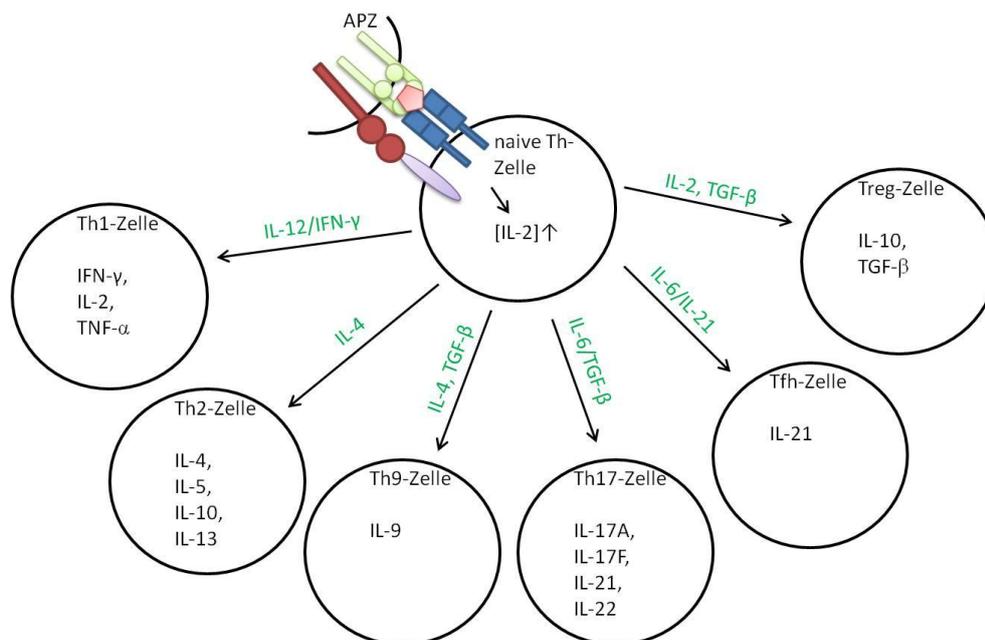
**Abbildung 1: T-Zell-Aktivierung durch eine antigenpräsentierende Zelle (APZ).**

Damit eine T-Zelle aktiviert wird und diese eine entsprechende Immunreaktion auslösen kann, werden verschiedene Signale benötigt. Das erste Signal, das über den T-Zell-Rezeptor (TCR) einer naiven T-Zelle vermittelt wird, wird durch das spezifische Antigen (AG), was auf einem MHC einer APZ präsentiert wird, ausgelöst. Weiterhin werden kostimulierende Signale in Form der Moleküle CD80/CD86 (B7-Moleküle) benötigt, die auf der APZ exprimiert werden und an das CD28 der naiven T-Zelle binden. Zusammen mit dem ersten Signal kann die Proliferation, die IL-2- sowie die CD25-Synthese in der T-Zelle induziert werden. Das dritte Signal wird über Zytokine vermittelt und legt die Subpopulation fest, in die die T-Zelle differenziert.

Abb. verändert nach Rink *et al.*, 2012 (1).

Aktivierte Th-Zellen exprimieren außerdem den CD40-Liganden (CD-40L), welcher an CD40 auf der APZ bindet. Dies führt bspw. zu einer verstärkten Aktivierung von Makrophagen durch Th1-Zellen. Für B-Zellen ist diese Interaktion für eine erfolgreiche Aktivierung durch Th-Zellen ebenfalls wichtig. Dieses Zusammenspiel unterschiedlicher Zelltypen bietet dem Immunsystem Schutzmechanismen, durch die eine spezifische Immunantwort gewährleistet werden kann.

Nach erfolgreicher Antigenpräsentation über MHC II differenziert die Th-Zelle in Th1-, Th2-, Th9-, Th17-, folliculäre Th (Tfh)- oder regulatorische T(reg)-Zellen (9). Zur Differenzierung in die benötigte Th-Subpopulation müssen die proliferierenden naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ein weiteres (drittes) Signal erhalten, das durch Zytokine vermittelt wird, die durch die T-Zelle selbst sowie durch die APZ sezerniert werden (Abb. 2) (1, 10).



**Abbildung 2: Übersicht der Th-Zell-Differenzierung in unterschiedliche Subtypen.**

Nachdem das durch die APZ präsentierte AG erfolgreich durch den TCR der T-Zelle erkannt wurde (Signal 1) und darüber hinaus die kostimulierenden Moleküle miteinander interagieren (CD28-CD80/CD86-Kontakt; Signal 2), kommt es, je nachdem welche Zytokine produziert werden, zu einer Polarisation der Th-Zelle in Th1-, Th2-, Th9-, Th17-, Tfh- oder Treg-Zellen. Diese sind wiederum in der Lage, verschiedene Zytokine zu produzieren und damit verschiedene Immunantworten in der Bekämpfung von Pathogenen auszulösen.

Abb. verändert nach Rink *et al.*, 2012 (1) und Liao *et al.*, 2013 (9).

Jede der Th-Subpopulationen übernimmt dabei andere Abwehrfunktionen. Treg-Zellen exprimieren bspw. die charakteristischen Marker CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA (*cytotoxic T lymphocyte associated protein*)-4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> und sind in der Lage, eine Immunreaktion in der Peripherie zu unterdrücken (1). Außerdem übernehmen sie eine wichtige Rolle, indem sie Effektor-T-Zellen davor schützen, „Selbst“-Antigene zu binden. Autoimmunitäten sind durch ein Ungleichgewicht zwischen Effektor-T-Zellen und Treg-Zellen gekennzeichnet. Eine geringe Gabe von IL-2 zeigte einen positiven Einfluss auf die Expansion von Treg-Zellen, was wiederum positiv auf verschiedene Erkrankungen wirkte, wie z.B. Diabetes mellitus Typ 1 (T1D), systemischer Lupus erythematosus (SLE) und Alopecia areata (11).

Im Gegensatz zu den Th-Zellen stellen CTL sicher, dass Virus-infizierte Wirtszellen erkannt und zerstört werden. Nachdem eine Infektion beseitigt wurde, stirbt die Mehrzahl an Effektor-T-Zellen ab. Die verbleibenden Zellen sind in der Lage, dasselbe Pathogen bei erneuter Infektion wiederzuerkennen und mithilfe des

immunologischen Gedächtnisses eine schnellere und stärkere Immunantwort einzuleiten (1).

## 1.4 Interleukin (IL)-2 und der IL-2-Rezeptor

Um eine effektive Immunantwort auszulösen, ist das Zusammenwirken verschiedener Zelltypen notwendig. Dies erfordert eine Koordination der Immunzellen durch immunmodulierende Signalmoleküle, und zwar durch Zytokine. Zytokine werden von unterschiedlichen Zellen produziert und können über spezifische Rezeptoren Signale von oder auf Zellen des Immunsystems übertragen, wie z.B. IL-2 (1). 1976 wurde IL-2 erstmalig als Wachstumsfaktor für T-Zellen, die dem Knochenmark entnommen wurden, beschrieben (12). IL-2-induzierte Signalwege beeinflussen die Genexpression, indem sie die Apoptose, das Zellwachstum und die Immunfunktionen regulieren (13, 14).

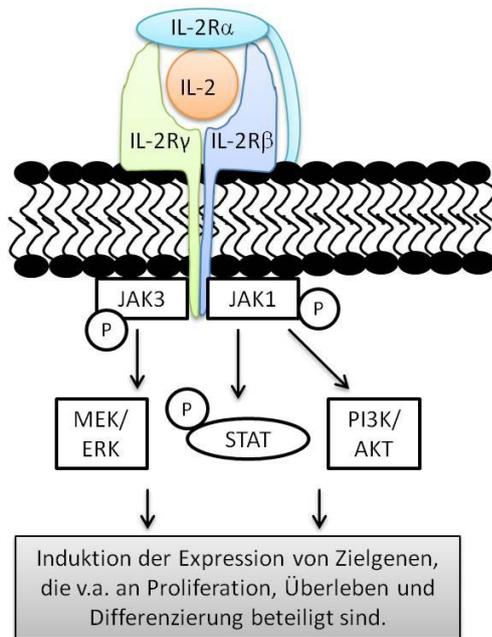
Der IL-2/IL-2R-Komplex ist für eine adäquate Regulierung der T-Zell-Proliferation nach erfolgter Antigenstimulation sehr wichtig. Da IL-2 auf die Zelle wirkt, durch die es synthetisiert wird, wirkt es als autokriner Wachstumsfaktor. Darüber hinaus kann IL-2 die Proliferation von benachbarten T-Zellen stimulieren, wodurch es außerdem als parakriner Faktor wirksam ist. IL-2 ist wichtig für die klonale Expansion von T-Zellen und darüber hinaus an der Entwicklung von Effektorzellen beteiligt. Die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Th1- und Th2-Zellen wird durch IL-2 begünstigt, während die Differenzierung in Th17-Zellen inhibiert wird. Außerdem ist IL-2 für die Entwicklung und Erhaltung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg-Zellen sowie für den *activation induced cell death* (AICD) essenziell, wodurch unangemessene Immunreaktionen limitiert werden (9, 13). Für Treg-Zellen ist die fehlende Produktion von IL-2 nach TCR-vermittelter Stimulation charakteristisch (15). Sie sind also selbst nicht mehr in der Lage, IL-2 zu produzieren, aber von diesem Zytokin als Überlebenssignal abhängig (1). Daneben besitzt IL-2 noch weitere Funktionen in anderen Teilen des Immunsystems. Es stimuliert bspw. die Proliferation von NK-Zellen, verstärkt deren zytolytische Aktivität und führt zu einer verstärkten Antikörperproduktion durch B-Zellen (13, 16, 17).

Der IL-2R besteht aus drei verschiedenen Rezeptorketten (IL-2R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ ). Die Liganden-spezifische  $\alpha$ -Kette (IL-2R $\alpha$ , CD25) wird ausschließlich auf aktivierten Lymphozyten exprimiert und bindet IL-2 mit hoher Affinität. Die IL-2R $\beta$ - (CD122) und IL-2R $\gamma$ -Kette (*common cytokine receptor  $\gamma$  chain*,  $\gamma_c$ , CD132) bilden zusammen einen

IL-2R $\beta\gamma_c$ -Komplex, der überwiegend auf Gedächtnis-T-Zellen und NK-Zellen zu finden ist und IL-2 mit mittlerer Affinität bindet. Werden alle drei Rezeptoruntereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma_c$ ) auf aktivierten T-Zellen exprimiert, wird IL-2 mit hoher Affinität gebunden (9).

$\gamma_c$  ist nicht nur ein wichtiger Bestandteil des IL-2R, sondern außerdem an der Ausbildung von Rezeptoren beteiligt, die Signale von IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21 weiterleiten. Das Gen *IL2RG* kodiert für  $\gamma_c$  und liegt in Menschen mutiert vor, die an der Erkrankung *X-linked severe combined immunodeficiency* (XSCID) leiden. Hierbei handelt es sich um eine schwere, vererbte Immundefizienz. Da durch die Mutation die Rezeptoren zur Weiterleitung der o.g. Signale nicht mehr gebildet werden können, kommt es zum Fehlen von T-Zellen und darüber hinaus kann die Anzahl bzw. Funktion von NK- sowie B-Zellen ebenfalls betroffen sein. Ohne eine Knochenmarktransplantation sterben die Betroffenen innerhalb des ersten Lebensjahres (18).

Nach erfolgreicher IL-2-Bindung an den IL-2R werden verschiedene Signalwege aktiviert (Abb. 3). Die Heterodimerisierung der cytoplasmatischen Domänen von IL-2R $\beta$  und  $\gamma_c$  führt zur Aktivierung der Januskinasen (JAK)1 und JAK3. JAK1 assoziiert mit dem IL-2R $\beta$  und JAK3 mit  $\gamma_c$ . Durch gegenseitige Phosphorylierung werden die JAK aktiviert und die Transkriptionsfaktoren *signal transducer and activator of transcription* (STAT)1, STAT3, STAT5A und STAT5B werden an die cytoplasmatischen Teile des Rezeptors rekrutiert, wobei STAT5 am stärksten aktiviert wird. STAT5 wird am IL-2R $\beta$  phosphoryliert, bildet Dimere und transloziert in den Zellkern. Dort kommt es zur Bindung an Zielgene, die eine wichtige Rolle in der Zellfunktion, im Zellwachstum sowie der Differenzierung spielen. Außerdem wird durch IL-2 der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt- sowie der MEK/ERK (*extracellular signal-regulated kinase*)-Signalweg aktiviert, wodurch das Zellwachstum und das Überleben der Zelle gefördert werden (9, 13). Neben der auf der Zelloberfläche vorkommenden Form des IL-2R $\alpha$  existiert eine weitere lösliche Form (sIL-2R $\alpha$ ). Diese liegt bei Infektionen oder Transplantatabstoßungen in erhöhter Menge vor (9).



**Abbildung 3: Übersicht über den IL-2/IL-2R-Komplex und die intrazelluläre Signalkaskade.**

Nachdem es durch entsprechende Stimulation zur Ausbildung des hochaffinen IL-2R $\alpha/\beta/\gamma$ -Komplexes kommt, werden intrazellulär JAK1 und JAK3 an die cytoplasmatischen Teile von IL-2R $\beta$  sowie IL-2R $\gamma$  rekrutiert. Diese werden durch gegenseitige Phosphorylierung aktiviert und die Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie an die cytoplasmatischen Rezeptorteile rekrutiert und ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert. Anschließend kommt es u.a. zur Ausbildung von STAT-Dimeren, die in den Zellkern translozieren und dort spezifisch an Zielgene binden und diese aktivieren. Neben dem JAK/STAT-Signalweg werden Zielgene über den MEK/ERK- sowie dem PI3K/AKT-Signalweg aktiviert. Zusammengefasst gewährleisten diese Signalwege den *activation induced cell death* (AICD) sowie die Proliferation und das Überleben der T-Zellen.

Abb. verändert nach Liao *et al.*, 2013 (9).

Hinsichtlich der Regulation des *IL2*-Gens ist bekannt, dass dieses Gen eine minimale IL-2-Promotor-*Enhancer*-Region beinhaltet. Diese Region weist Bindestellen für gewebespezifische sowie ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktoren auf, wie z.B. *nuclear factor of activated T cells* (NFAT), Aktivator Protein (AP)-1, *nuclear factor  $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) sowie für konstitutive Faktoren, wie *octamer proteins* (Oct) (13, 19). Bindungstests, die *in vitro* durchgeführt wurden, lassen die Vermutung zu, dass einige dieser Faktoren mit ihren Bindestellen erst nach erfolgter Stimulation interagieren können, während andere Faktoren ohne vorherige Aktivierung an spezifische Zielstrukturen binden (20, 21). Eine beeinträchtigte IL-2- bzw. IL-2R-Expression wird mit immunologischen Fehlfunktionen assoziiert, wie z.B. beim SLE, T1D oder Rheumatoider Arthritis (RA) (11, 22).

## 1.5 Das Spurenelement Zink

Zink ist als Spurenelement an vielen grundlegenden zellulären Funktionen beteiligt, wie z.B. an der Apoptose, Zellteilung sowie der DNA- und RNA-Synthese (23). Diese Beteiligung hebt die Bedeutung von Zink für stark proliferierende Gewebe, wie dem Immunsystem, hervor (24). Zink ist für die Funktion von mehr als 300 Enzymen essenziell und umfasst dabei Enzyme aller Enzymklassen. Es übernimmt eine spezifische, strukturelle Rolle in Proteinen, wie z.B. den Zinkfingerproteinen. Dies ist das häufigste wiederauftretende Motiv innerhalb der Transkriptionsfaktoren (25, 26). Der Gesamtgehalt an Zink beträgt im menschlichen Körper ca. 2-4 g (27). Die Plasmakonzentration beläuft sich auf lediglich 12-16  $\mu\text{M}$ , was die Einteilung als Spurenelement hervorhebt. Der Plasmazinkpool ist klein, aber frei beweglich, was für die Zinkverteilung wichtig ist (23).

Da im Gegensatz zu einem Eisenspeicher ein solcher Speicher für Zink fehlt, ist eine regelmäßige Zinkzufuhr zur Erhaltung eines stabilen Zustandes essenziell (27). Die Regulation des intrazellulären Zinkgehalts wird durch Zinkbindepoteine, wie z.B. Metallothioneine (MT) und Zinktransporter der Zip (*Zrt-, Irt-like protein, solute-linked carrier 39A* [SLC39A])- und ZnT (*zinc transporter*, [SLC30A])-Familie übernommen (28). Des Weiteren gibt es zinkabhängige Transkriptionsfaktoren, wie z.B. *metal-responsive transcription factor* (MTF)-1. MTF-1 registriert das Vorhandensein von Zink über dessen Bindung an Zinkfingerdomänen. Daraufhin kommt es zur Bindung von MTF-1 an sog. *metal response elements* (MRE) mit der Sequenz 5'-TGCRNC-3' in Zielgenen, wie z.B. von *SLC30A1*, was für ZnT1 kodiert, und Gene aus der MT-Familie. Durch die Induktion dieser Zielgene wird die Zelle vor einer zu hohen Menge an intrazellulärem Zink geschützt (29, 30).

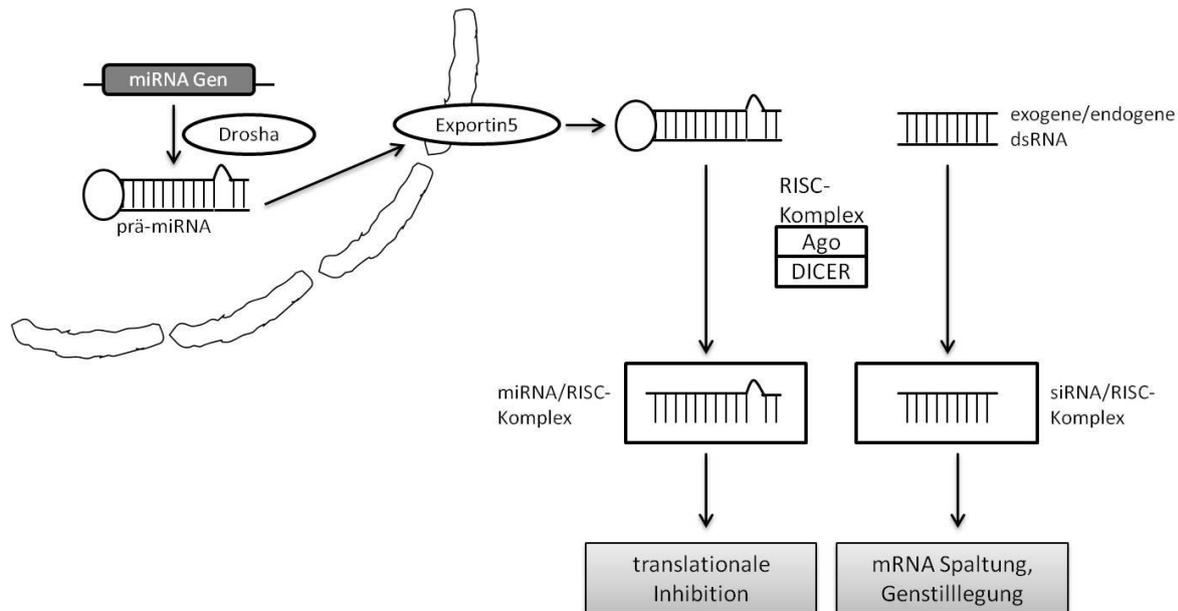
Kommt es zu einem Zinkmangel, sind v.a. Lymphozyten nicht mehr in der Lage, zu proliferieren und zu differenzieren (31). Ein schwerer Mangel an Zink führt bspw. zu Dermatitis, Verzögerungen im Wachstum und, wie bereits angedeutet, zu Fehlfunktionen des Immunsystems (32). Im Hinblick auf das Immunsystem beeinflusst ein Zinkmangel insbesondere die IL-2-Produktion durch T-Zellen, die *Killing*-Aktivität von NK-Zellen sowie die Antikörperproduktion durch B-Zellen (33). Eine reduzierte IL-2-Expression in T-Zellen, die sich in einem Zinkmangel befinden, wurde bereits in den späten 1980er Jahren beschrieben (27, 34-36). Abgesehen davon geht eine leichte Zinkdefizienz mit einer verringerten Thymulinaktivität sowie einer verringerten CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zell Ratio einher (34).

Versuche mit murinen EL-4 T-Zellen, die experimentell in einen Zinkmangel versetzt wurden, zeigten eine erhöhte IL-1 $\beta$ -induzierte IL-2-Expression nach Zinkresupplementation der Zellen *in vitro* (37). Darüber hinaus führte die Supplementation mit Zink von ursprünglich zinkdefizienten älteren Menschen zu einer erhöhten Expression von IL-2 auf RNA-Ebene in isolierten *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC). Diese Beobachtung ging wiederum mit einer verringerten Inzidenz an Infektionen in den untersuchten Studienteilnehmern einher (38). Nicht nur ältere Menschen zeigten eine verbesserte Immunantwort nach einer Supplementation mit Zink. Zinkdefiziente Patienten, die an einer Sichelzellenanämie erkrankt waren, zeigten ebenfalls eine verbesserte IL-2-Expression in stimulierten PBMC nach Zinksupplementation. Ähnlich zu den Beobachtungen in älteren Menschen ging dies mit einer verringerten Inzidenz an Infektionen einher (39). Interessanterweise ist der Zinkgehalt im Serum von Patienten, die an der Autoimmunerkrankung SLE erkrankt sind, ebenfalls erniedrigt im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (40-42). Dies verdeutlicht den Einfluss eines adäquaten Zinkstatus auf Autoimmunerkrankungen.

## 1.6 Genregulation

### 1.6.1 Regulation durch nicht-kodierende RNAs

Nicht-kodierende RNAs sind in der Lage, durch RNA-Interferenz (RNAi) post-transkriptionell Gene zu regulieren und diese dadurch stillzulegen (43). Die Gruppe an RNAi-Molekülen umfasst u.a. microRNAs (miRNAs) und *short interfering RNAs* (siRNAs). Es wird angenommen, dass 99 % der gesamten RNA in den Zellen von Säugetieren nicht-kodierende RNA beinhaltet. Eine Fehlregulation dieser RNAs wird in verschiedenen Stoffwechselerkrankungen sowie in Tumoren beschrieben. miRNAs sind 22 nt-lange RNA-Moleküle, die hoch konserviert in allen eukaryotischen Zellen zu finden sind. Die Transkription erfolgt durch die RNA Polymerase (Pol) II. Unter Beteiligung der RNase III Drosha sowie eines weiteren RNA-bindenden Proteins entstehen im Zellkern kleine Vorläufer-RNAs mit einer *hairpin*-Struktur und einer Länge von 65 nt, die prä-miRNA. Diese wird mithilfe des Exportin5 in das Cytosol transportiert (Abb. 4) (44).



**Abbildung 4: Übersicht über die Entstehung von miRNAs und siRNAs.**

Im Zellkern werden prä-miRNAs mittels Drosha erstellt, die eine *hairpin*-Struktur aufweisen. Nachdem die prä-miRNA mittels Exportin5 in das Cytosol transportiert wurde, entsteht mithilfe des *RNA-inducing silencing complex* (RISC) ein miRNA/RISC-Komplex, wodurch die miRNA zur translationalen Inhibition von Ziel-Produkten führen kann. DsRNA wird ebenfalls durch RISC modifiziert und der entstehende siRNA/RISC-Komplex ist in der Lage, Ziel-mRNA zu spalten und Gene stillzulegen.

Abb. verändert nach Tam *et al.*, 2017 (45).

SiRNAs werden als exogene RNAi beschrieben und lange komplementäre dsRNAs werden aus der Umgebung in das Cytoplasma aufgenommen. Um siRNAs und miRNAs im Cytoplasma in kleine RNA-Fragmente zu schneiden, assoziiert die Ribonukelase Dicer mit dem Protein Argonaute (Ago). Zusammen bilden diese beiden Proteine einen Komplex, der als *RNA-inducing silencing complex* (RISC) bezeichnet wird. Im Einzelnen kommt es durch das Schneiden doppelsträngiger (ds)siRNA oder dsmiRNA mittels RISC zur Entstehung einzelsträngiger (ss)siRNA sowie ssmiRNA. Ziel-mRNAs können durch diese kleinen RNA-Fragmente gebunden werden und zu einer Inhibition des Gens sowie zum Abbau der mRNA führen (Abb. 4). siRNAs finden in verschiedenen Therapien gegen Viren, Tumore und anderen Gen-abhängigen Erkrankungen eine Anwendung (45).

## 1.6.2 Epigenetik

Die Epigenetik beschreibt vererbare Veränderungen in Genen, die nicht direkt die DNA-Sequenz betreffen. Dies bietet die Möglichkeit, die Transkription von Genen zu regulieren, indem die Transkription für solche Gene aktiviert werden kann, die für

einen bestimmten Zelltyp oder eine bestimmte Funktion notwendig ist. Andererseits können Gene stillgelegt werden, die nicht bzw. nicht mehr benötigt werden. Eine epigenetische Regulation scheint für das Immunsystem sehr wichtig zu sein, um eine schnelle, starke und spezifische Immunantwort gegen ein Pathogen auszulösen. Als zentrale epigenetische Mechanismen in der Differenzierung und Funktion von Th-Zellen wurden v.a. DNA-Methylierungen sowie Histonmodifikationen beschrieben (2).

Die grundlegende Einheit der Chromatinstruktur wird durch die Nukleosomen gebildet. Nukleosomen bestehen aus etwa 147 bp DNA, die um ein Histonoktamer gewickelt vorliegt. Ein Oktamer besteht aus jeweils zwei Kopien der Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4, welche kleine Kernproteine sind und das zentrale Kernstück der Nukleosomen bilden (46). Durch post-translationale Modifikationen (PTM) können die aus dem Chromatin herausragenden Histonreste reversibel modifiziert werden, um die Genexpression zu regulieren (47). Diese Modifikationen umfassen bspw. Acetylierung, Mono-, Di- oder Trimethylierung, Ubiquitinierung und SUMOylierung von Lysinresten sowie Phosphorylierung von Serinresten (43, 46, 48). Wie bereits angedeutet, können die Modifikationen der Chromatinstruktur vererbt werden und das resultierende Zellgedächtnis basiert auf dieser vererbten Proteinstruktur. Insgesamt ergibt sich ein Muster, das als Histoncode bezeichnet wird und die biologische Funktion des Gens bestimmt (46). Diese Modifikationen werden durch andere Proteine erkannt, weshalb die Chromatinstruktur eine wichtige Rolle in der Entwicklung, im Wachstum und in der Aufrechterhaltung des Organismus spielt. Das Chromatin liegt entweder als Euchromatin oder als Heterochromatin vor. Während die Gene im weniger stark kondensierten Euchromatin für Transkriptionsfaktoren leichter zugänglich sind, liegt das Heterochromatin hoch kondensiert vor. Die DNA beinhaltet in diesen Bereichen vergleichsweise wenige Gene, die durch die dichte Packung des Chromatins schwer zugänglich sind und daher nicht transkribiert werden können (46).

### **1.6.3 DNA-Methylierung**

DNA-Methyltransferasen sind, wie der Name schon andeutet, für die Methylierung der DNA verantwortlich. Gene, die stark methyliert vorliegen, werden im Allgemeinen nicht transkribiert, während eine Hypomethylierung zur Induktion der Gentranskription führt (49). Die Methylierung der DNA erfolgt durch die Übertragung

eines Methylrestes auf ein CG-Dinukleotid und wird durch DNA-Methyltransferase (DNMT)1, 3a oder 3b vermittelt. Während die DNMT1 daran beteiligt ist die DNA-Methylierungsmuster während der Zellteilung aufrecht zu erhalten, sind die DNMT3a und DNMT3b dafür verantwortlich, die DNA-Methylierung während der fetalen Entwicklung zu gewährleisten. Sie sind daher als *de novo* DNMT bekannt (2). Eine abweichende *de novo* Methylierung von CpG-Inseln ist ein wichtiges Kennzeichen in humanen Tumoren und liegt bereits zu einem frühen Zeitpunkt in der Tumorentstehung vor (43).

CpG-Inseln sind Regionen in methylierungssensitiven Genen, die mindestens 200 bp DNA umfassen und einen C+G-Gehalt von mindestens 50 % beinhalten (2). Die CG-Nukleotide sind vor allem in oder um die Transkriptionsstartstelle (TSS) lokalisiert. Die meisten dieser Stellen liegen methyliert vor, mit der Ausnahme von CG-Stellen in Promotoren von transkriptionell aktiven Genen. Insbesondere werden H3 und H4 Histone methyliert, wodurch verschiedene Antworten ausgelöst werden können. So resultiert die Methylierung von H3K4 bspw. in einer Aktivierung der Transkription, während eine Methylierung von H3K9 mit einer Inhibition der Transkription assoziiert wird.

In naiven T-Zellen ist das *IL2*-Gen stillgelegt. Im Bereich -2,2 kb bis +98 bp relativ zur IL-2 TSS liegen in diesen Zellen alle 15 CG-Stellen methyliert vor. Nachdem die T-Zelle aktiviert wurde, wird das Methylierungsmuster verändert, so dass einige CG-Stellen im Bereich des IL-2-Promotors demethyliert vorliegen (2).

#### 1.6.4 Acetylierung und Deacetylierung von Histonen

Histonacetyltransferasen (HAT) katalysieren den Transfer einer Acetylgruppe vom Acetyl-Coenzym A auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysinrestes von Histonen. Dies führt zu einer Konformationsänderung des Chromatins und geht mit einer gesteigerten Transkription einher (50). Dagegen fördern Histondeacetylasen (HDAC) die Hypoacetylierung und damit eine Inhibition der Transkription (43, 48, 51). Es gibt 18 humane HDACs, die in vier unterschiedliche Klassen eingeteilt werden (I – IV) (52).

Die Klasse I, II und IV Enzyme sind  $Zn^{2+}$ -abhängige Enzyme (52). Klasse I HDACs werden ubiquitär in allen Geweben exprimiert und das Klasse I-Enzym HDAC1 ist an zellulären Prozessen, wie der Proliferation, dem Zellzyklus und der Apoptose beteiligt (50). Der HDAC1 fehlt, wie allen anderen HDACs, eine DNA-Bindedomäne, weshalb sie mit anderen DNA-bindenden Proteinen assoziieren muss, um an

spezifische Zielregionen innerhalb des Chromatins zu gelangen (53). Neben der zuvor beschriebenen veränderten Methylierung im IL-2-Promotor wurden in diesem Bereich ebenfalls Veränderungen in der Acetylierung sowie eine Umstrukturierung des Chromatins beobachtet (2).

### 1.6.5 CREM $\alpha$

Neben Modifikationen, die die DNA und Histone betreffen, existieren weitere wichtige Mechanismen, um die Transkription von Genen zu regulieren. Wie in Kap. 1.6.2 beschrieben wurde, kann die Genexpression durch PTM reguliert werden, indem die DNA für Transkriptionsfaktoren entweder zugänglich oder, umgekehrt, weniger zugänglich gemacht wird. 1991 wurde das *cAMP responsive element modulator* (CREM) Gen identifiziert. Zu diesem Zeitpunkt wurden drei verschiedene CREM Isoformen beschrieben, die durch alternatives Spleißen entstanden (54). Im Laufe der Zeit wurden weitere Isoformen beschrieben und umfassen nun mehr als 20 Varianten im Menschen. Darin eingeschlossen sind sowohl CREM-Varianten mit aktivierenden Eigenschaften, wie z.B. CREM $\tau$ , sowie inhibierende Varianten, wie z.B. CREM $\alpha$  (55, 56). Neben alternativem Spleißen führt die Verwendung alternativer Promotoren zu der großen Anzahl an Isoformen. Die Expression von CREM wird streng reguliert und ist abhängig vom Zell- bzw. Gewebetyp (56).

CREM $\alpha$  ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der an einer veränderten IL-2-Expression beteiligt ist und wurde in T-Zellen von Patienten beschrieben, die an SLE erkrankt waren. In diesem Zusammenhang scheint die -180-Stelle des IL-2-Promotors eine wichtige Rolle in der Fehlregulation der IL-2-Expression zu spielen. Diese Stelle umfasst eine Bindungsstelle für das *cAMP responsive element binding protein* (CREB) sowie CREM. CREM $\alpha$  gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die weitere CREM-Homologe umfasst, wie z.B. *inducible cAMP early repressor* (ICER), CREB-1 und -2 sowie *activating transcription factors* (ATF)-1, -2 und -3. Alle Mitglieder besitzen hohe Homologien in der Sequenz innerhalb ihrer DNA-Bindedomänen, einer *basic leucine zipper*-Domäne. Die palindromische Konsensussequenz 5'-TGACGTCA-3' sowie die 5'-Halbseite repräsentieren die Zielsequenzen, die durch diese Familie von Transkriptionsfaktoren gebunden werden und als *cAMP responsive element* (CRE) bezeichnet werden. Eine Bindung von CREM $\alpha$  an diese Stelle resultiert in der Inhibition der IL-2-Expression (57, 58).

## 2 Zielsetzung

Die Regulation der IL-2-Produktion in T-Zellen ist für das Verständnis des Immunsystems essenziell. Neben einer Schlüsselrolle in der Aktivierung von T-Zellen spielt IL-2 eine wichtige Rolle in der Regulierung der Immunantwort. Seit den späten 1980er Jahren ist ein Zusammenhang zwischen einer verringerten IL-2-Produktion und Zinkdefizienz in humanen T-Zellen bekannt und geht mit einer erhöhten Inzidenz an Infektionen einher. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, die zu einer verringerten IL-2-Produktion unter Zinkmangel führen, sind allerdings bislang noch nicht völlig entschlüsselt. Zink ist für ein gut funktionierendes Immunsystem wichtig. Kann eine adäquate Funktion von T-Zellen nicht gewährleistet werden, kommt es zur Entwicklung von chronischen Erkrankungen oder zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen. Aufgrund von bereits veröffentlichten Arbeiten hinsichtlich der IL-2-Produktion erscheint eine Regulation auf epigenetischer Ebene wahrscheinlich, und die Untersuchung einer möglichen Beteiligung von Zink stellt einen interessanten Ansatzpunkt dar.

Im Rahmen dieser Dissertation soll eine molekulare Verbindung gefunden werden, die die verringerte IL-2-Produktion aufgrund eines Zinkmangels erklärt. Die beiden humanen T-Zelllinien HuT-78 sowie Jurkat werden verwendet, um den Einfluss eines Zinkmangels auf die Regulation der IL-2-Produktion *in vitro* genauer zu untersuchen. Es werden zwei Modelle verwendet, und zwar ein Kurzzeit- sowie ein Langzeit-Zinkmangelmodell. Auf RNA- und Proteinebene wird das Expressionsniveau des Transkriptionsfaktors CREM $\alpha$  unter Zinkmangel im Vergleich zu Kontrollbedingungen analysiert. Darüber hinaus wird der Einfluss von Zink auf die IL-2- und CREM $\alpha$ -Produktion im Schweinemodell *in vivo* untersucht.

Außerdem sollen weitere Mechanismen, die zu einer verringerten IL-2-Produktion führen könnten, betrachtet werden, wie bspw. der Einfluss von Zink auf miRNAs, Histon-Acetylierungen, die HDAC1-Aktivität sowie der Einfluss auf potenzielle Zielmoleküle, wie z.B. NF- $\kappa$ B und ERK. Weiterhin wird mittels Fluoreszenzmikroskopie die intrazelluläre Zinkverteilung in T-Zellen genauer untersucht.

Eine Supplementation mit Zink bei älteren Menschen oder bei Autoimmunerkrankungen, die durch eine verminderte IL-2-Produktion charakterisiert werden, könnte im Idealfall zu neuen Therapiemöglichkeiten führen.

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Geräte

- Analysenwaage, 770/GS/GJ (Kern und Sohn, Balingen-Fommern)
- Atomabsorptionsspektrometer, Analyst 800 (Perkin Elmer, Rodgau)
- Bio-Imager, LAS 3000 (Fujifilm Lifescience, Düsseldorf)
- Blot-Transfer-Kammer, Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories, München)
- CO<sub>2</sub>-Inkubator, MCO-17 AIC (Sanyo Fischer, München)
- Durchflusszytometer, Calibur (BD, Heidelberg)
- Elektrophoresekammer, Mini-Protean (Bio-Rad Laboratories, München)
- Elektrophoresekammer, Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad Laboratories, München)
- Elektrophorese-Netzgerät, Power-Pack 300 System (Bio-Rad Laboratories, München)
- ELISA-Plattenleser, Sunrise (Tecan, Crailsheim)
- Fluoreszenzmikroskop, AXIO Observer (Zeiss, Oberkochen)
- Gefrierschrank, -20°C (Bosch, München)
- Gefrierschrank, -80°C (Sanyo, Moriguchi/Japan)
- Geldokumentationsgerät (Bio-Rad Laboratories, München)
- GenePulser II (Bio-Rad Laboratories, München)
- Kühlschrank, +4°C bis +8°C (Bosch, München)
- Laborwaage, 1265 MP (Sartorius, Göttingen)
- Magnetrührer, MR 3001 (Heidolph, Schwabach)
- Mikroplatten-Waschgerät ELx50 (Biotek, Bad Friedrichshall)
- Mikroskop (Leitz, Wetzlar)
- Mikroskop (Zeiss, Oberkochen)
- Multipipette, Multipette plus (Eppendorf, Hamburg)
- pH-Meter, HI 2211 pH/ORP Meter (HANNA Instruments, Woonsocket/USA)
- Photometer, BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg)
- Pipetten, 0,5-10 µL, 10-100 µL und 100-1000 µL, Research (Eppendorf, Hamburg)
- Pipettierhilfe, Pipetus-akku (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt)
- Plattenleser, Spark 10M (Tecan, Crailsheim)

- Rollenschüttler, CAT RM 5 (Neolab, Heidelberg)
- Rollenschüttler, RS-TR05 (Phoenix Instrument, Garbsen)
- Schüttler, Titramax 101 (Heidolph, Schwabach)
- Standzentrifuge, Multifuge 3 S-R (Heraeus, Osterode)
- Standzentrifuge, Varifuge 3.0RS (Heraeus, Osterode)
- Standzentrifuge, Z 400 K (Hermle, Wehingen)
- StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt)
- Sterile Werkbank, KR-210 (Kojair, Vilppula/Finnland)
- Thermomixer compact und comfort (Eppendorf, Hamburg)
- Tischzentrifuge, 5417 R (Eppendorf, Hamburg)
- Ultraschallgerät, Vibra Cell (Sonics & Materials, Danbury/USA)
- UV-Cleaner Box, UVC/T (Lab4You, Berlin)
- Vortex, Reax control (Heidolph, Schwabach)

### 3.1.2 Laborbedarf

- Amersham Protran Nitrozellulosemembran, 0,2  $\mu\text{M}$  und 0,45  $\mu\text{M}$  (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg)
- Bürker-Kammer mit Deckglas (Brandt, Wertheim)
- Combitips, steril und unsteril, 0,1 mL, 0,5 mL, 2,5 mL, 5 mL und 10 mL (Eppendorf, Hamburg)
- Cytospin-Aufsatz, Zyto-Container (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe)
- Deckgläser Automat Star (Engelbrecht, Edermünde)
- Einmalküvetten, UVette 220 – 1600 nm (Eppendorf, Hamburg)
- Einmalspritzen Injekt 20 mL (B. Braun, Melsungen)
- Elektroporationsküvetten, *Gene Pulser/MicroPulser*, 0,4 cm (Bio-Rad Laboratories, München)
- FACS-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht)
- Falconröhrchen mit Schraubverschluss, 15 mL (Corning, Amsterdam/Niederlande)
- Falconröhrchen mit Schraubverschluss, 50 mL (Sarstedt, Nümbrecht)
- Filter, Millex® GP, 0,22  $\mu\text{M}$ , steril (Merck Millipore, Darmstadt)
- Filterkarten für Zytozentrifugation (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe)
- Frischhaltefolie (wechselnde Hersteller)
- Gel-Blotting-Papier GB003 (Schleicher und Schuell, Dassel)

- Gelkämme, 15 Zähne (Bio-Rad Laboratories, München)
- Glasplatten, Outer Glass Plates Mini-Protean (Bio-Rad Laboratories, München)
- Glasplatten, Short Plates, Mini-Protean (Bio-Rad Laboratories, München)
- Klebefolien, MicroAmp Optical Adhesive Film (Applied Biosystems, Darmstadt)
- Kühleinheit (Bio-Rad Laboratories, München)
- MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate, 0,1 mL (Applied Biosystems, Darmstadt)
- MicroAmp Fast Reaction Tubes, 8 Tubes/Strip (Applied Biosystems, Darmstadt)
- MicroAmp Optical 8-Cap Strip (Applied Biosystems, Darmstadt)
- Mikroreaktionsgefäß, 0,75 mL (Frötek Kunststofftechnik, Osterode)
- Nitril-Einmalhandschuhe (Abena, Zörbig)
- Objektträger (R. Langenbrinck, Emmendingen)
- Pipettenspitzen, 1-10 µL und 10-100 µL (Sarstedt, Nümbrecht)
- Pipettenspitzen, epT.I.P.S Reloads 50-1000 µL (Eppendorf, Hamburg)
- Pipettenspitzen, SafeSeal SurPhob, steril, 1-10 µL, 10-100 µL und 100-1000 µL (Biozym, Oldendorf)
- Reaktionsgefäße, 1,5 mL und 2,0 mL (Sarstedt, Nümbrecht)
- Reaktionsgefäße, Safe-Lock Tubes, 0,5 mL (Eppendorf, Hamburg)
- Rührfisch (Roth, Karlsruhe)
- Schwammkissen, 8 x 11 cm (Bio-Rad Laboratories, München)
- Serologische Auslaufpipetten, costar Stripette, 5 mL, 10 mL und 25 mL (Corning, Amsterdam/Niederlande)
- Transferpipette steril, api PSipettes (bioMérieux, Marcy-l'Étoile/Frankreich)
- Transferpipette unsteril, 3,5 mL (Sarstedt, Nümbrecht)
- Vacutainer (BD, Lyngby/Dänemark)
- Zellkulturflaschen, Nunclon, 25 cm<sup>2</sup> und 75 cm<sup>2</sup> (Nunc, Roskilde/Dänemark)
- Zellkulturplatten, 6-, 12-, 24-, 48- und 96-Loch (Corning, Amsterdam/Niederlande)

### 3.1.3 Zellkulturmedien und Zusätze

- Fetales Kälberserum (FCS) (Lonza, Verviers/Belgien)
- Kulturmedium RPMI 1640 ohne L-Glutamin (Sigma-Aldrich, Steinheim)

- L-Glutamin, 200 mM (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Natriumpyruvat, 100 mM (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Nicht-essenzielle Aminosäuren, 100x (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- PBS, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline ohne  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{MgCl}_2$  (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Penicillin, 10.000 U/mL (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Streptomycin, 10 mg/mL (Sigma-Aldrich, Steinheim)

### 3.1.4 Antikörper

- Anti-human-CD3-FITC konjugiert, Klon UCHT1 (BD, Heidelberg)
- Anti-human-CD3-PE konjugiert, Klon HIT3a (BD, Heidelberg)
- Anti-human-CD3-PE konjugiert, Klon UCHT1 (BD, Heidelberg)
- Anti-human-CD69-APC konjugiert, Klon FN50 (BD, Heidelberg)
- Anti-human-HLA-ABC-PE konjugiert, Klon W6/32 (BioLegend, Kalifornien/USA)
- Isotypkontrolle  $\text{IgG}_1$ ,  $\kappa$ , APC konjugiert (BD, Heidelberg)
- Isotypkontrolle  $\text{IgG}_1$ ,  $\kappa$ , FITC konjugiert (BD, Heidelberg)
- Isotypkontrolle  $\text{IgG}_1$ ,  $\kappa$ , PE konjugiert (BD, Heidelberg)
- Isotypkontrolle  $\text{IgG}_{2a}$ ,  $\kappa$ , PE konjugiert (BD, Heidelberg)
- Kaninchen-anti-Acetyl-Histon H3 (K9) Antikörper (Cell Signaling, Frankfurt am Main)
- Kaninchen-anti-Acetyl-Histon H3 (K18) Antikörper (Cell Signaling, Frankfurt am Main)
- Kaninchen-anti- $\beta$ -Aktin Antikörper (Cell Signaling, Frankfurt am Main)
- Kaninchen-anti-c-Fos (9F6) Antikörper (Cell Signaling, Frankfurt am Main)
- Kaninchen-anti-Histon H3 Antikörper (Cell Signaling, Frankfurt am Main)
- Kaninchen-anti-Phospho-Histon H3 (S10) Antikörper (Cell Signaling, Frankfurt am Main)
- Kaninchen-anti-Phospho-NF-kappaBp65 (S276) Antikörper (Cell Signaling, Frankfurt am Main)
- Kaninchen-anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk 1/2) (T202/Y204) Antikörper (Cell Signaling, Frankfurt am Main)
- Kaninchen-anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) Antikörper (Cell Signaling, Frankfurt am Main)

- Kaninchen-anti-Phospho-PKA Substrat (RRXS<sup>\*</sup>/T<sup>\*</sup>) (100G7E) Antikörper (Cell Signaling, Frankfurt am Main)
- Maus-anti-CREM (C-2) Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
- Pferd-anti-Maus-IgG-Antikörper, HRP-konjugiert (Cell Signaling, Frankfurt am Main)
- Ziege-anti-Biotin-Antikörper, Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugiert (Cell Signaling, Frankfurt am Main)
- Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, HRP-konjugiert (Cell Signaling, Frankfurt am Main)

### 3.1.5 Kommerziell erhältliche Kits

- ER-ID<sup>®</sup> Red Assay Kit (Enzo Life Sciences, Lörrach)
- Fluoregenic HDAC1 Assay Kit (BPS Bioscience, San Diego/USA)
- *mirVana*<sup>™</sup> miRNA Isolation Kit (Ambion/Life Technologies, Darmstadt)
- NucleoSpin RNA<sup>®</sup> II Kit (Macherey-Nagel, Düren)
- OptEIA<sup>™</sup> human IL-2 ELISA Set (BD, Heidelberg)
- OptEIA<sup>™</sup> muriner IL-2 ELISA Set (BD, Heidelberg)
- Puffer Set für Schweine IL-2 CytoSet ELISA (Life Technologies, Darmstadt)
- QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden)
- qScript<sup>™</sup> cDNA Synthese Kit (Quanta Bioscience/VWR, Darmstadt)
- Swine IL-2 CytoSet ELISA (Life Technologies, Darmstadt)
- TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Assays, has-miR-146a und U6 snRNA (Applied Biosystems, Darmstadt)
- TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Darmstadt)

### 3.1.6 Sonstige Reagenzien

- Acrylamid/Bis-Lösung, 30 %-ig (Serva, Heidelberg)
- Agarose (Biozym, Oldendorf)
- Albumin Fraction V (AppliChem Panreac, Darmstadt)
- Ammoniumpersulfat, APS (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Aqua ad iniectabilia (B. Braun, Melsungen)
- Aqua bidest. (Universitätsklinikum Aachen)
- Aqua B. Braun/Spüllösung (B. Braun, Melsungen)

- Biocoll, Ficoll 1.077 g/mL (Biochrom, Berlin)
- Biotinylierte Proteinleiter (Cell Signaling, Frankfurt am Main)
- Bromphenolblau (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Calcimycin, Cal/A23187 (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Calciumchlorid, CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Chelex 100, Natrium-Form, trocken (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Chloroform (Merck, Darmstadt)
- Dimethylsulfoxid, DMSO (Merck, Darmstadt)
- DNA-Leiter, O'Range Ruler, 50 und 100 bp (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- Eisessig (Merck, Darmstadt)
- Ethanol, absolut (VWR, Darmstadt)
- Ethanol, 70 %, vergällt (Universitätsklinikum Aachen)
- Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Ethylendiamintetraacetat, EDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- FluoZin-3 Acetoxymethylester (AM) (Invitrogen, Darmstadt)
- FluoZin-3 A *Tetrapotassium Salt* (Invitrogen, Darmstadt)
- gefärbter Proteinleiter (New England BioLabs, Frankfurt am Main)
- 6x Gel-Ladepuffer, O'Range 6x Loading Dye Solution (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- Glucose (Merck, Darmstadt)
- Glycerin (Roth, Karlsruhe)
- Glycin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Hepes (AppliChem, Darmstadt)
- IL-1 $\beta$  (500 ng/mL), rekombinant, human (PeproTech, Rocky Hill, USA)
- Kaliumchlorid, KCl<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt)
- 20x LumiGLO Reagenz und 20x Peroxid (Cell Signaling, Frankfurt am Main)
- Magermilchpulver (Saliter, Obergrünzburg)
- Magnesiumchlorid, MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Malachite Green Additive (Merck, Darmstadt)
- Malachite Green Solution A (Merck, Darmstadt)
- $\beta$ -Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)
- Methanol (VWR, Darmstadt)
- MTF-1 HSS181362, 20 nMol Stealth RNAi (Invitrogen, Darmstadt)
- Natriumchlorid, NaCl (AppliChem, Darmstadt)

- Natriumdihydrogenphosphat, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Natriumdodecylsulfat, SDS (Merck, Darmstadt)
- Natriumpyrithion (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Natronlauge, NaOH, 1 M (Merck, Darmstadt)
- OptEIA TMB Substrat Reagenz Set (BD, Heidelberg)
- Phorbol-12-Myristat-13-Acetat, PMA (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Phytohämagglutinin, PHA (Biochrom, Berlin)
- Ponceau S (AppliChem, Darmstadt)
- Power SYBR Green (Applied Biosystems, Darmstadt)
- Propidiumiodid (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Protein Phosphatase 2 Substrat „RRApTVA“ (Enzo Life Sciences, Lörrach)
- Salzsäure, HCl, 1 M (Merck, Darmstadt)
- *Silencer*® Select Negative Control No. 1 siRNA (Invitrogen/Thermo Fisher, Darmstadt)
- TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems, Darmstadt)
- TEMED, N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- TPEN, N,N,N',N'-tetrakis-(2-pyridyl-methyl)ethyldiamin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Tris Base, Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Merck, Darmstadt)
- TRIzol® Reagenz (Ambion/Life Technologies, Darmstadt)
- Trypanblau, 0,4 % (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Tween-20 (Merck, Darmstadt)
- Zinpyr-1 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
- ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, Zinksulfat Heptahydrat (Sigma-Aldrich, Steinheim)

### 3.1.7 Software

- GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla/USA)
- ImageJ (NIH, Maryland/USA)
- Microsoft Office (Microsoft Corporation, Redmond/USA)
- Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad Laboratories, München)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultivierung und Passagieren von Zellen

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse wurden mithilfe der

- murinen T-Zelllinie EL-4 und den
- humanen T-Zelllinien HuT-78 und Jurkat

erarbeitet. Alle Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für die Kultivierung der Zelllinien wurde ein standardisiertes Nährmedium (RPMI 1640) verwendet, welches mit den in Tab. 1 dargestellten Reagenzien supplementiert wurde. Vor der Verwendung wurde das FCS bei 56°C für 30 min inaktiviert. Die Zelllinien wurden regelmäßig alle drei bis vier Tage mikroskopisch auf Kontamination und Vitalität kontrolliert und in frisches Medium umgesetzt.

**Tabelle 1: Verwendete Zelllinien.**

Zelllinie	Medium	Zusätze	Subkultivierung
EL-4 <sup>1</sup> (murine T-Zelllinie)	RPMI 1640	5 % FCS 2 mM L-Glutamin 100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin	Alle 3-4 Tage mit 1x10 <sup>4</sup> -2x10 <sup>4</sup> Zellen/mL
HuT-78 <sup>2</sup> (humane T-Zelllinie)		10 % FCS 2 mM L-Glutamin 100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin	Alle 3-4 Tage mit 5x10 <sup>4</sup> -1x10 <sup>5</sup> Zellen/mL
Jurkat <sup>2</sup> (humane T-Zelllinie)		10 % FCS 2 mM L-Glutamin 100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin 100 mM Natriumpyruvat 1 % 100x nicht-essenzielle Aminosäuren	Alle 3-4 Tage mit 5x10 <sup>4</sup> -1x10 <sup>5</sup> Zellen/mL

<sup>1</sup> Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Michael U. Martin (Gießen)  
<sup>2</sup> Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)

### 3.2.2 Kurzzeit-Zinkmangelmodell

#### Prinzip

Zur Analyse eines kurzzeitigen Zinkmangels wurden die HuT-78 und Jurkat T-Zelllinien für drei Tage in Medium, welches mit TPEN supplementiert wurde, inkubiert. TPEN ist ein Zinkchelator und in der Lage, Zink im Medium und in den Zellen zu binden, so dass weniger Zink zur Aufnahme in die Zellen zur Verfügung steht. Aus diesem Grund ist es wichtig, dass das Medium mit TPEN behandelt wird, bevor es zu den Zellen gegeben wird.

#### Reagenzien

- Calcimycin (Cal, 1 mM)
- PMA (1 µg/mL)
- TPEN (2 mM)
- Zellkulturmedium (Tab. 1)

#### Durchführung

- (1) Inkubation von  $5 \times 10^4$  Zellen/mL in Kontrollmedium oder TPEN-behandeltem (3 µM) Medium für drei Tage.
- (2) Nach dreitägiger Inkubation werden  $1 \times 10^6$  Zellen/mL in frisches Kontrollmedium oder TPEN-behandeltes (3 µM) Medium aufgenommen, in eine 24-Lochplatte ausgesät und für 1 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.
- (3) Stimulation von HuT-78 sowie Jurkat Zellen mit einer Kombination aus 10 ng/mL PMA sowie 1 µM Cal für 6 h. Parallel werden unstimulierte Zellen als Kontrolle mitgeführt.
  - Anschließende Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR.
- (4) Darüber hinaus werden die HuT-78 sowie Jurkat Zellen mit einer Kombination aus 10 ng/mL PMA sowie 0,1 µM Cal für 24 h stimuliert. Parallel werden unstimulierte Zellen als Kontrolle inkubiert.
  - Anschließende Analyse der IL-2-Konzentration in den Überständen mittels ELISA.

### 3.2.3 Zinkflux-Modell

#### Prinzip

EL-4, HuT-78 und Jurkat T-Zellen werden für drei Tage entweder in Kontroll- oder in TPEN-behandeltem Medium kultiviert, worauf ein Mediumswechsel folgt. Dabei wird das Kontrollmedium gegen frisches Kontrollmedium ausgetauscht und entspricht dem Ansatz wo/wo (*without/without* TPEN). Das TPEN-behandelte Medium wird entweder erneut gegen TPEN-behandeltes Medium ausgetauscht und entspricht somit dem Ansatz w/w (*with/with* TPEN) oder es wird gegen frisches Kontrollmedium ausgetauscht und entspricht dem Ansatz w/wo (*with/without* TPEN). Durch den Austausch des TPEN-haltigen zinkdefizienten Mediums gegen Kontrollmedium kommt es zu einem verstärkten Zinkeinstrom in die Zellen.

#### Reagenzien

- Cal (1 mM)
- IL-1 $\beta$  (500 ng/mL)
- PMA (1  $\mu$ g/mL)
- TPEN (2 mM)
- Zellkulturmedium (Tab. 1)

#### Durchführung

- (1) Inkubation von  $5 \times 10^4$  Zellen/mL in Kontrollmedium oder TPEN-behandeltem Medium für drei Tage. Die murinen EL-4 Zellen werden in Medium mit 1,5  $\mu$ M TPEN inkubiert, während HuT-78 sowie Jurkat Zellen in Medium mit 3  $\mu$ M TPEN inkubiert werden.
- (2) Nach dreitägiger Inkubation werden  $1 \times 10^6$  Zellen/mL
  - a. aus Kontrollmedium in frisches Kontrollmedium (wo/wo) überführt,
  - b. aus TPEN-behandeltem Medium (w/wo) in frisches Kontrollmedium überführt oder
  - c. aus TPEN-behandeltem Medium erneut in TPEN-behandeltes Medium (w/w) überführtund in eine 24-Lochplatte ausgesät.
- (3) Stimulation der Zellen mit 0,5 ng/mL IL-1 $\beta$  sowie PMA/Cal (10 ng/mL und 0,1  $\mu$ M) für 24 h. Parallel werden unstimulierte Zellen als Kontrolle mitgeführt.

- (4) Nach 24 h werden die Überstände abgenommen und mittels ELISA hinsichtlich der IL-2-Konzentration untersucht.

### 3.2.4 Langzeit-Zinkmangelmodell

#### Prinzip

Um den Einfluss eines langzeitigen Zinkmangels auf T-Zellen zu untersuchen, werden die Zellen in Medium inkubiert, welches mit Chelex-Kügelchen behandelt wurde. Chelex ist in der Lage, zweiwertige Kationen im Medium zu binden. Andere Studien zeigten, dass neben Zink die  $Mg^{2+}$ - sowie die  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen durch Chelex beeinflusst werden. Aus diesem Grund wird das Medium nach der Chelex-Behandlung mit  $MgCl_2$  sowie  $CaCl_2$  resupplementiert (59, 60). Außerdem scheinen die Chelex-Kügelchen selbst einen Einfluss auf die Zytokinproduktion des innate Immunsystems zu besitzen (60), weshalb es wichtig ist, die Chelex-Kügelchen zu recyceln, bevor das behandelte Medium für Versuche verwendet werden kann.

#### 3.2.4.1 Herstellung von Zink-freiem Medium mittels Chelex-Kügelchen

##### Reagenzien

- A. braun
- $CaCl_2$  (2 M)
- Chelex-Kügelchen
- HCl (1 M)
- $MgCl_2$  (200 mM)
- NaOH (1 M)
- Zellkulturmedium (Tab. 1)
- $ZnSO_4$  (1 mM)

##### Durchführung

- (1) 2,5 g Chelex-Kügelchen abwiegen und mit 50 mL Medium in einem 50 mL-Röhrchen auffüllen.
- (2) 1 h bei RmT auf einem Rollenschüttler rollen lassen.
- (3) Medium ohne Chelex-Kügelchen mit einer Glaspipette abnehmen. Nach der ersten Inkubation der Chelex-Kügelchen mit Medium muss das Medium verworfen werden, um die Kügelchen zu recyceln. Erst bei der nächsten

Behandlung des Mediums mit Chelex kann das Medium für anschließende Versuche verwendet werden.

- Der pH-Wert des Mediums wird auf 7,4 eingestellt, was dem pH-Wert im Kontrollmedium entspricht.
  - Zugabe von  $\text{MgCl}_2$  (400  $\mu\text{M}$ ) sowie  $\text{CaCl}_2$  (500  $\mu\text{M}$ ) zum Medium.
  - Medium steril filtrieren.
  - Supplementation des Mediums mit 50  $\mu\text{g/L}$   $\text{ZnSO}_4$  (CH50) oder mit 75  $\mu\text{g/L}$   $\text{ZnSO}_4$  (CH75).
- (4) 5 mL HCl zu den Chelex-Kügelchen pipettieren, um diese zu recyceln.
  - (5) 1 h bei RmT auf einem Rollenschüttler rollen lassen.
  - (6) HCl mit Glaspipette abnehmen.
  - (7) 5 mL NaOH zu den Chelex-Kügelchen pipettieren.
  - (8) 1 h bei RmT auf einem Rollenschüttler rollen lassen.
  - (9) NaOH mit Glaspipette abnehmen.
  - (10) 12,5 mL A. braun zu den Chelex-Kügelchen pipettieren.
  - (11) 15 min bei RmT auf einem Rollenschüttler rollen lassen.
  - (12) 5 mL A. braun zu den Chelex-Kügelchen pipettieren und bis zum nächsten Gebrauch bei 4°C im Kühlschrank lagern.

### 3.2.4.2 Langzeit-Zinkmangel

#### Reagenzien

- Cal (1 mM)
- PHA (1 mg/mL)
- PMA (1  $\mu\text{g/mL}$ )
- Zellkulturmedium (Tab. 1 und Kap. 3.2.4.1)

#### Durchführung

- (1) Inkubation von HuT-78 sowie Jurkat Zellen für drei Wochen in Kontrollmedium bzw. in Chelex-behandeltem Medium (Kap. 3.2.4.1). In dieser Zeit erfolgt eine Subkultivierung der Zellen, wie in Tab. 1 beschrieben.
- (2) Nach drei Wochen  $1 \times 10^6$  Zellen/mL in Kontroll- oder CH50-Medium pro Loch in eine 24-Lochplatte pipettieren.
- (3) Stimulation der Zellen mit 2,5  $\mu\text{g/mL}$  PHA sowie PMA/Cal (10 ng/mL und 0,1  $\mu\text{M}$ ) für 6 h und 24 h zur Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene mittels

qRT-PCR oder zur Analyse der IL-2-Konzentration in den Überständen mittels ELISA nach 24 h. Für die Analyse mittels Western Blot werden die Zellen, je nach Fragestellung, für unterschiedliche Zeiträume stimuliert (1 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h und 72 h) oder direkt aus der Zellkultur in Probenpuffer aufgenommen.

### 3.2.5 Isolierung von *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) aus Schweineblut

#### Prinzip

Die Dichte von PBMC ist geringer als die Dichte der Erythrozyten sowie Granulozyten. Diese Tatsache wird sich bei der Isolierung von PBMC aus dem Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll zu Nutze gemacht. Ficoll besteht aus Polysucrose und besitzt eine Dichte von 1,077 g/mL. Nach der Dichtegradientenzentrifugation sind verschiedene Phasen sichtbar. Die oberste Schicht besteht aus Serum, gefolgt von einer Interphase, die die PBMC beinhaltet. Unter den PBMC befindet sich das Ficoll durch das, aufgrund der höheren Dichte, die Granulozyten und Erythrozyten sedimentiert sind. Der Gradient wird mit den Erythrozyten, die sich am Boden befinden, abgeschlossen.

#### Reagenzien

- A. braun
- Ficoll (1,077 g/mL)
- PBS (1x und 2x)
- RPMI 1640 + 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin
- Schweineblut (Lithium-Heparin-Blut-Gemisch)
- Trypanblau

#### Durchführung

- (1) Lithium-Heparin-Blut in einem 50 mL-Röhrchen mit PBS 1:3 verdünnen.
- (2) 20 mL Blut/PBS-Gemisch auf 20 mL Ficoll schichten.
- (3) Dichtegradientenzentrifugation bei RmT für 20 min bei 600 g.
- (4) PBMC-Ringe der Interphase in einem 50 mL-Röhrchen sammeln und mit PBS auffüllen.

- (5) Zentrifugation bei RmT für 10 min bei 300 g.
- (6) Nach Entfernen des Überstandes 50 mL-Röhrchen erneut mit PBS auffüllen und bei RmT für 10 min und 300 g zentrifugieren.
- (7) Nach Entfernen des Überstandes 10 mL A. braun auf das Pellet geben, um die Erythrozyten zu lysieren.
- (8) Zügig mit 10 mL 2x PBS auffüllen und Röhrchen anschließend mit 1x PBS auffüllen.
- (9) Zentrifugation bei RmT für 10 min bei 300 g.
- (10) Überstand dekantieren und das Pellet in 10 mL RPMI 1640 Medium aufnehmen.
- (11) Zellzahlbestimmung mittels Bürker-Zählkammer und Trypanblau (Kap. 3.2.6).
- (12) Einstellen der Zellen auf  $1 \times 10^6$  Zellen/mL für die anschließende intrazelluläre Zinkmessung mit FluoZin-3 AM sowie Bestimmung der IL-2-Produktion mittels ELISA und Einstellen auf  $2 \times 10^6$  Zellen/mL für die CREM $\alpha$ -Bestimmung mittels Western Blot.

### **3.2.6 Zellzahlbestimmung mittels Bürker-Zählkammer**

#### Prinzip

Die Zellzahlbestimmung wurde mit Hilfe von Trypanblau durchgeführt, um die lebenden von den toten Zellen zu unterscheiden. Lebende Zellen schließen den sauren Farbstoff Trypanblau aus und erscheinen unter dem Mikroskop weiß, während tote Zellen den Farbstoff aufnehmen und blau erscheinen. Der spezifische Kammerfaktor beträgt 15,63 und muss neben der Verdünnung der Zellen mit Trypanblau in die Zellzahlberechnung mit eingerechnet werden.

#### Reagenzien

- Trypanblau

#### Durchführung

- (1) Zugabe von 10  $\mu$ L Zellen zu 10  $\mu$ L Trypanblau in einem Reaktionsgefäß.
- (2) Pipettieren von 10  $\mu$ L Zell/Trypanblau-Gemisch in die Bürker-Zählkammer.
- (3) Zählen der Zellen am Mikroskop.

### 3.2.7 DNA-Isolierung zur Bestimmung des Methylierungsmusters

#### Prinzip

Die DNA-Isolierung wurde mit Hilfe des QIAamp Mini Kits (Qiagen) durchgeführt. Bei dieser Methode werden die Zellen zunächst mit einem Lysepuffer behandelt, der Proteinase K beinhaltet. Dadurch werden einerseits die Zellen aufgeschlossen und andererseits Proteine im Zelllysate abgebaut. Die Proben werden auf ein QIAamp Mini Spin Reaktionsgefäß aufgetragen und die DNA bindet an die Silica-Membran. Waschschriffe mit Puffern folgen und zum Schluss wird die DNA mit Wasser eluiert. Im Anschluss an die Isolierung wurde die Firma Life & Brain Center in Bonn mit der Analyse der DNA Methylierungsmuster mittels EPIC MethyIscreen Array beauftragt.

#### Reagenzien

- Alle Kitbestandteile des QIAamp DNA Mini Kits
- Ethanol (100 %)
- Nukelase-freies Wasser

#### Durchführung

- (1) Nachdem die Jurkat Zellen für drei Wochen entweder in Kontroll- oder CH50-Medium kultiviert wurden, wurde die DNA von  $3 \times 10^6$  Zellen nach Angaben des Herstellers isoliert.
- (2) Bestimmung der DNA-Konzentration, wie in Kap. 3.2.8 beschrieben, und Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- (3) Durchführung eines EPIC MethyIscreen Array durch das Life & Brain Center zur Analyse des DNA Methylierungsmusters.

### 3.2.8 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentrationen

#### Prinzip

Die Konzentration und Reinheit der RNA sowie der DNA lassen sich mithilfe einer photometrischen Messung über die optische Dichte ermitteln.

Die Lichtabsorption einer Lösung ist nach dem Lambert Beer'schen Gesetz proportional zu der Konzentration einer Substanz, die sich in dieser Lösung befindet.

Damit ist der RNA/DNA-Gehalt linear abhängig von der Extinktion der Lösung; vgl. Formel 1 für die RNA-Konzentration und Formel 2 für die DNA-Konzentration.

Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$ , während das Absorptionsmaximum von Proteinen bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$  liegt und ebenfalls durch das Photometer gemessen wird. Der Quotient  $E_{260/280}$  liefert Aufschluss über die Reinheit der RNA und DNA und sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen. Ist der Reinheitskoeffizient  $E_{260/280}$  kleiner, liegt eine Protein-Verunreinigung der RNA bzw. DNA vor. Die Berechnung der RNA-Konzentration erfolgt mithilfe von Formel 1, während die DNA-Konzentration mithilfe von Formel 2 berechnet wird.

#### Formel 1:

$$\text{Konzentration} \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right] = \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Extinktion bei } 260 \text{ nm} * 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

#### Formel 2:

$$\text{Konzentration} \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right] = \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Extinktion bei } 260 \text{ nm} * 50 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

#### Reagenzien

- Nukelase-freies Wasser
- isolierte DNA bzw. RNA

#### Durchführung

- (1) Messung eines Blankwerts mit 100  $\mu\text{L}$  Nuklease-freiem Wasser am Photometer.
- (2) Messung der 1:10 verdünnten RNA in Nuklease-freiem Wasser am Photometer, während die DNA unverdünnt gemessen wird.

### 3.2.9 RNA-Isolierung

#### Prinzip

Die Isolation der RNA aus Zelllinien erfolgte mithilfe des NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II-Kits (Macherey-Nagel). Die Zellen werden zunächst mit einem Lysepuffer behandelt, der chaotrope Salze beinhaltet. Dadurch werden die geordneten Wasserstoffbrückenbindungen gestört und RNasen inaktiviert. Anschließend wird die RNA an die Silica-Membran einer Säule gebunden, die als Anionentauscher fungiert. Kontaminierende DNA wird durch den Einsatz von rDNase abgebaut. Weitere

Waschschritte mit Puffern entfernen Metabolite und Salze, und die reine RNA wird am Ende mit RNase-freiem Wasser eluiert.

### Reagenzien

- Alle Kitbestandteile des NucleoSpin® RNA II-Kits
- $\beta$ -Mercaptoethanol
- Ethanol (70 %)
- RNase-freies Wasser

### Durchführung

- (1) Inkubation und Stimulation der Zellen entsprechend des Kurzzeit- sowie des Langzeit-Zinkmangelmodells (Kap. 3.2.2 und 3.2.4).
- (2) Durchführung der RNA-Isolierung nach Angaben des Herstellers.
- (3) Bestimmung der RNA-Konzentration, wie in Kap. 3.2.8 beschrieben, gefolgt von reverser Transkription in cDNA (Kap. 3.2.10). Lagerung der RNA bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **3.2.10 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)**

### Prinzip

Zur Synthese von *complementary* DNA (cDNA) wird das qScript™ cDNA Synthesis Kit (Quanta Biosciences) verwendet. Der in diesem Kit enthaltene qScript Reaktionsmix beinhaltet u.a. *Random*- sowie Oligo-dT-Primer. Letztere sind zum Poly-A-Schwanz am 3'-Ende der eukaryotischen mRNA komplementär und führen zu einer Synthese der cDNA in voller Länge. Die *Random*-Primer bestehen in der Regel aus sechs bis neun Nukleotiden mit jeder möglichen Abfolge von Basen. Die Primer binden an die umzuschreibende mRNA und dienen der reversen Transkriptase als Ausgangspunkt für die cDNA-Synthese.

### Reagenzien

- alle Kitbestandteile aus dem qScript™ cDNA Synthesis Kit

### Durchführung

- (1) 1  $\mu\text{g}$  RNA in 15  $\mu\text{L}$  RNase-freies Wasser pipettieren.

- (2) Zusätzlich werden die in Tab. 2 dargestellten Komponenten zu jedem Ansatz pipettiert.

Tabelle 2: Pipettierschema für einen cDNA-Synthese-Ansatz.

Reagenzien	Menge/ $\mu\text{L}$
RNA-Template (1 $\mu\text{g}$ )	y
RNase-freies Wasser	15-y
5x qScript-Reaktionsmix	4
qScript reverse Transkriptase (50 U/ $\mu\text{L}$ )	1
Gesamtvolumen	20

- (3) Inkubation der Proben, wie in Tab. 3 ausgewiesen.

Tabelle 3: Temperaturprofil der cDNA-Synthese.

Schritt	Zeit	Temperatur
1	5 min	25°C
2	60 min	42°C
3	5 min	85°C

- (4) Lagerung der cDNA bei -20°C bis zur weiteren Verwendung.

### 3.2.11 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

#### Prinzip

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) können bestimmte Genabschnitte gezielt amplifiziert werden. Die qRT-PCR bietet die Möglichkeit, das Produkt während der Synthese in Echtzeit zu quantifizieren. Die PCR setzt sich aus der wiederholenden Abfolge eines Zyklus zusammen, der aus den drei Schritten, Denaturierung der dsDNA, Anlagerung der Primer an die Zielsequenz und Elongation des Produkts, besteht.

Neben der zu vervielfältigenden Ziel-DNA besteht ein PCR-Ansatz aus den vier verschiedenen Nukleotiden (A, T, G, C), einem *forward* sowie einem *reverse* Primer,

einer hitzestabilen DNA-Polymerase, einem Farbstoff und einem Puffer. Die Zielsequenz wird durch die spezifischen Primer eingegrenzt.

Das Fluorochrom *SYBR Green* lagert sich während der Synthese der dsDNA in diese ein, wodurch die Fluoreszenz (Emission bei  $\lambda = 521 \text{ nm}$ ) mit der Menge an dsDNA zunimmt und die exponentielle Phase sichtbar gemacht werden kann. Die Zunahme des PCR-Produkts korreliert somit von Zyklus zu Zyklus mit der Fluoreszenzzunahme. Mithilfe der gemessenen Fluoreszenzintensität wird der *Cycle Threshold* ( $C_T$ ) bestimmt. Dieser gibt den PCR-Zyklus an, in dem die Fluoreszenz der Probe erstmalig signifikant die unspezifische Fluoreszenzemission überschreitet. Der  $C_T$ -Wert lässt daher in Verbindung mit einem Referenzgen Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge des Produkts zu. Je mehr DNA zu Beginn der PCR vorhanden ist, desto geringer ist der  $C_T$ -Wert.

Der DNA-Gehalt wird durch die Bildung einer Differenz aus dem  $C_T$ -Wert der Probe und dem  $C_T$ -Wert des Referenzgens ( $\Delta C_T$ ) normalisiert. Mithilfe der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode, bei der die Differenz aus dem  $\Delta C_T$ -Wert der Probe und dem  $\Delta C_T$ -Wert einer Kontrolle gebildet wird, kann die Stärke der Expression mit Formel 3 quantifiziert werden.

**Formel 3:**

$$\text{Expressionsniveau} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Reagenzien

- A. braun
- cDNA
- Power SYBR Green PCR Master Mix
- Primer (100  $\mu\text{M}$  in RNase-freiem Wasser); Sequenzen siehe Anhang

Durchführung

- (1) Erstellung eines Mastermix für jedes Primerpaar mit den in Tab. 4 dargestellten Reagenzien.

Tabelle 4: Pipettierschema für einen qRT-PCR-Ansatz.

Reagenzien	Menge/ $\mu\text{L}$
A. braun	5,00
SYBR Green Master Mix	12,50
<i>forward</i> Primer (2 $\mu\text{M}$ )	1,25
<i>reverse</i> Primer (2 $\mu\text{M}$ )	1,25
cDNA (1:2,5)	5,00
Gesamtvolumen	25,00

- (2) 20  $\mu\text{L}$  des Mastermix pro Loch in eine 96-Lochplatte pipettieren.
- (3) 5  $\mu\text{L}$  cDNA, die zuvor 1:2,5 mit sterilem A. braun verdünnt wurde, wird pro Gen als Doppelansatz in zwei Löcher der Reaktionsplatte pipettiert. Alle Ansätze werden in Duplikaten durchgeführt.
- (4) Die fertig pipettierte Platte wird in das Real-Time-PCR-Gerät (StepOnePlus) überführt und anschließend wird das in Tab. 5 dargestellte Temperaturprofil für die qRT-PCR eingestellt.

Tabelle 5: qRT-PCR-Temperaturprofil.

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
1	95°C	10 min	1
2	95°C	15 s	40
3	58°C <sup>1</sup> , 60°C <sup>2</sup> , 61°C <sup>3</sup> , 62°C <sup>4</sup> , 65°C <sup>5</sup>	30 s	40
4 (optional)*	70°C	5 min	1
5	20°C	unendlich	--

<sup>1</sup> IL-2 (human)

<sup>2</sup>  $\beta$ -Aktin (murin), CREM $\alpha$  (human und murin), IL-2 (murin), MTF-1 (human), PBGD (human), Zip1-Zip12 (human), Zip14 (human), ZnT1-ZnT9 (human)

<sup>3</sup> HDAC1 (human)

<sup>4</sup> hZip13 (human)

<sup>5</sup> ZnT10 (human)

\* Dieser Schritt (4) wurde zur Amplifikation für murine IL-2-Zielsequenzen und den dazugehörigen  $\beta$ -Aktin-Zielsequenzen eingeführt.

### 3.2.12 Agarose-Gelelektrophorese

#### Prinzip

Um die Reinheit der PCR-Produkte sowie die Spezifität der Primer zu überprüfen, wurde im Anschluss an die qRT-PCR eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Bei dieser Methode werden die DNA-Fragmente aufgrund ihrer Größe in einem Gel aufgetrennt, welches Ethidiumbromid enthält. Ethidiumbromid interkaliert in die dsDNA und kann mithilfe von UV-Licht sichtbar gemacht werden. Das Trennprinzip beruht auf der negativ geladenen DNA, die zur Anode wandert. Je kleiner die DNA-Fragmente sind, desto schneller wandern diese zur Anode.

#### Reagenzien

- Agarose
- DNA-Längenstandard (50 bp und 100 bp)
- Ethidiumbromid (10 mg/mL)

- Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer, 50x; 4 M Trisbase; 0,5 M EDTA; 57,1 mL Eisessig; pH 8,0)
- 6x Gel-Ladepuffer

### Durchführung

- (1) Zur Herstellung eines 1,5 %-igen Gels werden 0,75 g Agarose in 50 mL TAE-Puffer (1x) aufgenommen und für 5 min bei RmT inkubiert.
- (2) Anschließend ca. 1,5 min in einer Mikrowelle aufkochen, bis die Agarose komplett gelöst ist. Gemisch bis auf ca. 60°C abkühlen lassen. In der Zwischenzeit den Gelschlitten in die Gießhalterung einspannen und austarieren.
- (3) 1,5 µL Ethidiumbromid in das Agarose-Puffer-Gemisch pipettieren.
- (4) Die flüssige Gelmasse in den Gelschlitten gießen und den Kamm einstecken. Darauf achten, dass das Gel keine Luftblasen enthält.
- (5) Das Gel für ca. 30 min erstarren lassen und anschließend den Kamm herausnehmen.
- (6) Das Gel in die Elektrophoresekammer legen und mit TAE-Puffer (1x) bedecken.
- (7) Jeweils 25 µL der PCR-Amplifikate mit 4 µL Gel-Ladepuffer mischen und 12 µL in die Geltaschen pipettieren. Außerdem 12 µL des Längenstandards in eine Tasche des Gels pipettieren.
- (8) Anlegen einer elektrischen Spannung von 90 V für 60-95 min.
- (9) Analyse der Banden unter UV-Licht an einem Geldokumentationsgerät mithilfe der Computersoftware Quantity One.

### **3.2.13 miRNA-Isolierung**

#### Prinzip

Zur Isolierung der miRNA wurde das *mirVana*<sup>TM</sup> miRNA Isolation Kit (Ambion/Life Technologies) verwendet. Bei dieser Methode wird die organische Extraktion, die sich bei der RNA-Isolierung mit TRIzol zunutze gemacht wird und auf der Methode nach Chomczynski und Sacchi mit einer Mischung aus Phenol, Guanidiniumthiocyanat und Chloroform beruht (61), mit der Verwendung einer Silica-Membran (Kap. 3.2.9) kombiniert. Diese Kombination ist sinnvoll, da jede Methode einzeln betrachtet einige Nachteile in der Isolierung von kleinen RNA-Fragmenten

beinhaltet. Durch die Präzipitation der RNA mittels Ethanol, wie bei der Isolierung mit TRIzol, können kleine RNA-Fragmente nicht vollständig zurückgewonnen werden. Dasselbe gilt für die Methode unter alleiniger Verwendung von Silica-Membranen, wodurch eine ausreichende Rückgewinnung der kleinen RNA-Fragmente nicht gewährleistet werden kann. Durch die Kombination der beiden Methoden wird eine hohe Ausbeute von kleinen RNA-Fragmenten gewährleistet.

#### Reagenzien

- Alle Kitbestandteile des *mirVana*<sup>™</sup> miRNA Isolation Kit
- Ethanol (100 %)
- RNase-freies Wasser

#### Durchführung

- (1) Einstellen der Zellen auf  $1 \times 10^6$ /mL und aussäen in eine 24-Lochplatte.
- (2) Stimulation mit PMA/Cal (10 ng/mL und 0,1  $\mu$ M) für 3 h, 6 h, 24 h und 48 h. Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>.
- (3) Durchführung der miRNA-Isolierung nach Angaben des Herstellers.
- (4) Bestimmung der RNA-Konzentration, wie in Kap. 3.2.8 beschrieben, und Lagerung der miRNA bei -80°C bis zur Durchführung der TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Reverse Transkription.

### **3.2.14 TaqMan<sup>®</sup> miRNA Reverse Transkription**

#### Prinzip

Nachdem die RNA mithilfe des *mirVana*<sup>™</sup> miRNA Isolation Kits isoliert wurde, folgte eine Umschreibung in cDNA mithilfe des TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Reverse Transkription Kits (Applied Biosystems). Bei dieser Methode werden bereits bei der Umschreibung in cDNA spezifische Primer für die Detektion der Ziel-miRNA eingesetzt, um eine Amplifikation der zu untersuchenden miRNA sicherzustellen. Diese Primer sind sog. *stem-loop* Primer und führen zu einer *hairpin*-Struktur an der umzuschreibenden Ziel-miRNA, die als Ausgangspunkt bei der anschließenden TaqMan<sup>®</sup> PCR dient.

#### Reagenzien

- Alle Kitbestandteile des TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Reverse Transkription Kits

- miR-146a RT Primer (5x)
- Nuklease-freies Wasser
- snU6 RT Primer (5x)

### Durchführung

- (1) Durchführung nach Angaben des Herstellers.
- (2) Lagerung der cDNA bei -20°C bis zur weiteren Verwendung.

## 3.2.15 TaqMan<sup>®</sup> PCR

### Prinzip

Wie bei der qRT-PCR, kommt es bei dieser Methode zur Amplifikation der Ziel-cDNA mithilfe von spezifischen TaqMan<sup>®</sup> *Small RNA Assays*, in diesem Fall mithilfe von miR-146a sowie snU6 Primern und dem TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Mastermix II. Die TaqMan<sup>®</sup>-Sonden enthalten einerseits einen Reporterfarbstoff (FAM<sup>™</sup>), der sich am 5'-Ende der Sonde befindet, und andererseits einen *minor groove binder* (MGB), der sich am 3'-Ende der Sonde befindet. Diese Modifikation erhöht die Schmelztemperatur, ohne dass die Sondenlänge erhöht werden muss, was die Entwicklung kurzer Sonden ermöglicht. Außerdem befindet sich ein nicht-fluoreszierender Quencher (NFQ) am 3'-Ende der Sonde, wodurch eine genaue Messung des Reporterfarbstoffs gewährleistet wird. Während der PCR lagert die TaqMan<sup>®</sup>-Sonde spezifisch an die komplementäre Sequenz zwischen den *forward* und *reverse* Primerstellen an. Durch die Nähe des Reporterfarbstoffs zum Quencherfarbstoff kommt es zu einer Inhibition der Reporterfluoreszenz, v.a. bedingt durch den Förster-Energietransfer. Die DNA-Polymerase schneidet nur solche Sonden, die an die entsprechende Zielsequenz hybridisiert sind. Die Abspaltung des Reporterfarbstoffs vom Quencherfarbstoff resultiert in einer gesteigerten Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs, welche während der PCR aufgezeichnet wird.

### Reagenzien

- miR-146a TaqMan<sup>®</sup> *Small RNA Assay* (20x)
- Nuklease-freies Wasser
- snU6 TaqMan<sup>®</sup> *Small RNA Assay* (20x)
- TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix II (ohne UNG)

### Durchführung

- (1) Durchführung nach Angaben des Herstellers.
- (2) Die Auswertung erfolgt mithilfe der in Kap. 3.2.11 beschriebenen  $\Delta\Delta C_T$ -Methode, bei der die Expression der miR-146a auf das Referenzgen snU6 bezogen wird.

## **3.2.16 Proteingewinnung**

### Prinzip

Die Zellen werden in einem Probenpuffer aufgenommen, der u.a. das Detergens SDS enthält. SDS fördert die Denaturierung von Proteinen und durch Sonifikation wird außerdem die Lyse der Zellen gewährleistet. Dem Probenpuffer wird darüber hinaus frisches  $\beta$ -Mercaptoethanol zur Auflösung von Disulfidbrücken sowie Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) hinzugegeben, was Phosphatasen inhibiert.

### Reagenzien

- Probenpuffer (65 mM Tris-HCl; 2 % SDS; 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ; 26 % Glycerin; 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol und 0,01 % Bromphenolblau; pH 6,8)

### Durchführung

- (1) Jurkat Zellen auf  $1 \times 10^6$  Zellen/mL einstellen und, wie in Kap. 3.2.4.2 beschrieben, stimulieren. PBMC aus Schweinen auf  $2 \times 10^6$  Zellen/mL einstellen.
- (2) Proben in 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführen und für 5 min bei 300 g zentrifugieren.
- (3) Zellpellet in 100  $\mu\text{L}$  Probenpuffer aufnehmen und resuspendieren.
- (4) Sonifikation auf Eis für 10 s (Pulsfunktion; *output control*: 5; *duty cycle*: 50 %).
- (5) Inkubation der Proben bei 95°C für 5 min.
- (6) Lagerung der Proben bis zur Durchführung des Western Blots bei -20°C.

## **3.2.17 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

### Prinzip

Für die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese ist ein Sammel- sowie Trenngel mit jeweils verschiedenen verwendeten Puffersystemen charakteristisch. Während es im

Sammelgel zu einer Aufkonzentrierung der denaturierten Proteine kommt, werden diese im Trenngel aufgrund ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Das SDS bewirkt eine Auflösung der komplexen Quartär-, Tertiär- sowie teilweise der Sekundärstrukturen und lagert sich an die Proteine an. Die Proteine werden dadurch negativ geladen, weshalb eine Auftrennung aufgrund des Molekulargewichts möglich ist. In Abhängigkeit von der Acrylamidkonzentration entsteht ein Gel mit kleineren oder größeren Poren. Dadurch ist es möglich, auch sehr kleine Proteine sauber aufzutrennen, wie z.B. Histone.

### Reagenzien

- Acrylamid/Bis-Lösung (30 %)
- APS (10 %)
- biotinylierter Proteinleiter
- Elektrophoresepuffer (25 mM Tris-Base; 200 mM Glycin; 0,1 % SDS; pH 8,3)
- gefärbter Proteinleiter
- Probenpuffer (Kap. 3.2.16)
- TEMED
- TrisHCl-Puffer (0,5 M; pH 6,8)
- TrisHCl-Puffer (1,5 M; pH 8,8)

### Durchführung

- (1) Glasplatten säubern und in die Gießhalterung einsetzen.
- (2) Zur Analyse der Acetylierungen von Histon H3 (H3K9 und H3K18) und der Phosphorylierung von H3 (H3S10) sowie zur Analyse von CREM $\alpha$  werden 15 %-ige Trenngele hergestellt. Für die Analyse der übrigen Proteine werden 10 %-ige Trenngele verwendet (Tab. 6). Das Trenngel-Gemisch wird zwischen die Glasplatten gegossen, mit Wasser luftblasenfrei überschichtet und für 30 min auspolymerisiert.

Tabelle 6: Trenn- und Sammelgele für Western Blot.

Reagenzien	Trenngel		Reagenzien	Sammelgel
	10 %	15 %		4 %
A. dest.	3,55 mL	2,05 mL	A. dest.	2,08 mL
1,5 M TrisHCl, pH 8,8	2,34 mL	2,34 mL	0,5 M TrisHCl, pH 6,8	910 $\mu$ L
Acrylamid/Bis- Lösung (30 %)	3 mL	4,5 mL	Acrylamid/Bis- Lösung (30 %)	467 $\mu$ L
APS (10 %)	90 $\mu$ L	90 $\mu$ L	APS (10 %)	35 $\mu$ L
TEMED	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L	TEMED	7,8 $\mu$ L
Gesamtvolumen	9 mL	9 mL	Gesamtvolumen	3,5 mL

- (3) Anschließend wird das Wasser entfernt und mit dem Sammelgel überschichtet (Tab. 6). Käbme mit 15 Kammvertiefungen werden in das Sammelgel gesteckt und das Gel erneut für 30 min auspolymerisiert.
- (4) In der Zwischenzeit die Proben und den biotinylierten Proteinleiter für 5 min bei 95°C aufkochen.
- (5) Gel in die Gelkammer überführen.
- (6) 10  $\mu$ L pro Probe und 7,5  $\mu$ L biotinylierter Proteinleiter bzw. 3  $\mu$ L des gefärbten Proteinleiters in die jeweilige Kammvertiefung pipettieren.
- (7) Elektrophoresekammer mit 1x Elektrophoresepuffer befüllen.
- (8) Auftrennung der Proteine bei 170 V für ca. 1 h 15 min.
- (9) Das Gel wird für den anschließenden Western Blot (Kap. 3.2.18) weiter verwendet.

### 3.2.18 Western Blot

#### Prinzip

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Für den Nachweis kleiner Produkte, die auf einem 15 %-igen Gel aufgetrennt wurden, wird eine Membran mit kleiner Porengröße (0,2  $\mu$ M) verwendet, während größere Proteine, die auf einem 10 %-igen Gel aufgetrennt wurden, auf eine Membran mit größerer Porengröße (0,45  $\mu$ M) übertragen werden. Außerdem wird das SDS bei

diesem Schritt aus den Proteinen gewaschen, wodurch deren Renaturierung und damit die Wiederherstellung der Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen gefördert wird. Der darauf folgende Nachweis der Zielproteine erfolgt mithilfe spezifischer Antikörper. Damit unspezifische Bindungen der Antikörper an die Nitrozellulosemembran ausgeschlossen werden können, werden mögliche Bindungsstellen mit Magermilchpulver oder BSA abgeblockt. Die Primärantikörper können erst durch die Verwendung von Spezies-spezifischen Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpern sichtbar gemacht werden. Durch die HRP kann das Substrat LumiGlo umgesetzt und mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden.

### Reagenzien

- A. dest.
- BSA
- LumiGlo-Substratreagenz (pro Membran: 0,25 mL LumiGlo-Reagenz (20x); 0,25 mL Peroxid (20x); 4,5 mL A. dest.)
- Magermilchpulver
- Ponceau S
- Primärantikörper-Lösung (1:1.000 in TBS-T mit 5 % (w/v) BSA und 1:500 für CREM $\alpha$  in TBS-T mit 5 % (w/v) Magermilchpulver)
- Sekundärantikörper-Lösung (TBS-T mit 5 % (w/v) Magermilchpulver, Spezies-spezifischer HRP-konjugierter Sekundärantikörper [1:2.000]; HRP-konjugierter Anti-Biotin-Antikörper [1:1.000])
- TBS-T-Puffer (1x TBS; 0,1 % Tween-20)
- Transferpuffer (25 mM Tris Base; 0,2 M Glycin; 20 % Methanol; pH 8,5)
- 10x *Tris Buffered Saline* (TBS; 0,2 M Tris Base; 1,4 M NaCl; pH 7,6)

### Durchführung

- (1) Zum Zusammenbau des Blot-Sandwiches werden auf einem Schwammkissen und einem Gel-Blotting-Papier das SDS-Gel und die Nitrozellulosemembran platziert. Diese werden mit einem weiteren Blotting-Papier sowie einem Schwammkissen bedeckt. Für die spätere Analyse von H3, H3K9, H3K18, H3S10 sowie CREM $\alpha$  wird eine Nitrozellulosemembran mit einer Porengröße von 0,2  $\mu$ M verwendet, während für die Analyse der übrigen Proteine eine Membran mit einer Porengröße von 0,45  $\mu$ M verwendet wird.

- (2) Das zusammengebaute Sandwich in ein Blot-Modul platzieren, Kühleinheit und Rührfisch hinzugeben und das Modul mit dem Transferpuffer auffüllen.
- (3) Blotten bei 100 V für 1 h.
- (4) Färbung der Membran mit Ponceau S, um eine gleichmäßige Übertragung der Proteine zu überprüfen. Anschließend Waschen mit A. dest. und TBS-T.
- (5) Blocken der Membran in 25 mL Blocking-Puffer (3 % BSA [w/v] in TBS-T für 0,2  $\mu$ M Membranen und 5 % Milchpulver [w/v] in TBS-T für 0,45  $\mu$ M Membranen) für 1 h bei RmT.
- (6) 3-maliges Waschen der Membranen mit TBS-T für jeweils 5 min.
- (7) Inkubation mit Primärantikörper-Lösung unter Schwenken über Nacht bei 4°C.
- (8) 3-maliges Waschen der Membranen mit TBS-T für jeweils 5 min.
- (9) Inkubation mit Sekundärantikörper-Lösung unter Schwenken bei RmT für mindestens 2 h.
- (10) 3-maliges Waschen der Membranen mit TBS-T für jeweils 5 min.
- (11) Behandlung der Membranen mit LumiGlo-Substratlösung für 1 min.
- (12) Entwicklung am LAS 3000 und Auswertung mithilfe der ImageJ Software (NIH, USA).

### **3.2.19 Messung von freiem intrazellulärem Zink mittels Fluoreszenzsonden**

#### Prinzip

Mithilfe spezifischer Fluoreszenzsonden ist es möglich, den intrazellulären Zinkgehalt zu messen. In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Fluoreszenzsonden FluoZin-3 AM sowie Zinpyr-1 verwendet. Diese beiden Sonden erkennen und binden unterschiedliche Zinkstrukturen. Die besondere Eigenschaft von FluoZin-3 AM besteht darin, dass diese Sonde als Acetoxymethylester (AM) vorliegt und in dieser Form die Zellmembran passieren kann. Im Zellinneren wird die Estergruppe durch unspezifische Esterasen abgespalten. Die daraus resultierende geladene Carboxylgruppe verhindert, dass die Sonde wieder aus der Zelle hinaus diffundiert. FluoZin-3 akkumuliert intrazellulär, und bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge  $\lambda = 485$  nm wird Licht der Wellenlänge  $\lambda = 535$  nm emittiert, sofern diese freies Zink in der Zelle gebunden hat.

Mithilfe von Formel 4 kann die Zinkkonzentration nach der Messung an einem Durchflusszytometer berechnet werden. Durch die Inkubation mit dem Zink-Chelator

TPEN kann die Autofluoreszenz der Zellen ermittelt werden, was dem Minimalwert  $F_{\min}$  der Formel entspricht. Der Maximalwert  $F_{\max}$  entspricht der Fluoreszenz der Sonde bei maximaler Sättigung mit Zink und wird durch die Inkubation der Zellen mit Zink und dem Ionophor Pyrithion bestimmt.

**Formel 4:**

$$[Zn^{2+}] = K_D * \left( \frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F} \right)$$

$K_D$  (FluoZin-3) = 8,9 nM

$K_D$  (Zinpyr-1) = 0,7 nM

$F_{\min}$  = Autofluoreszenz der Zellen

$F_{\max}$  = Fluoreszenz der Sonde bei maximaler Zinksättigung

Reagenzien

- FluoZin-3 AM (1 mM in DMSO)
- Messpuffer (MP, 5 mM Glucose; 1 mM  $MgCl_2$ ; 1 mM  $NaH_2PO_4$ ; 1,3 mM  $CaCl_2$ ; 25 mM HEPES; 120 mM NaCl; 5,4 mM KCl; pH 7,35)
- Pyrithion (5 mM)
- TPEN (2 mM)
- Zinpyr-1 (5 mM in DMSO)
- $ZnSO_4$  (10 mM)

Durchführung

- (1)  $1 \times 10^6$  Zellen in 250  $\mu$ L MP aufnehmen, welcher zuvor mit FluoZin-3 AM (1  $\mu$ M) bzw. mit Zinpyr-1 (10  $\mu$ M) versetzt wurde (Tab. 7).
- (2) Proben für 30 min bei 37°C im Wasserbad im Dunkeln schwenken.
- (3) Waschen durch Zugabe von 2 mL MP und Zentrifugation bei 300 g für 5 min.
- (4) Zellpellet in 1 mL MP aufnehmen, resuspendieren und à 300  $\mu$ L auf drei neue Reaktionsgefäße verteilen.
- (5) Ein Reaktionsgefäß bleibt unbehandelt, das zweite Reaktionsgefäß wird mit TPEN versetzt (50  $\mu$ M) und in das dritte Reaktionsgefäß werden jeweils Zink (100  $\mu$ M) und Pyrithion (50  $\mu$ M) pipettiert (Tab. 7).

Tabelle 7: Pipettierschema für die Fluoreszenzsonden FluoZin-3 AM und Zinpyr-1.

	FluoZin-3 AM	Zinpyr-1
Endkonzentration	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$
Autofluoreszenz	50 $\mu\text{M}$ TPEN	50 $\mu\text{M}$ TPEN
Maximalfluoreszenz	100 $\mu\text{M}$ ZnSO <sub>4</sub> 50 $\mu\text{M}$ Pyrithion	100 $\mu\text{M}$ ZnSO <sub>4</sub> 50 $\mu\text{M}$ Pyrithion
Anregungswellenlänge	485 nm	485 nm
Emissionswellenlänge	535 nm	535 nm

- (6) Proben für 10 min bei 37°C im Wasserbad im Dunkeln schwenken.
- (7) Messung von 10.000 Zellen am Durchflusszytometer.
- (8) Verwendung der mittleren Fluoreszenzintensität für die Auswertung.

### 3.2.20 Zinkmessung mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)

#### Prinzip

Mithilfe der AAS können verschiedene Elemente quantitativ analysiert werden. Durch eine Lichtquelle wird Licht verschiedener Wellenlänge emittiert. Im Strahlengang befindet sich eine Atomisierungseinheit, in der die Bestandteile der untersuchten Probe, bspw. durch eine Gasflamme atomisiert, also in einzelne, anregbare Atome, überführt werden. Der Lichtstrahl wird in der Atomwolke geschwächt, und dessen Intensität wird hinter der Atomisierungseinheit gemessen und mit der Intensität des ungeschwächten Lichts verglichen. Dabei wird detektiert, wie viel des eingestrahnten Lichts einer bestimmten Wellenlänge durch das Element absorbiert wurde, wobei das Lambert-Beer'sche Gesetz gilt. Jedes chemische Element besitzt ein charakteristisches Linienspektrum, weshalb durch die Auswertung eines Differenzspektrums zu einer Referenzmessung ohne Probe Aussagen über die Elemente gemacht werden können, die in der Probe vorhanden sind.

#### Reagenzien

- A. braun
- Waschpuffer (0,9 % NaCl; 10 mM EDTA; 10 mM Hepes)

### Durchführung

- (1) 2-maliges Waschen mit 1 mL Waschpuffer von  $2 \times 10^6$  Jurkat Zellen nach dreiwöchiger CH50-Inkubation sowie Inkubation in Kontrollmedium.
- (2) Resuspension des Zellpellets in 20  $\mu$ L A. braun.

Die Messung des Zinkgehalts in den Zellen sowie im Jurkat Medium (Kontrollmedium sowie CH50) am AAS wurde von Dr. Weißels durchgeführt.

## **3.2.21 Transfektion von Zelllinien**

### Prinzip

Durch die Transfektion von Zellen mittels Lipofektamin oder Elektroporation ist es möglich, Fremdstoffe in diese einzubringen. Bei der Elektroporation werden die Zellen für wenige Sekunden einer Hochspannung ausgesetzt, wodurch das Membranpotential der Zelle zusammenbricht und sich Poren ausbilden. Durch diese Poren können dann geladene Moleküle, wie z.B. DNA oder *silencing* (si)RNA, aufgenommen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Jurkat Zellen mit siRNA transfiziert. Die aufgenommene siRNA kann nach erfolgreicher Transfektion innerhalb der Zelle an spezifische Zielstrukturen binden und die Translation von Ziel-RNAs inhibieren. Der Erfolg der Transfektion kann mithilfe der qRT-PCR überprüft werden.

### Reagenzien

- Cal (1 mM)
- Jurkat Medium supplementiert mit 20 % FCS ohne Pen/Strep
- Jurkat Medium, wie in Tab. 1 beschrieben
- MTF-1 siRNA (20  $\mu$ M)
- Negativ-Kontroll-siRNA (10  $\mu$ M)
- PHA (1 mg/mL)
- PMA (1  $\mu$ g/mL)

### Durchführung

- (1) Jurkat Zellen einen Tag vor der Elektroporation mit  $3 \times 10^5$  Zellen/mL in einer Zellkulturflasche ansetzen, um ein exponentielles Zellwachstum nach 24 h zu gewährleisten.
- (2) Nach 24 h  $1 \times 10^7$  Zellen/mL in Jurkat Medium mit 20 % FCS ohne Pen/Strep aufnehmen.
- (3)  $2,5 \times 10^6$  Zellen in eine Elektroporationsküvette überführen und in jeweils drei Küvetten 100 nM MTF-1 siRNA und in drei weiteren Küvetten 100 nM Negativ-Kontroll-siRNA pipettieren.
- (4) Küvetten sorgfältig schütteln und für 5 min auf Eis lagern.
- (5) Elektroporation am GenePulser II bei 250 V und 1.100  $\mu$ F für 8-10 sek.
- (6) Sorgfältiges Schütteln der Küvette und Inkubation auf Eis für 5 min.
- (7) Zellen einer Küvette in ein Endvolumen von 1 mL Jurkat Medium mit 20 % FCS ohne Pen/Strep aufnehmen und in ein Loch einer 6-Lochplatte pipettieren.
- (8) Nach 6-stündiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank 1 % Pen/Strep in die Ansätze pipettieren und für weitere 18 h im Brutschrank inkubieren.
- (9) Nach insgesamt 24-stündiger Inkubation im Brutschrank Zugabe von 1 mL Jurkat Medium mit 10 % FCS pro Loch.
- (10) Stimulation der Zellen entsprechend der Ansätze für weitere 24 h mit PMA/Cal (10 ng/mL und 0,1  $\mu$ M Cal), PHA (2,5 ng/mL) oder unstimuliert als Kontrolle inkubiert.
- (11) Nach 24 h Überstände für ELISA-Messung bei -20°C wegfrieren sowie Aufnahme des Zellpellets in RA1-Puffer +  $\beta$ -ME für RNA Isolierung und Lagerung bei -80°C.

### **3.2.22 Messung der Zinkpufferkapazität**

#### Prinzip

Mithilfe der Fluoreszenzsonde FluoZin-3 *Tetrapotassium Salt* kann die freie Zinkkonzentration in einem Reaktionspuffer nach Zinkzugabe bestimmt werden. Durch verschiedene Bestandteile in Puffern, wie z.B. BSA oder Dithiothreitol (DTT), kann eine erhebliche Menge des ursprünglich hinzugegebenen Zinks abgefangen werden. Aus diesem Grund ist die Konzentration an freiem Zink im Puffer, die bspw.

auf ein Enzym wirken kann, wesentlich geringer, als die Konzentration, die ursprünglich zum Puffer hinzugegeben wurde. Daher ist es wichtig, die Menge an freiem Zink innerhalb des Puffers zu bestimmen, sodass diese auf die ursprünglich zugegebene Zinkmenge normalisiert werden kann. Im Gegensatz zu FluoZin-3 AM kann FluoZin-3 *Tetrapotassium Salt* die Membran von Zellen nicht passieren, weshalb diese Sonde zur Bestimmung des Zinkgehalts in Pufferlösungen geeignet ist. Die Berechnung des Zinkgehalts erfolgt analog mit Formel 4, wie in Kap. 3.2.19 beschrieben.

### Reagenzien

- FluoZin-3 *Tetrapotassium Salt* (1 mM in DMSO)
- HDAC1-Puffer
- TPEN (2 mM)
- ZnSO<sub>4</sub> (2 μM, 20 μM, 40 μM, 60 μM, 80 μM, 100 μM, 200 μM, 400 μM, 1 mM und 2 mM)

### Durchführung

- (1) HDAC1-Puffer mit ZnSO<sub>4</sub> (0 μM, 0,1 μM, 1 μM, 2 μM, 3 μM, 4 μM, 5 μM, 10 μM, 20 μM und 50 μM) und 1 μM FluoZin-3 *Tetrapotassium Salt* versetzen und je 100 μL in Triplikaten in eine 96-Lochplatte pipettieren. Zur Bestimmung der Zinkpufferkapazität im Proteinphosphatase (PP)2A-Puffer wurden folgende ZnSO<sub>4</sub>-Konzentrationen eingesetzt: 0 μM, 0,1 μM, 1 μM und 2 μM.
- (2) Außerdem Zugabe von 50 μM TPEN sowie 100 μM ZnSO<sub>4</sub> zum HDAC1-Puffer bzw. 50 μM TPEN sowie 3 μM ZnSO<sub>4</sub> zum PP2A-Puffer in Triplikaten für F<sub>min</sub>- sowie F<sub>max</sub>-Bestimmung (Kap. 3.2.19)
- (3) Inkubation für 30 min bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank.
- (4) Messung am Fluoreszenzplattenleser bei optimaler Z-Position mit einer Anregungswellenlänge von  $\lambda = 485$  nm und einer Emissionswellenlänge von  $\lambda = 535$  nm.

### 3.2.23 HDAC1-Enzymaktivitätsmessung

#### Prinzip

Zur Bestimmung eines Zinkeinflusses auf die Aktivität der HDAC1 wurde das *Fluoregenic HDAC1 Assay Kit* (BPS Bioscience) verwendet. Der Test wird in zwei Schritten auf einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Das HDAC1-Substrat enthält eine acetylierte Lysin-Seitenkette und wird mit aufgereinigtem HDAC1-Enzym inkubiert. Die Stärke der Deacetylierung wird in Anwesenheit der zu untersuchenden Substanz, in diesem Falle Zink, gemessen. Anschließend folgt eine Inkubation mit einer Entwicklerlösung, wodurch ein Fluorophor nachgewiesen wird, was am Fluoreszenzplattenleser gemessen werden kann. Die Fluoreszenz nimmt mit steigender Aktivität der HDAC1 zu. Als Negativkontrolle wird der HDAC1-Inhibitor Trichostatin A (TSA) verwendet, während als Positivkontrolle der Puffer, in dem das  $\text{ZnSO}_4$  gelöst wurde, d.h.  $\text{H}_2\text{O}$ , eingesetzt wird.

#### Reagenzien

- Alle Kitbestandteile des *Fluoregenic HDAC1 Assay Kits*
- BSA (0,1 %)
- A. braun
- $\text{ZnSO}_4$  (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ )

#### Durchführung

Durchführung nach Angaben des Herstellers unter Verwendung folgender  $\text{ZnSO}_4$ -Konzentrationen: 0  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$ .

### 3.2.24 Bestimmung der Phosphataseaktivität

#### Prinzip

Phosphatasen sind Enzyme, die in der Lage sind, eine Phosphat-Gruppe von einem Substrat abzuspalten. Um die alkalische Phosphataseaktivität zu messen, wird standardmäßig der *p*-Nitrophenyl Phosphat (pNPP)-Test eingesetzt. Durch Zellyse kann die Phosphataseaktivität in den Zelllysaten mit dem Substrat pNPP mittels Absorption an einem Plattenleser bei  $\lambda = 405 \text{ nm}$  gemessen werden. Die Phosphatase PP2A gehört zu den Serin/Threonin-Phosphatasen. Da pNPP von der

Struktur her eher einem Tyrosin ähnelt, ist die Verwendung eines spezifischeren Substrats für die PP2A, wie z.B. RRApTVA, von Vorteil.

### 3.2.24.1 pNPP-Test

#### Reagenzien

- Hepes-Reaktionspuffer (20 mM Hepes; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7,5)
- pNPP-Substrat

#### Durchführung

- (1) Nach 3-wöchiger Kontroll- bzw. CH50-Inkubation 1x10<sup>7</sup> Jurkat Zellen/mL in Hepes-Reaktionspuffer resuspendieren.
- (2) Zell/Hepes-Reaktionspuffer-Gemisch für 20 sek auf Eis sonifizieren.
- (3) Proben für 3 min bei 16.000 g zentrifugieren.
- (4) Überstände 1:4 mit Hepes-Reaktionspuffer verdünnen und mit 100 µL/Loch auf eine 96-Lochplatte verteilen.
- (5) Anschließend 1 µL pNPP pro Loch pipettieren und für 1 h bei 37°C inkubieren.
- (6) Reaktion mit 100 µL NaOH stoppen.
- (7) Absorption am Plattenleser bei  $\lambda = 405$  nm und einer Referenzwellenlänge von  $\lambda = 492$  nm messen.

### 3.2.24.2 RRApTVA-Test

#### Reagenzien

- Hepes-Reaktionspuffer (20 mM Hepes; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7,5)
- Malachite Green Additive
- Malachite Green Solution A
- RRApTVA-Substrat

#### Durchführung

- (1) Nach 3-wöchiger Kontroll- bzw. CH50-Inkubation oder nach kurzzeitigem Zinkmangel 1x10<sup>7</sup> Jurkat Zellen/mL in Hepes-Reaktionspuffer resuspendieren.
- (2) Zell/Hepes-Reaktionspuffer-Gemisch für 20 sek auf Eis sonifizieren.
- (3) Proben für 3 min bei 16.000 g zentrifugieren.

- (4) Überstände 1:25 mit HEPES-Reaktionspuffer verdünnen und mit 17,5 µL/Loch als Triplikate auf eine 96-Lochplatte verteilen. Für die Blankwertmessung werden 17,5 µL HEPES-Reaktionspuffer pro Loch, ebenfalls als Triplikate, pipettiert.
- (5) Anschließend 300 µM RRApTVA-Substrat pro Loch pipettieren und für 30 min bei 30°C inkubieren. In der Zwischenzeit Malachite Green Solution A mit Malachite Green Additive (1:100) ansetzen und bei RmT stehen lassen.
- (6) Nach 30-minütiger Inkubation 100 µL pro Loch aus dem Malachite Green Solution A/Malachite Green Additive-Gemisch pipettieren.
- (7) Absorption am Plattenleser bei  $\lambda = 630$  nm messen.

### **3.2.25 Bestimmung von Oberflächenmolekülen am Durchflusszytometer**

#### Prinzip

Die Größe und Granularität von Zellen sowie die Expression spezifischer Oberflächenmoleküle können mithilfe der Durchflusszytometrie bestimmt werden. Die Zellen passieren in einem laminaren Probenstrom einen Laser, z.B. einen Argonlaser. Beim Durchtritt der Zellen durch den Lichtstrahl wird dieses Licht gestreut. Über das Beugungsmuster des Lichts kann die Zellgröße mit dem Vorwärtsstreulicht (FSC) und über das um 90° abgelenkte Licht kann die Granularität der Zelle mit dem Seitwärtsstreulicht (SSC) bestimmt werden. Unter Verwendung von spezifischen Fluoreszenz-markierten Antikörpern kann darüber hinaus die Expression von bestimmten Oberflächenmolekülen festgestellt werden. Neben der Messung des spezifischen Oberflächenmoleküls wird eine Isotypkontrolle mitgeführt, mit dessen Hilfe eine Aussage über die unspezifische Bindung des jeweiligen Antikörpers an die zu untersuchende Zelle getroffen werden kann. Die Isotypkontrolle ist also ein unspezifischer Antikörper vom gleichen Isotyp, der, wie der zu untersuchende spezifische Antikörper, mit der gleichen Fluoreszenz markiert ist. Im Gegensatz dazu besitzt der Isotyp keine spezifische Bindungseigenschaften gegenüber dem Antigen.

#### Reagenzien

- Anti-human-CD3-FITC konjugiert, Klon UCHT1
- Anti-human-CD69-APC konjugiert, Klon FN50

- Anti-human-HLA-ABC-PE konjugiert, Klon W6/32
- Isotypkontrolle IgG<sub>1</sub>, κ, APC konjugiert
- Isotypkontrolle IgG<sub>1</sub>, κ, FITC konjugiert
- Isotypkontrolle IgG<sub>2a</sub>, κ, PE konjugiert
- PBS + 1 % FCS

### Durchführung

- (1)  $1 \times 10^6$  Zellen/mL in 100  $\mu$ L PBS + 1 % FCS aufnehmen.
  - a. Röhren 1: Je nach Ansatz Zugabe von
    - i. 5  $\mu$ L CD3-FITC konjugiert sowie 10  $\mu$ L CD69-APC konjugiert oder
    - ii. 5  $\mu$ L HLA-ABC-PE konjugiert.
  - b. Röhren 2: Je nach Ansatz Zugabe von
    - i. 5  $\mu$ L Isotypkontrolle FITC konjugiert sowie 10  $\mu$ L Isotypkontrolle APC konjugiert oder
    - ii. 10  $\mu$ L Isotypkontrolle PE konjugiert.
- (2) Inkubation im Dunkeln für 20 min bei RmT.
- (3) Waschen mit 2 mL PBS + 1 % FCS. Zentrifugation bei 300 g für 5 min.
- (4) Zugabe von 300  $\mu$ L PBS + 1 % FCS.
- (5) Messen von 20.000 Zellen am Durchflusszytometer zur Analyse von CD3/CD69 und Messen von 10.000 Zellen zur Analyse von HLA-ABC.
- (6) Für die Auswertung wird der Anteil an CD3+ bzw. CD69+ Zellen verwendet. Für die Auswertung der HLA-ABC-Expression wurde die mittlere Fluoreszenz verwendet.

### **3.2.26 Toxizitätsmessung mit Propidiumiodid (PI)**

#### Prinzip

PI ist ein Farbstoff, der in die dsDNA von toten Zellen interkaliert. Die Plasmamembran von lebenden Zellen kann von PI nicht passiert werden. Die Fluoreszenz des PI-Farbstoffs kann am Durchflusszytometer gemessen werden und besitzt eine Anregungswellenlänge von  $\lambda = 488$  nm mit einem Emissionsmaximum bei  $\lambda = 635$  nm. Um den Einfluss eines Zinkmangels, induziert durch TPEN oder Chelex-behandeltem Medium, auf die verwendeten Zelllinien zu untersuchen, wurde dieser Test zur Analyse der Zellvitalität eingesetzt.

### Reagenzien

- PI (1 mg/mL)
- PBS + 1 % FCS

### Durchführung

- (1)  $1 \times 10^6$  Zellen nach dreitägiger Inkubation mit TPEN oder nach dreiwöchiger Inkubation mit Chelex-behandeltem Medium in 100  $\mu$ L PBS + 1 % FCS und 10  $\mu$ g/mL PI in einem FACS-Röhrchen aufnehmen und für 10 min bei RmT im Dunkeln inkubieren.
- (2) Waschen der Zellen mit 2 mL PBS + 1 % FCS bei 300 g für 5 min.
- (3) Aufnahme des Pellets in 300  $\mu$ L PBS + 1 % FCS.
- (4) Messen von 10.000 Zellen am Durchflusszytometer.
- (5) Alle Replikate, die mehr als 26 % tote Zellen aufwiesen, wurden für weitere Versuche ausgeschlossen.

## **3.2.27 Fluoreszenzmikroskopie**

### Prinzip

Mit dem Einsatz geeigneter Fluoreszenzsonden und mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops ist es möglich, Zink intrazellulär zu visualisieren und zu lokalisieren. Das Prinzip beruht auf der Emission eines Photons beim Übergang eines Elektrons von einem höheren in ein tieferes Energieniveau.

Kurzwelliges Licht wird absorbiert und Elektronen der fluoreszierenden Moleküle gelangen durch die Aufnahme von Photonen kurzzeitig auf ein höheres Energieniveau. Dieser Zustand kann jedoch nicht lange aufrecht erhalten werden und die Elektronen fallen dann auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück, wobei Energie in Form von Fluoreszenzlicht freigesetzt wird.

### **3.2.27.1 Färbung des CD3-Rezeptors und des intrazellulären Zinks**

#### Reagenzien

- Anti-human-CD3-PE konjugiert, Klon HIT3a
- Anti-human-CD3-PE konjugiert, Klon UCHT1
- FluoZin-3 AM (1 mM in DMSO)

- Messpuffer (MP, 5 mM Glucose; 1 mM 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; pH 7,35)
- Zinpyr-1 (5 mM in DMSO)

#### Durchführung

- (1) 1x10<sup>6</sup> Zellen in 200 µL MP mit 1 µM FluoZin-3 AM oder 10 µM Zinpyr-1 aufnehmen.
- (2) Inkubation bei 37°C schwenkend im Wasserbad für 20 min.
- (3) Zugabe von 2 µL CD3-PE konjugiert. Inkubation bei 37°C schwenkend im Wasserbad für weitere 10 min.
- (4) Waschen der Zellen mit 2 mL MP bei 300 g für 5 min.
- (5) Zellen in 1 mL MP aufnehmen. 200 µL der Zellsuspension mithilfe eines Cytospin-Aufsatzes mit 300 g für 5 min auf einen Objektträger zentrifugieren.
- (6) 20 µL MP auf die zentrifugierten Zellen geben und mit einem Deckglas abdecken.
- (7) Auswertung am Fluoreszenzmikroskop mithilfe des 63-fach Objektivs (in Öl).

#### **3.2.27.2 Färbung des Zellkerns und des intrazellulären Zinks**

##### Reagenzien

- Hoechst 33258 (18,7 mM)
- Messpuffer (MP, 5 mM Glucose; 1 mM 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; pH 7,35)
- Zinpyr-1 (5 mM in DMSO)

##### Durchführung

- (1) 1x10<sup>6</sup> Zellen in 1,5 mL MP mit 10 µM Zinpyr-1 aufnehmen und für 20 min bei 37°C im Wasserbad schwenkend inkubieren.
- (2) Zugabe von 15 µM Hoechst 33258 und Inkubation für weitere 10 min schwenkend im Wasserbad bei 37°C.
- (3) Nach Ablauf der 30-minütigen Inkubationszeit 2-maliges Waschen der Zellen mit 2 mL MP für 5 min bei 300 g.
- (4) 1x10<sup>5</sup> Zellen mithilfe eines Cytospin-Aufsatzes mit 300 g für 5 min auf einen Objektträger zentrifugieren.

- (5) 20  $\mu\text{L}$  MP auf die zentrifugierten Zellen geben und mit einem Deckglas abdecken.
- (6) Auswertung am Fluoreszenzmikroskop mithilfe des 63-fach Objektivs (in Öl).

### 3.2.27.3 Färbung von ER, Zellkern und CD3

#### Reagenzien

- Alle Kitbestandteile des ER-ID<sup>®</sup> Red Assay Kits
- Anti-human-CD3-FITC konjugiert, Klon UCHT1
- FluoZin-3 AM (1 mM in DMSO)
- Zinpyr-1 (5 mM in DMSO)

#### Durchführung

- (1) ER-ID<sup>®</sup> Red Dye sowie Hoechst 33342 1:10 in DMSO vorverdünnen.
- (2) Zugabe von jeweils 0,5  $\mu\text{L}$  ER-ID<sup>®</sup> Red Dye sowie Hoechst 33342 zu 500  $\mu\text{L}$  Assay Puffer (1x).
- (3)  $1 \times 10^5$  Zellen in einem Reaktionsgefäß in 100  $\mu\text{L}$  Assay Puffer + ER-ID<sup>®</sup> Red Dye + Hoechst 33342 (Schritt [1]) aufnehmen und für 20 min bei 37°C im Brutschrank inkubieren.
- (4) 1  $\mu\text{L}$  CD3-FITC konjugiert in das Reaktionsgefäß pipettieren und für weitere 10 min bei 37°C im Brutschrank inkubieren.
- (5) Zentrifugation für 5 min bei 300 g.
- (6) 100  $\mu\text{L}$  Assay Puffer zugeben und erneut für 5 min bei 300 g zentrifugieren.
- (7) Zellen in 50 – 100  $\mu\text{L}$  Assay Puffer aufnehmen und auf einen Objektträger pipettieren. Vorsichtig mit einem Deckglas abdecken.
- (8) Auswertung am Fluoreszenzmikroskop mithilfe des 63-fach Objektivs (in Öl).

### 3.2.28 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

#### Prinzip

Mithilfe eines ELISA-Tests können Antigene in einer Probe nachgewiesen werden. Der in dieser Arbeit verwendete ELISA-Typ ist ein Sandwich-ELISA, bei dem die zu messende Probe zwischen zwei Antikörper gebunden wird.

Der erste Antikörper (*capture antibody*) wird an eine feste Phase gekoppelt, welche meistens die Oberfläche einer 96-Lochplatte darstellt. Die Zugabe der Probe führt zu

einer Bindung durch den immobilisierten Antikörper, der ein bestimmtes Epitop der Probe erkennt. Überschüssige, nicht gebundene Probe wird abgewaschen und anschließend wird ein zweiter Antikörper, der *detection antibody*, hinzugegeben, der ein anderes Epitop als der *capture antibody* erkennt.

Der *detection antibody* ist häufig ein biotinylierter Antikörper. Durch die Zugabe von Streptavidin-HRP werden die Biotinmoleküle, die an den *detection antibody* gekoppelt sind, durch das Enzym erkannt und gebunden. Streptavidin besitzt mehrere Biotinbindestellen und kann nach Zugabe bis zu vier Biotinmoleküle binden. Die Zugabe einer geeigneten Substratlösung, wie z.B. Tetramethylbenzidin (TMB), führt bei einer erfolgreichen Antikörper-Antigen-Antikörper-Enzym-Bindung zur Umsetzung des Substrats durch die Peroxidase und resultiert in einem Farbumschlag von farblos zu blau. Die Reaktion wird mit einer sauren Stopplösung beendet, was zu einem Farbumschlag von blau zu gelb führt. Die Absorption wird bei  $\lambda = 450 \text{ nm}$  an einem Plattenleser gemessen.

### 3.2.28.1 Humaner und muriner IL-2-ELISA

#### Reagenzien

- Assay Diluent (PBS mit 10 % FCS; pH 7,0)
- BD OptEIA™ Set, human IL-2
- BD OptEIA™ Set, murin IL-2
- Coating Puffer (0,1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 8,4 g  $\text{NaHCO}_3$ ; 3,56 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 L auffüllen; pH 9,5)
- PBS
- Stopplösung (2 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
- Substratlösung ( $\text{H}_2\text{O}_2$  und TMB)
- Tween-20
- Waschpuffer (0,05 % Tween-20 in PBS)

#### Durchführung

- (1)  $1 \times 10^6$  Zellen in eine 24-Lochplatte aussäen und für 24 h je nach Versuch mit 10 ng/mL und 0,1  $\mu\text{M}$  PMA/Cal sowie 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PHA stimulieren bzw. Zellen als Kontrolle unstimuliert inkubieren (Kap. 3.2.2-3.2.4).

- (2) Durchführung des murinen IL-2-ELISA nach Angaben des Herstellers. Durchführung des humanen IL-2-ELISA erfolgt nach Angaben des Herstellers, bis auf die Anpassung der nachfolgend beschriebenen Inkubationszeiträume. Alle Ansätze werden in Duplikaten durchgeführt.
- (3) Nach Proben-/Standardinkubation folgt 3-maliges Waschen mit Waschpuffer.
- (4) Inkubation für 2 h mit 100 µL *detection antibody* (anti-IL-2).
- (5) 5-maliges Waschen mit Waschpuffer.
- (6) Inkubation im Dunkeln für 20-30 min mit 100 µL Streptavidin-HRP.
- (7) 7-maliges Waschen mit Waschpuffer.
- (8) Inkubation mit 100 µL Substratlösung für etwa 15 min.
- (9) Zugabe von 50 µL Stopplösung pro Loch.
- (10) Messung der Absorption am Plattenleser laut Angaben des Herstellers.

### 3.2.28.2 Schweine-IL-2-ELISA

#### Reagenzien

- Swine IL-2 CytoSet ELISA
- Puffer Set für Swine IL-2 CytoSet ELISA

#### Durchführung

- (1)  $1 \times 10^6$  PBMC/mL in eine 24-Lochplatte aussäen und mit 10 ng/mL sowie 0,1 µM PMA/Cal für 24 h stimulieren und parallel PBMC als Kontrolle unstimuliert inkubieren (Kap. 3.2.5).
- (2) Die Durchführung des Schweine-IL-2 CytoSet ELISA erfolgt nach Angaben des Herstellers. Alle Ansätze werden in Duplikaten durchgeführt. Lediglich die Inkubationszeiträume wurden wie zur Durchführung des humanen IL-2-ELISA angepasst (Kap. 3.2.28.1 Schritte 3 – 10).

### 3.2.29 Statistische Methoden

Die dargestellten Ergebnisse beruhen auf mindestens drei unabhängigen Experimenten pro Methode. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte (aus der Anzahl der Einzelversuche mit  $n = x$ ) und dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben.

Die Auswertung erfolgte mit dem Student's t-Test (zweiseitig, gepaart sowie ungepaart zur Analyse der Ergebnisse aus der Schweinestudie) in GraphPad Prism bzw. Excel, und statistische Signifikanzen wurden wie folgt dargestellt:

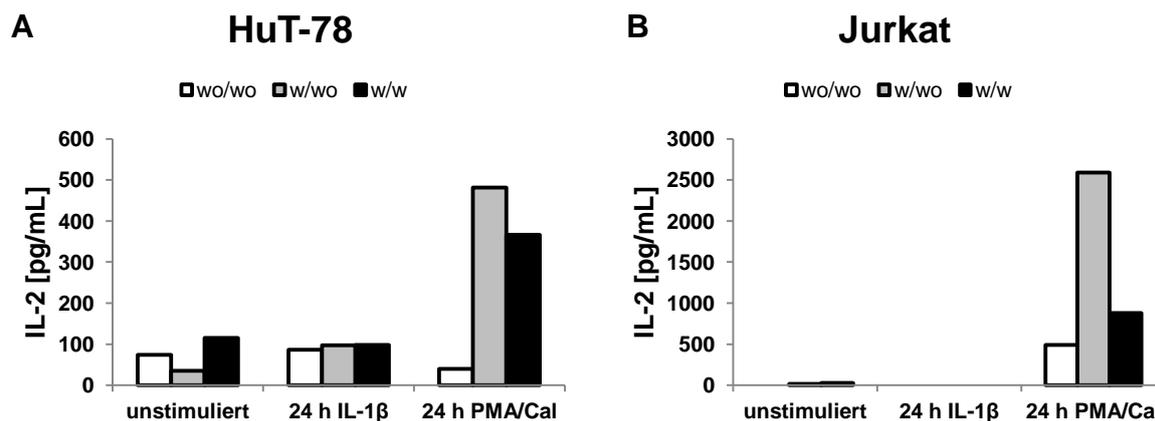
\*:  $p < 0,05$ ; \*\* bzw. #:  $p < 0,01$ ; \*\*\* bzw. §:  $p < 0,001$

Die statistische Auswertung der Ergebnisse, die mithilfe der Schweine erhalten wurden, erfolgte mittels ungepaartem t-Test (zweiseitig). Die Ergebnisse, die mittels EPIC Methylscreen Array erhalten wurden, wurden mithilfe des Limma t-Tests berechnet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Identifikation geeigneter IL-2-produzierender T-Zelllinien

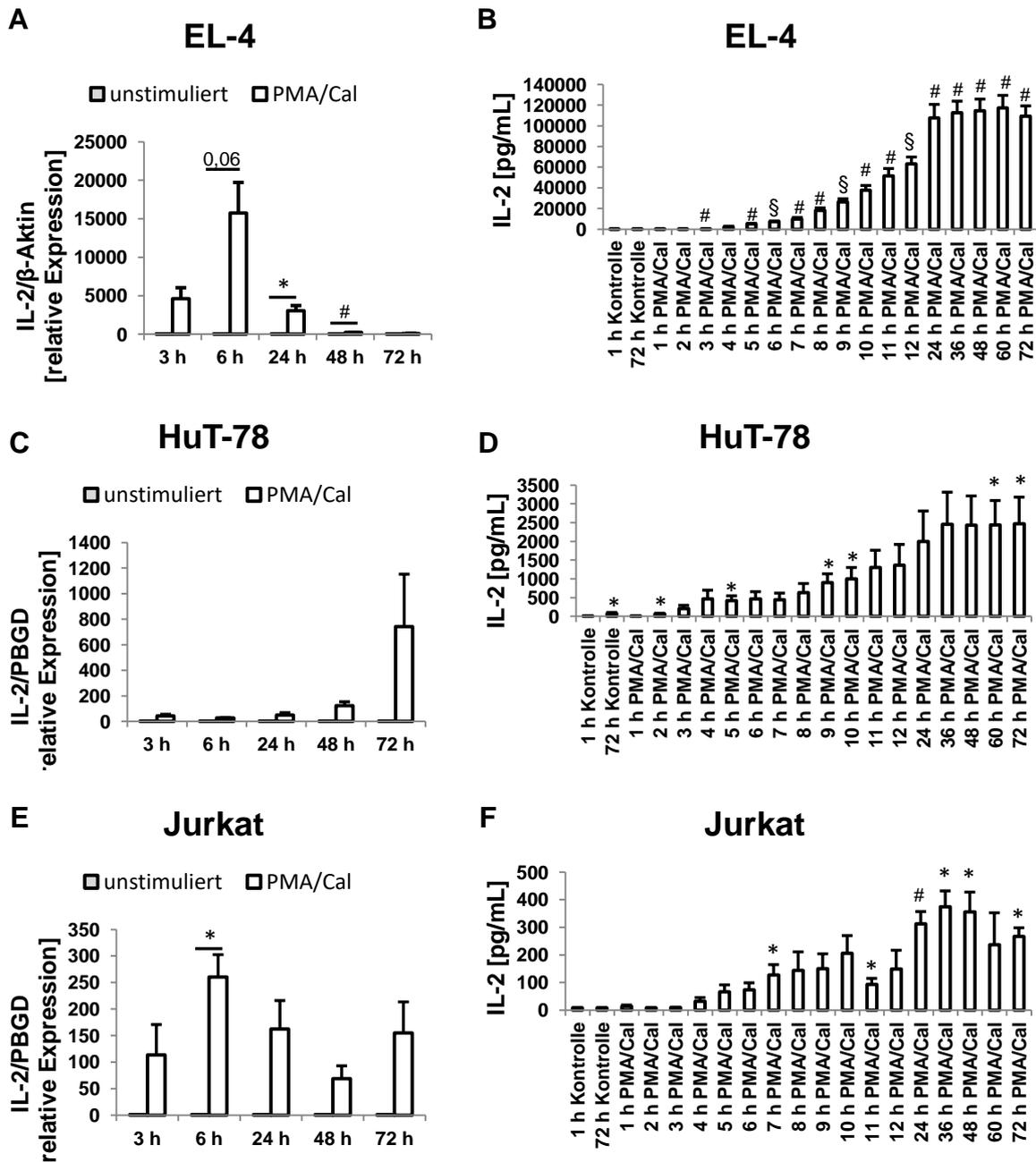
Da im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von Zink auf die IL-2-Produktion in T-Zellen analysiert werden sollte, mussten zunächst geeignete T-Zelllinien sowie Stimulanzen identifiziert werden, die in der Lage sind, die IL-2-Expression in den verwendeten T-Zellen zu induzieren. In früheren Arbeiten, die in dieser Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, verwendeten Daaboul *et al.* das Zytokin IL-1 $\beta$ , um die IL-2-Expression in der murinen T-Zelllinie EL-4 zu untersuchen (37). Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls u.a. IL-1 $\beta$  verwendet, um die IL-2-Produktion in den beiden humanen T-Zelllinien HuT-78 (Abb. 5 A) und Jurkat (Abb. 5 B) zu induzieren. Der Vorteil einer IL-1 $\beta$ -Stimulation besteht darin, dass die Komponenten des aktivierten Signalwegs bekannt sind. Außerdem wurden die Zellen mit einer Kombination aus PMA und Cal stimuliert, die häufig für eine T-Zell-Aktivierung eingesetzt wird (62-64). Neben den verschiedenen Stimulanzen wurden die T-Zellen in Medien mit unterschiedlichen Zinkmengen inkubiert (Abb. 5). Diese Zinkinkubationen basierten ebenfalls auf den Versuchen von Daaboul *et al.* (37) und erlaubten eine Aussage über eine differenzielle IL-2-Expression aufgrund des verfügbaren Zinks. Die Zellen wurden hierzu, wie in Kap. 3.2.3 beschrieben, inkubiert. Die beste IL-2-Induktion war nach PMA/Cal-Stimulation in den beiden humanen T-Zelllinien zu sehen. HuT-78 Zellen waren zwar in der Lage, nach einer IL-1 $\beta$ -Stimulation IL-2 zu produzieren, hierbei gab es allerdings keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Vorinkubationen mit Zink (Abb. 5 A). In den Jurkat Zellen war eine Induktion der IL-2-Produktion durch IL-1 $\beta$  nicht möglich (Abb. 5 B). Da nach PMA/Cal-Stimulation die IL-2-Produktion durch unterschiedliche Zinkverfügbarkeiten beeinflusst wurde, wurden die weiteren Versuche mit PMA/Cal durchgeführt.



**Abbildung 5: Induktion der IL-2-Produktion in T-Zellen.**

Nachdem HuT-78 (A) und Jurkat Zellen (B) für drei Tage in Kontrollmedium (wo) oder in TPEN-behandeltem Medium (w) inkubiert wurden, wurden die Zellen für eine Stunde in frisches Kontrollmedium (wo/wo und w/wo) bzw. TPEN-behandeltes Medium (w/w) überführt. Darauf folgte entweder eine 24-stündige Stimulation mit IL-1 $\beta$  oder PMA/Cal. Jeweils ein weiterer Ansatz wurde als Kontrolle unstimuliert inkubiert. Der IL-2-Gehalt wurde mittels ELISA in den Überständen gemessen. Der Versuch wurde als exemplarischer Vorversuch mit n = 1 durchgeführt.

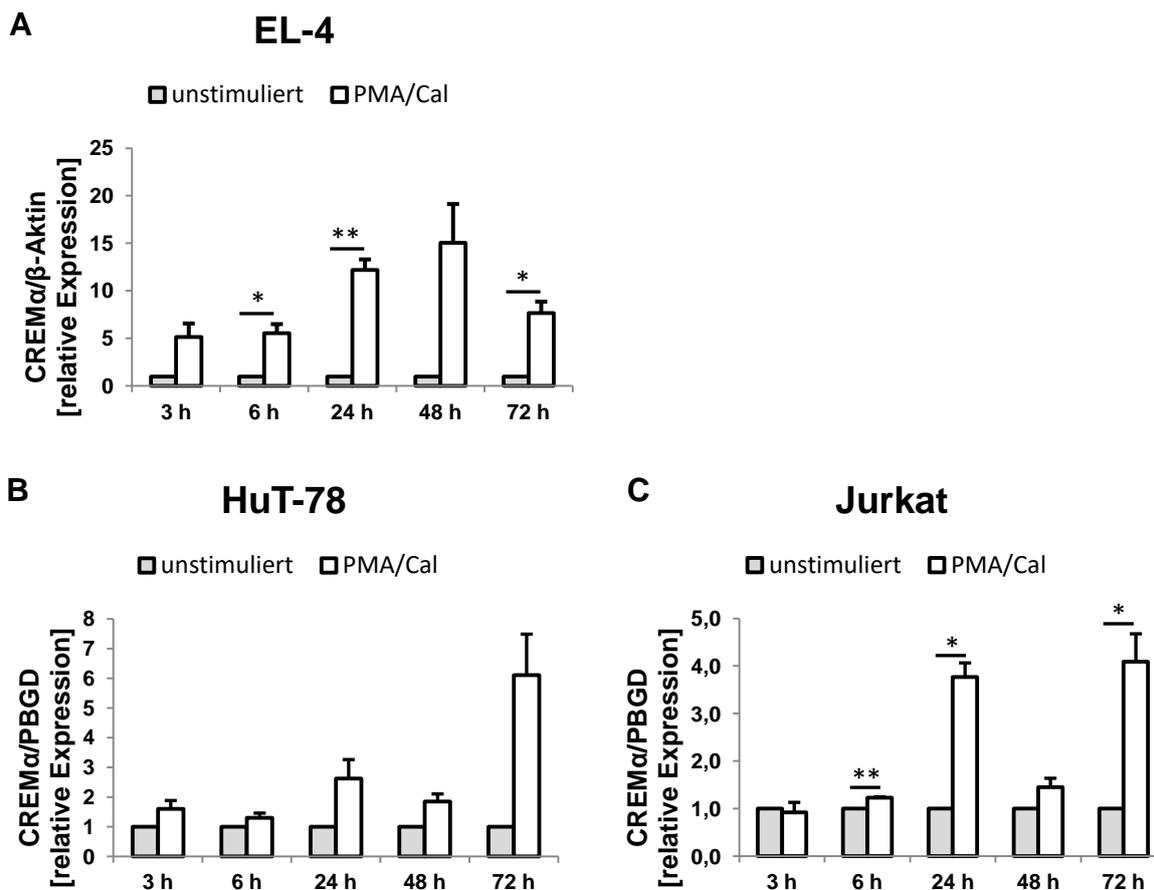
Im Weiteren wurde eine IL-2-Zeitkinetik in den humanen HuT-78 und Jurkat sowie der murinen EL-4 Zelllinien über drei Tage durchgeführt, um die produzierte Menge an IL-2 ohne Zinkeinfluss auf RNA- (Abb. 6 A, C und E) und Proteinebene (Abb. 6 B, D und F) zu untersuchen. Mithilfe dieser Zeitkinetik sollte ein optimaler Zeitpunkt zur Analyse eines Zinkeffektes auf die IL-2-Produktion gefunden werden. In EL-4 und Jurkat Zellen war ein ähnlicher Verlauf der IL-2-Expression mit einer maximalen Expression nach 6-stündiger PMA/Cal-Stimulation auf RNA-Ebene zu beobachten, während in HuT-78 Zellen ein Maximalwert erst nach 72-stündiger Stimulation erreicht wurde. Auf Proteinebene wurde in allen untersuchten Zelllinien nach etwa 24 h ein Plateau in der IL-2-Produktion erreicht. Die Jurkat Zellen zeigten einen interessanten „wellenförmigen“ Verlauf in der IL-2-Zeitkinetik (Abb. 6 E, F). Nach 9-stündiger Stimulation wurde ein erstes Maximum in der IL-2-Produktion auf Proteinebene erreicht, woraufhin die Menge an IL-2 zunächst wieder abnahm und anschließend nach 24-36 h eine maximale IL-2-Menge erreichte.



**Abbildung 6: Zeitkinetik der IL-2-Expression auf RNA- und Proteinebene in T-Zellen.**

Die verschiedenen Zelllinien EL-4 (A, B), HuT-78 (C, D) und Jurkat (E, F) wurden mit PMA/Cal über verschiedene Zeiträume stimuliert bzw. als Kontrolle unstimuliert inkubiert. Die Proben wurden auf RNA- (A, C, E) und Proteinebene (B, D, F) hinsichtlich der IL-2-Produktion analysiert. Auf RNA-Ebene wurde die IL-2-Expression nach 3 h, 6 h, 24 h, 48 h und 72 h überprüft, während auf Proteinebene die IL-2-Produktion in den ersten zwölf Stunden stündlich und anschließend alle 12 h bis zur Erreichung einer Gesamtstimulationszeit von 72 h untersucht wurde. Die IL-2-Expression auf RNA-Ebene wurde mittels qRT-PCR mit PBGD (human) bzw. β-Aktin (murin) als Referenzgene bestimmt. Die Expressionsstärke wurde auf unstimulierte Kontrollzellen normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von n = 3-5 unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test bestimmt und auf RNA-Ebene auf die jeweils unstimulierte Kontrolle bzw. auf Proteinebene jeweils auf die 1 h Kontrolle bezogen (\* p < 0,05; # p < 0,01; § p < 0,001).

Neben einer IL-2-Zeitkinetik wurde eine CREM $\alpha$ -Zeitkinetik durchgeführt, um auch für diesen Transkriptionsfaktor eine Übersicht über den Verlauf der Expression zu erhalten (Abb. 7). Die drei verschiedenen T-Zelllinien EL-4, HuT-78 sowie Jurkat wurden dazu für 3 h, 6 h, 24 h, 48 h und 72 h stimuliert. In HuT-78 Zellen war erst nach 72-stündiger Stimulation ein starker Anstieg in der CREM $\alpha$ -Expression zu sehen, während in EL-4 und Jurkat Zellen bereits nach 24-stündiger Stimulation die CREM $\alpha$ -Expression im Vergleich zu einer 3- und 6-stündigen Stimulation zunahm.

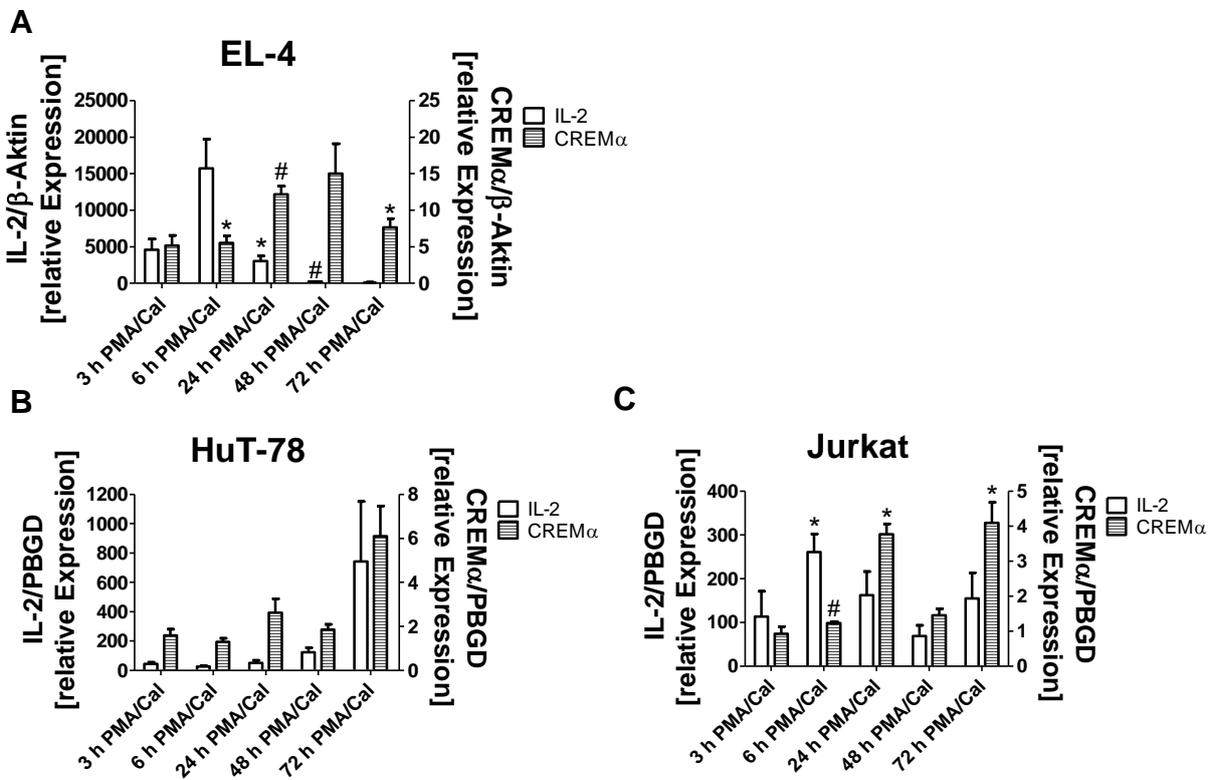


**Abbildung 7: CREM $\alpha$ -Zeitkinetik auf RNA-Ebene in T-Zellen.**

Zur Analyse der CREM $\alpha$ -Expression wurden EL-4 (A), HuT-78 (B) und Jurkat (C) Zellen für 3 h, 6 h, 24 h, 48 h und 72 h mit PMA/Cal stimuliert. Die CREM $\alpha$ -Expression wurde mittels qRT-PCR mit PBGD (human) bzw.  $\beta$ -Aktin (murin) als Referenzgene bestimmt. Die Expressionsstärke wurde auf unstimulierte Kontrollzellen normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von  $n = 3$  unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test bestimmt (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

In Abb. 8 sind die in Abb. 6 und 7 beschriebenen RNA-Expressionen von IL-2 (linke y-Achse) sowie CREM $\alpha$  (rechte y-Achse) zusammengefasst dargestellt, um die wechselseitige Regulation zu verdeutlichen. Besonders gut ist die gegenseitige

Regulation in EL-4 (Abb. 8 A) und Jurkat Zellen (Abb. 8 C) zu sehen. Die Expressionshöhen der Gene sind nicht direkt miteinander vergleichbar, da die Expression von IL-2 insgesamt sehr viel höher ist als die Expression von CREM $\alpha$ .



**Abbildung 8: Zeitkinetik der IL-2- und CREM $\alpha$ -Expressionen in T-Zellen.**

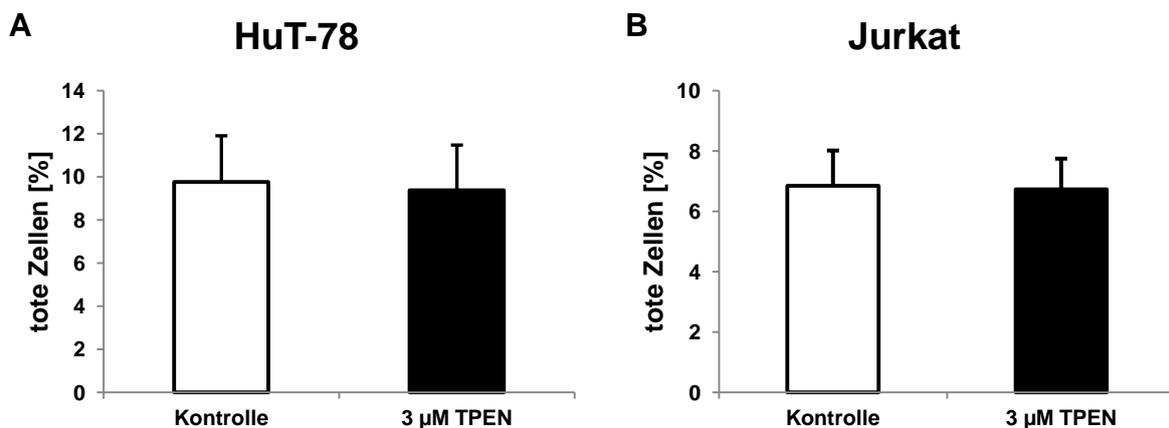
Zur besseren Veranschaulichung der wechselseitigen Regulation von IL-2 und CREM $\alpha$  wurden die Expressionsstärken auf RNA-Ebene nach 3 h, 6 h, 24 h, 48 h und 72 h in EL-4 (A), HuT-78 (B) und Jurkat Zellen (C) aus Abb. 6 und Abb. 7 zusammengefasst dargestellt. Auf der linken y-Achse ist die Expression von IL-2 aufgetragen, während auf der rechten y-Achse die Expression von CREM $\alpha$  zu sehen ist. Die Expressionshöhen sind nicht direkt miteinander vergleichbar, da die CREM $\alpha$ -Expression insgesamt sehr viel niedriger ist als die IL-2-Expression. Die Expressionen wurden mittels qRT-PCR mit PBGD (human) bzw.  $\beta$ -Aktin (murin) als Referenzgene bestimmt. Die Expressionsstärke wurde auf unstimulierte Kontrollzellen normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von n = 3-5 unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test bestimmt und wurden auf die jeweils unstimulierte Kontrolle bezogen (\* p < 0,05; # p < 0,01).

Die weitere Untersuchung eines Zinkeinflusses auf die IL-2-Produktion erschien aufgrund der bislang erhaltenen Ergebnisse im humanen Zellsystem geeignet. Die weiteren Versuche zur Analyse eines Einflusses von Zink auf die IL-2-Expression wurden mit den HuT-78 sowie Jurkat Zelllinien durchgeführt.

## 4.2 Kurzzeitmodell

### 4.2.1 PI- und Zinkmessung

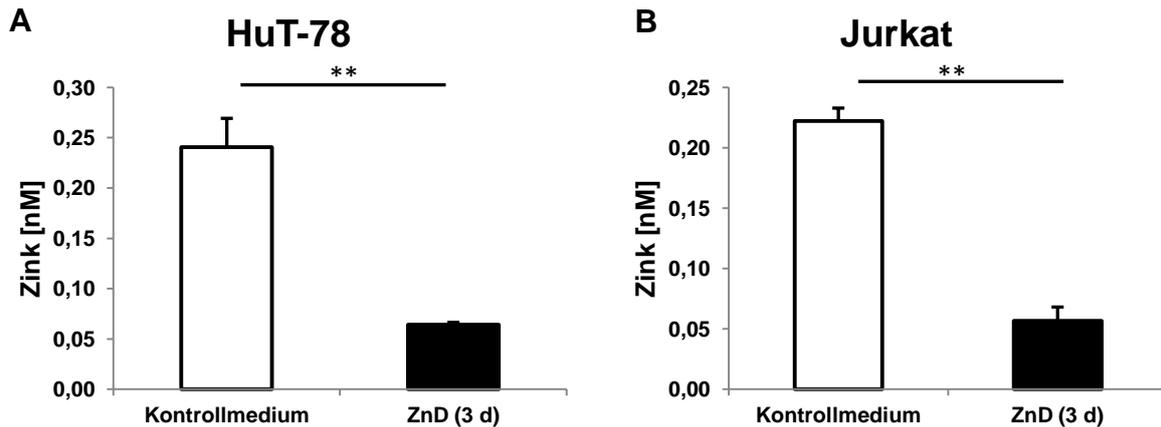
HuT-78 und Jurkat T-Zellen wurden, wie in Kap. 3.2.2 beschrieben, für drei Tage mit TPEN inkubiert. Um den Anteil toter Zellen zu bestimmen, wurde eine Zytotoxizitätsmessung mittels PI durchgeführt (Abb. 9). Die Inkubation mit TPEN hatte keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen, sodass diese Methode für weitere Analysen verwendet werden konnte.



**Abbildung 9: Toxizitätsmessung nach dreitägigem Zinkmangel (ZnD [3d]).**

Nachdem HuT-78 (A) sowie Jurkat Zellen (B) für drei Tage in TPEN-haltigem Medium (3 µM) kultiviert wurden, wurde die Vitalität der Zellen mittels PI-Färbung am Durchflusszytometer überprüft. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von n = 4 unabhängigen Experimenten. Es konnten keine signifikanten Unterschiede mittels Student's t-Test bestimmt werden.

Außerdem wurde das intrazelluläre Zink nach dreitägiger TPEN-Inkubation mithilfe der Fluoreszenzsonde FluoZin-3 AM am Durchflusszytometer gemessen (Abb. 10). Zellen, die in TPEN-behandeltem Medium inkubiert wurden, zeigten eine signifikant verringerte intrazelluläre Zinkmenge im Vergleich zu Zellen, die in normalem Medium kultiviert wurden.

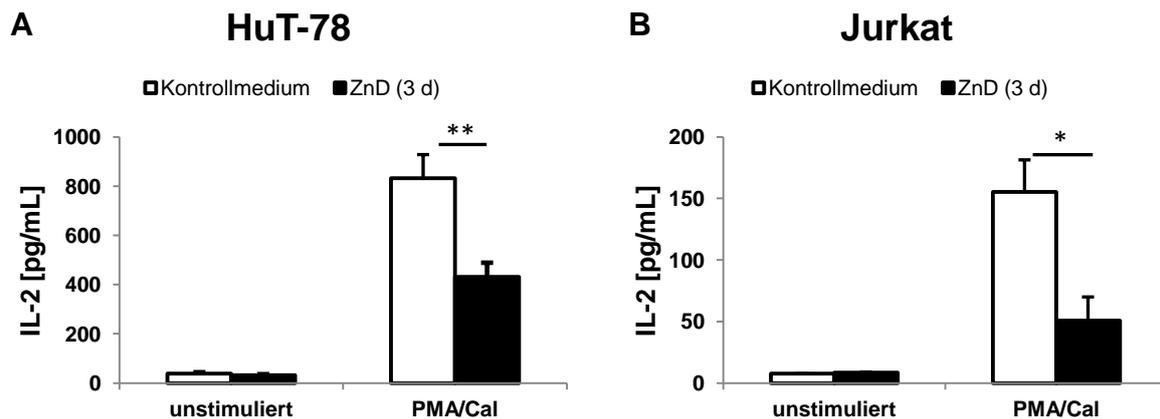


**Abbildung 10: Verringerte intrazelluläre Zinkkonzentration nach dreitägigem Zinkmangel.**

Nach dreitägigem Zinkmangel, der durch die Zugabe von TPEN in das entsprechende Medium induziert wurde, wurde der intrazelluläre Zinkgehalt in HuT-78 (A) und Jurkat Zellen (B) mittels FluoZin-3 AM am Durchflusszytometer bestimmt. Parallel wurde der Zinkgehalt in Zellen gemessen, die in unbehandeltem Medium inkubiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von  $n = 4$  unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test bestimmt (\*\*  $p < 0,01$ ).

#### 4.2.2 IL-2-Produktion

Nachdem eine verringerte Zinkmenge in den T-Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 10), wurde die IL-2-Menge mittels ELISA in den Überständen der HuT-78 (Abb. 11 A) sowie Jurkat Zellen (Abb. 11 B) bestimmt. Nach dreitägigem Zinkmangel war die IL-2-Menge in PMA/Cal-stimulierten HuT-78 sowie Jurkat Zellen signifikant verringert im Vergleich zu stimulierten Zellen, die in zinkadäquatem Medium kultiviert wurden.

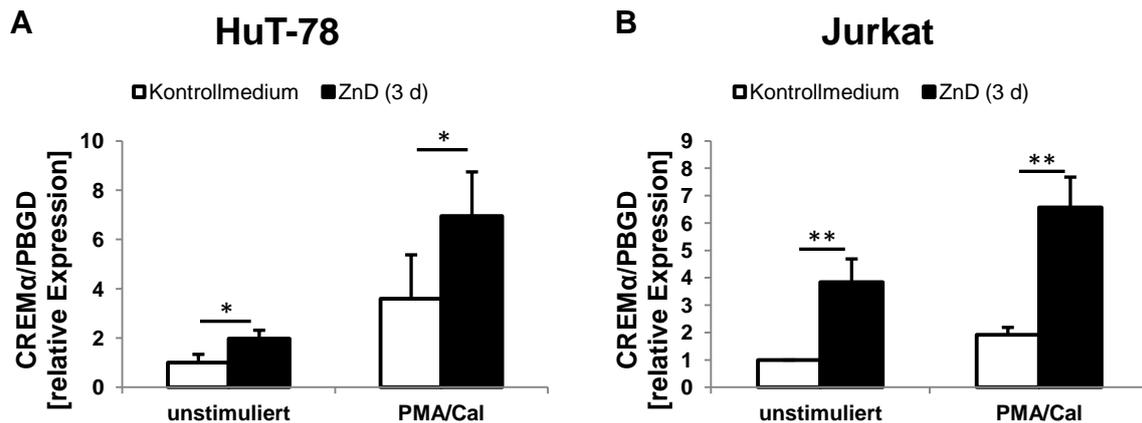


**Abbildung 11: Verringerte IL-2-Produktion in T-Zellen nach dreitägigem Zinkmangel.**

HuT-78 (A,  $n = 3$ ) und Jurkat Zellen (B,  $n = 6$ ) wurden für drei Tage mittels TPEN in einen Zinkmangel versetzt und im Anschluss für 24 h mit PMA/Cal stimuliert, um die IL-2-Produktion in den Überständen mittels ELISA bestimmen zu können. Parallel wurde die IL-2-Produktion von T-Zellen, die sich in Kontrollmedium befanden, bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von  $n = 3$  bzw.  $n = 6$  unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test bestimmt (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

### 4.2.3 CREM $\alpha$ -Expression

Nachdem unter kurzzeitigem Zinkmangel eine verringerte IL-2-Produktion nachgewiesen werden konnte, wurde mit der Analyse eines möglichen Zinkeinflusses auf den Transkriptionsfaktor CREM $\alpha$  begonnen. Aufgrund der beobachteten gegenseitigen Regulation von IL-2 und CREM $\alpha$  auf RNA-Ebene (Abb. 8) wurde die CREM $\alpha$ -Expression im Kurzzeitmodell nach 6-stündiger Stimulation untersucht (Abb. 12). Sowohl in HuT-78 (Abb. 12 A) als auch in Jurkat Zellen (Abb. 12 B) war eine erhöhte CREM $\alpha$ -Expression nach Zinkmangel im Vergleich zu Kontrollzellen zu beobachten. Die erhöhte Expression unter Zinkmangel war sowohl in unstimulierten als auch in stimulierten Zellen signifikant.



**Abbildung 12: Erhöhte CREM $\alpha$ -Expression in T-Zellen nach dreitägigem Zinkmangel.**

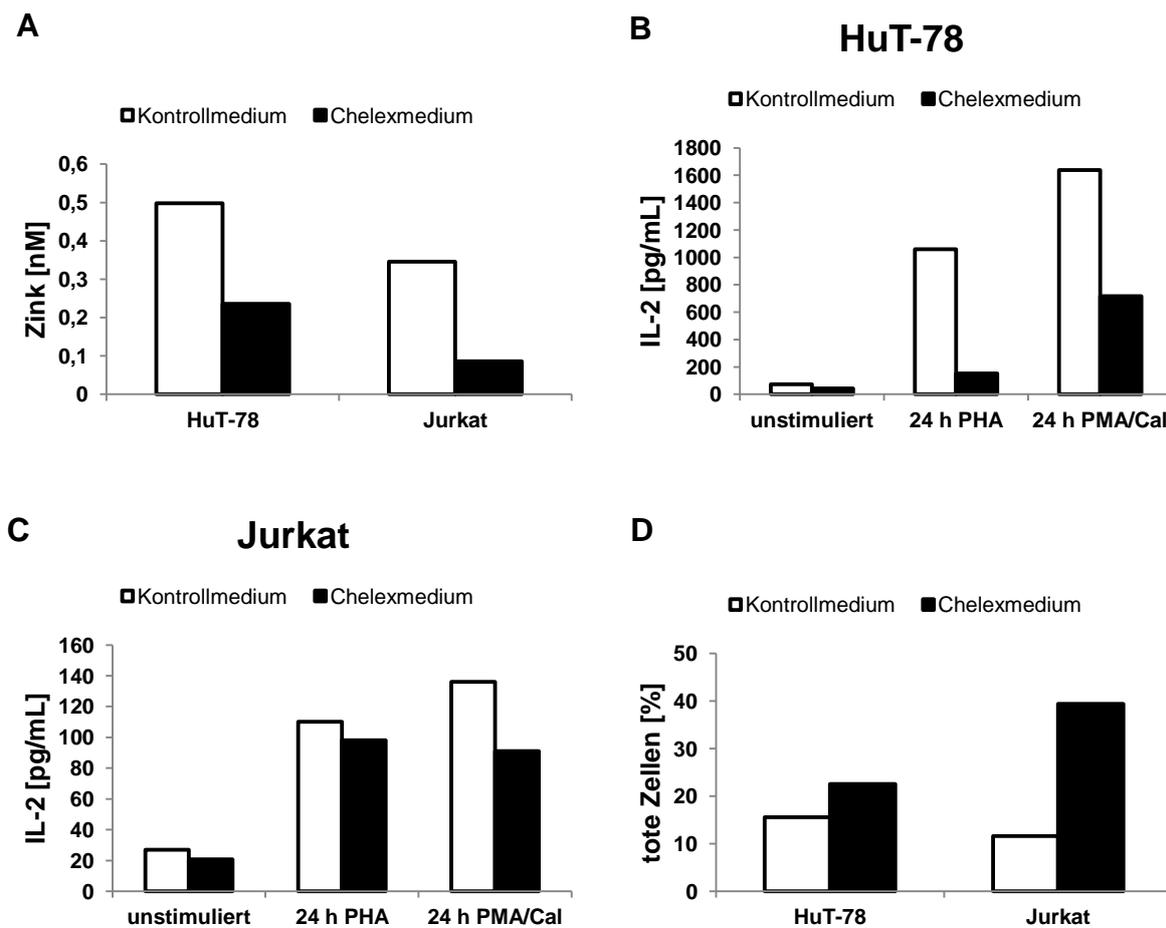
Nachdem HuT-78 (A) sowie Jurkat Zellen (B) für drei Tage mit TPEN in einen Zinkmangel versetzt wurden, wurden die Zellen für 6 h mit PMA/Cal stimuliert oder als Kontrolle unstimuliert inkubiert, um die CREM $\alpha$ -Expression auf RNA-Ebene zu analysieren. Die CREM $\alpha$ -Expression wurde mittels qRT-PCR mit PBGD als Referenzgen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von  $n = 11$  unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test bestimmt (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

## 4.3 Langzeitmodell

### 4.3.1 Vorversuche

Neben dem in Kap. 4.2 beschriebenem Kurzzeitmodell [ZnD (3 d)] wurde ein weiteres Modell etabliert, um die Effekte eines langzeitigen Zinkmangels nach drei Wochen zu analysieren. Für die Etablierung des Modells wurden erneut die humanen HuT-78 und Jurkat Zellen verwendet. Da TPEN für eine Kultivierung der Zellen über einen längeren Zeitraum zu instabil ist, sollte ein Zinkmangel durch die Behandlung des Zellkulturmediums mit Chelex 100 induziert werden.

Der Zinkgehalt wurde nach dreiwöchiger Kultivierung im Chelexmedium mit FluoZin-3 AM am Durchflusszytometer bestimmt und war in einem ersten Einmalversuch in beiden Zelllinien im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollansätzen verringert (Abb. 13 A). Außerdem verringerte der Zinkmangel die IL-2-Produktion auf Proteinebene, nachdem HuT-78 (Abb. 13 B) und Jurkat Zellen (Abb. 13 C) mit PHA oder PMA/Cal stimuliert wurden. PHA führt zu einer Gesamtaktivierung der Zellen und wurde als weiteres Stimulanz in diesem Modell eingesetzt. Eine Zytotoxizitätsmessung mit PI ergab allerdings einen hohen Anteil an toten Zellen in den Zinkmangelansätzen (Abb. 13 D). Insbesondere der Anteil toter Zellen innerhalb der Jurkat Zellpopulation war mit fast 40 % sehr hoch.

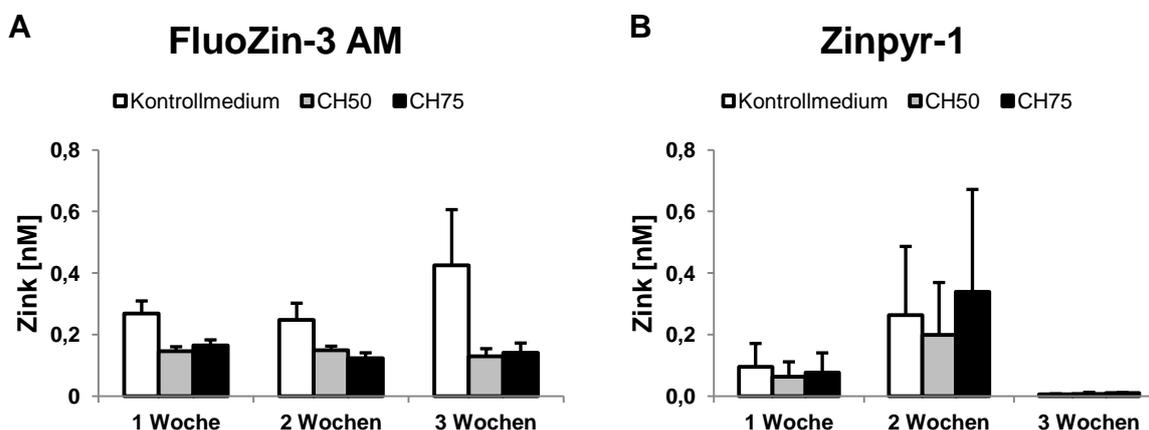


**Abbildung 13: Analyse des intrazellulären Zinkgehalts, der IL-2-Produktion sowie der Zellviabilität nach T-Zell-Inkubation in Chelexmedium.**

(A) HuT-78 und Jurkat Zellen wurden für drei Wochen in Kontrollmedium sowie Chelexmedium inkubiert. Die Detektion des intrazellulären Zinks erfolgte mittels FluoZin-3 AM am Durchflusszytometer. (B, C) Nach dreiwöchigem Zinkmangel folgte eine 24-stündige Stimulation von HuT-78 (B) sowie Jurkat Zellen (C) mit PHA oder PMA/Cal, um die Menge an IL-2 in den Überständen mittels ELISA zu bestimmen. (D) Der Anteil toter Zellen wurde mittels PI am Durchflusszytometer bestimmt. Die Versuche wurden als exemplarische Vorversuche mit jeweils  $n = 1$  durchgeführt.

Da es durch die Behandlung des Mediums mit Chelex zu einer Erhöhung des pH-Werts kam, wurde der pH-Wert für einen nächsten Langzeitversuch auf 7,4 eingestellt, um die Zellviabilität zu erhöhen. Dieser Wert entspricht dem pH-Wert des unbehandelten Kulturmediums. Außerdem wurden minimale Zinkmengen zum Chelex-behandelten Medium hinzugegeben. Zwei verschiedene Zinkkonzentrationen wurden getestet,  $50 \mu\text{g/L ZnSO}_4$  (CH50) und  $75 \mu\text{g/L ZnSO}_4$  (CH75). In weiteren Versuchen wurde außerdem überprüft, ob es bereits zu einem früheren Zeitpunkt zu einer verringerten intrazellulären Zinkmenge in den Jurkat Zellen kam. Der Zinkgehalt wurde daher wöchentlich über einen Zeitraum von drei Wochen, also nach einer

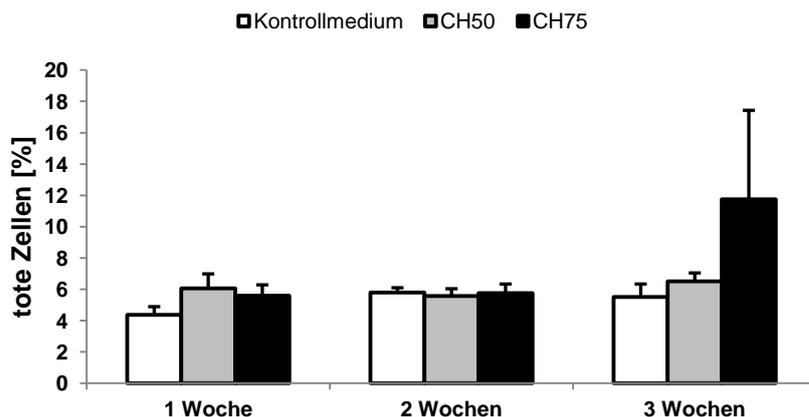
Woche, zwei Wochen sowie drei Wochen, mithilfe von FluoZin-3 AM (Abb. 14 A) sowie Zinpyr-1 (Abb. 14 B), gemessen. Der größte Unterschied im Zinkgehalt war nach dreiwöchigem Zinkmangel zu sehen. Es machte keinen Unterschied, ob 50 µg/L oder 75 µg/L ZnSO<sub>4</sub> zum Chelexmedium hinzugegeben wurden, weshalb 50 µg/L ZnSO<sub>4</sub> als adäquate Supplementation bestimmt wurden.



**Abbildung 14: Wöchentliche Messung des intrazellulären Zinkgehalts nach Kultivierung in Kontrollmedium, CH50 oder CH75.**

Über einen Zeitraum von drei Wochen wurde wöchentlich (nach 1, 2 und 3 Wochen) eine intrazelluläre Zinkmessung in Jurkat Zellen mittels FluoZin-3 AM (A) und Zinpyr-1 (B) am Durchflusszytometer durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von n = 2-5 unabhängigen Experimenten. Es konnten keine signifikanten Unterschiede mittels Student's t-Test bei der Analyse der intrazellulären Zinkmenge unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu CH50 bzw. CH75 innerhalb eines Zeitraums, d.h. nach einer Woche, zwei Wochen oder drei Wochen, bestimmt werden.

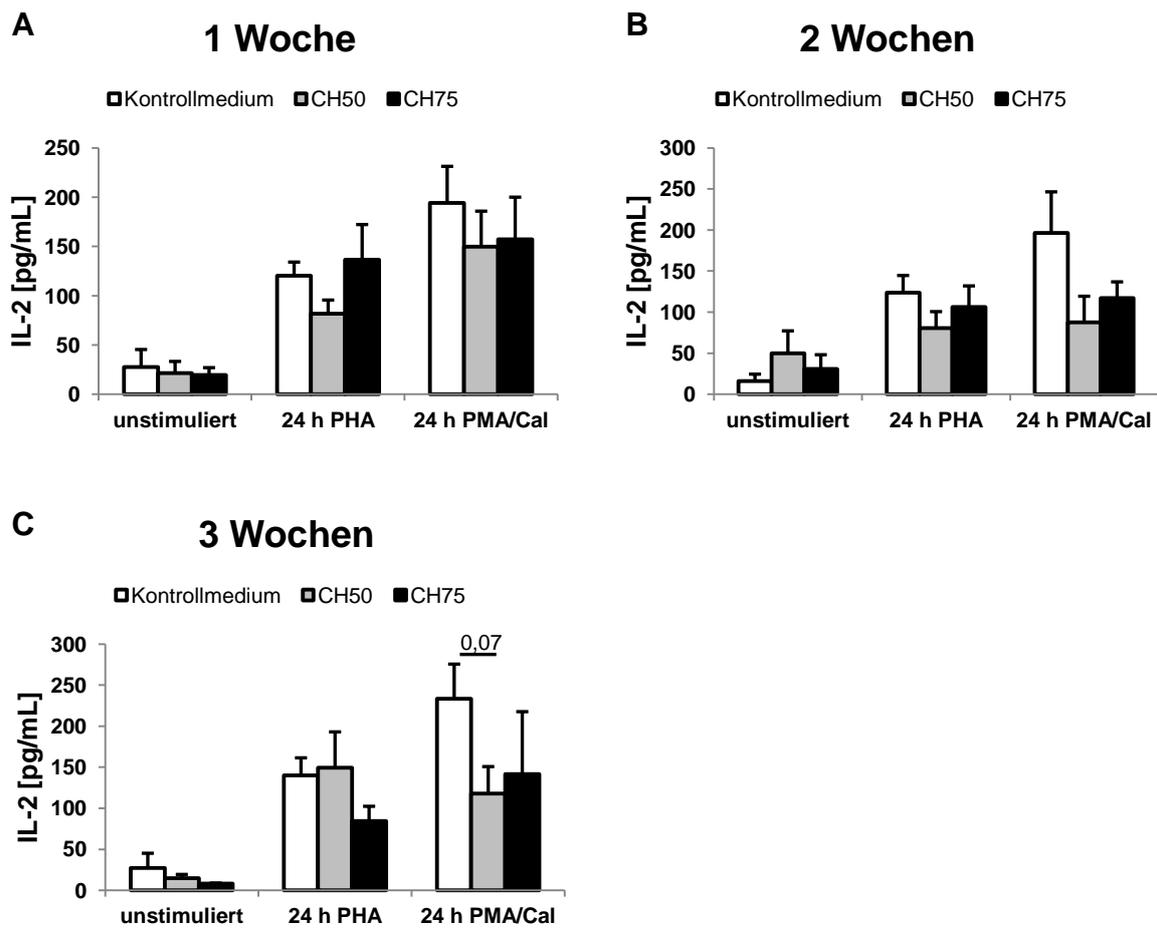
Die Zellviabilität wurde erneut mittels PI überprüft und ergab, dass der Anteil toter Zellen im Kontrollmedium und CH50 ähnlich war (Abb. 15). Für die Analysen der Ergebnisse, die mittels Durchflusszytometrie erhalten wurden, wurde die Population an andeutig toten Zellen ausgeschlossen. Außerdem blieb der Anteil toter Zellen nach ein, zwei und drei Wochen konstant. Lediglich nach dreiwöchiger Inkubation in CH75 waren mehr tote Zellen vorhanden im Vergleich zu den anderen Ansätzen.



**Abbildung 15: Anteil toter Zellen nach dreiwöchiger Kultivierung in Chelexmedium.**

Jurkat Zellen wurden nach ein, zwei und drei Wochen Kultivierung in Kontrollmedium, CH50 oder CH75 mit PI angefärbt und am Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von  $n = 4-5$  unabhängigen Experimenten. Es konnten keine signifikanten Unterschiede mittels Student's t-Test bei der Analyse der Anzahl an toten Zellen unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu CH50 bzw. CH75 innerhalb eines Zeitraums, d.h. nach einer Woche, zwei Wochen oder drei Wochen, bestimmt werden.

Um zu überprüfen, ob es nach den verschiedenen Zeiträumen Unterschiede in der IL-2-Expression gab, wurde nach jeweils 1, 2 und 3 Wochen der IL-2-Gehalt in den Überständen der Jurkat Zellen gemessen (Abb. 16). Der größte Unterschied in der IL-2-Produktion, induziert durch PMA/Cal, war nach dreiwöchigem Zinkmangel (CH50) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu beobachten (Abb. 16 C). Der PMA/Cal-stimulierte CH75-Ansatz wies kaum Unterschiede in der IL-2-Produktion im Vergleich zum CH50-Ansatz auf.



**Abbildung 16: Verringerte IL-2-Produktion nach dreiwöchigem Zinkmangel.**

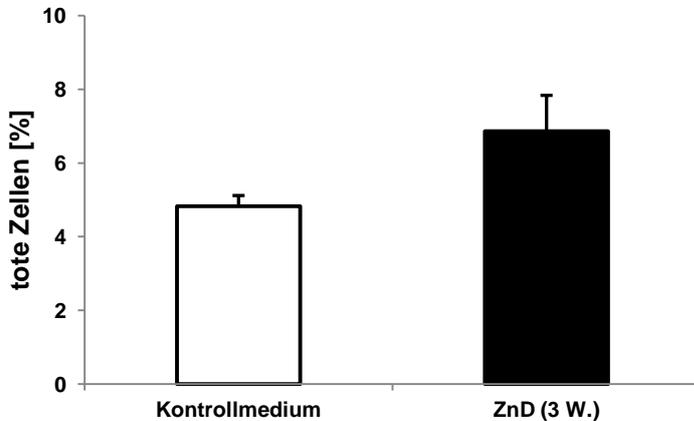
Jurkat Zellen wurden für einen Gesamtzeitraum von 3 Wochen entweder in Kontrollmedium oder in Zinkmangelmedium (CH50 oder CH75) kultiviert. Die IL-2-Produktion wurde nach 24-stündiger PHA- sowie PMA/Cal-Stimulation bestimmt, während weitere Zellen als Kontrolle unstimuliert blieben. Die IL-2-Mengen wurden nach 1 Woche (A), 2 Wochen (B) und 3 Wochen (C) in den Überständen mithilfe eines ELISA-Tests bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von n = 4-5 unabhängigen Experimenten. Unterschiede wurden mittels Student's t-Test bestimmt.

Unter Berücksichtigung der erhaltenen Ergebnisse hinsichtlich der IL-2-Produktion, PI- sowie Zinkmessungen, erschien ein dreiwöchiger Zinkmangel mittels CH50 und eingestelltem pH-Wert (7,4) sinnvoll, um den Einfluss eines Zinkmangels auf die IL-2-Expression zu untersuchen. Dieser Ansatz wird im Weiteren als „ZnD (3 W.)“ dargestellt.

#### 4.3.2 PI- und Zinkmessung

Für jedes Replikat, welches zur Analyse von Langzeiteffekten eines Zinkmangels untersucht wurde, wurde eine PI-Messung durchgeführt. Der Mittelwert aller Replikate ist in Abb. 17 dargestellt. Alle Ansätze, die bei Betrachtung aller Zellen

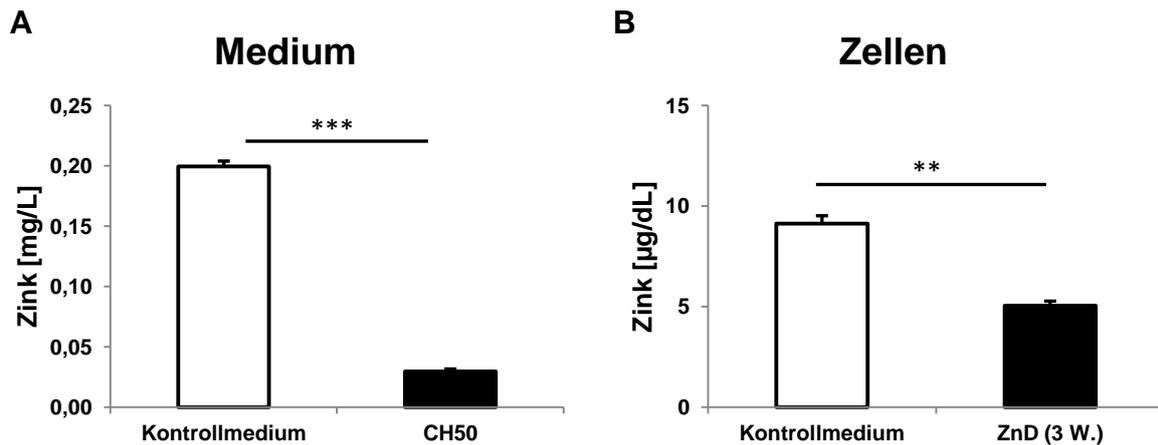
mehr als 26 % tote Zellen aufwiesen, wurden aus den Versuchen ausgeschlossen. Für die Analyse der Ergebnisse wurden die als eindeutig tot bestimmten Zellen, wie in Kap. 4.3.1 beschrieben, ausgeschlossen.



**Abbildung 17: Anteil toter Zellen nach langzeitigem Zinkmangel (ZnD [3 W.]).**

Nachdem Jurkat Zellen drei Wochen in Kontrollmedium oder ZnD-Medium kultiviert wurden, wurde eine PI-Messung am Durchflusszytometer durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von  $n = 19$  unabhängigen Experimenten. Es konnten keine signifikanten Unterschiede mittels Student's t-Test bestimmt werden.

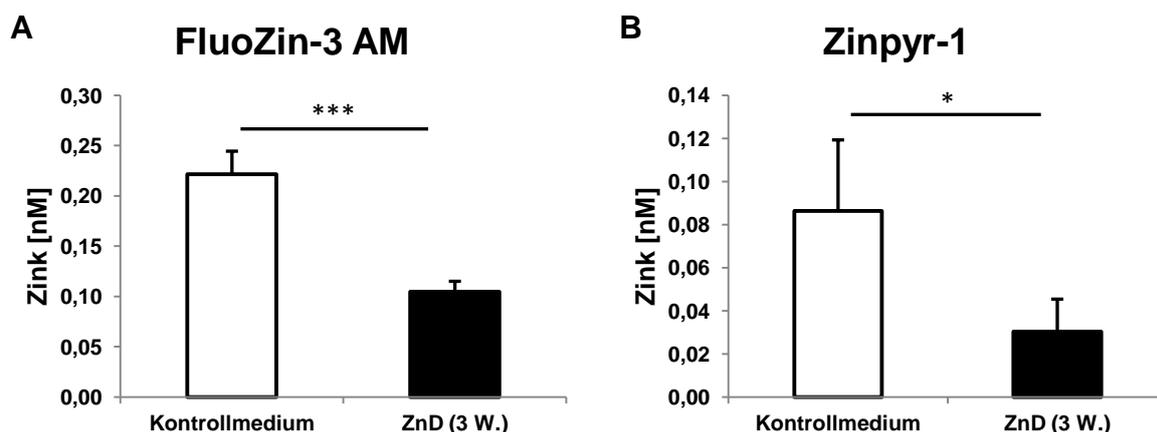
Mithilfe des AAS wurde der Zinkgehalt im Jurkat Kontrollmedium sowie im CH50-Medium von Frau Dr. Inga Weißels bestimmt. Ein signifikant verringerter Zinkgehalt konnte im CH50-Medium bestätigt werden (Abb. 18 A). Neben dem Zinkgehalt im Medium wurde der Gesamtzinkgehalt in Jurkat Zellen von Frau Dr. Inga Weißels mittels AAS gemessen, was ebenfalls geringere Zinkkonzentrationen unter ZnD zeigte (Abb. 18 B).



**Abbildung 18: Verringerter Zinkgehalt im Medium und in Jurkat Zellen nach Chelex-Behandlung.**

(A) Der Zinkgehalt wurde im Kontroll- und CH50-Medium mithilfe des AAS bestimmt ( $n = 14$ ). (B) Der Gesamtgehalt an Zink wurde ebenfalls mittels AAS in Jurkat Zellen bestimmt, die für drei Wochen in Kontrollmedium oder CH50-Medium inkubiert wurden ( $n = 4$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test bestimmt (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Neben den AAS-Messungen wurden intrazelluläre Messungen des Zinkgehalts mithilfe der Fluoreszenzsonden FluoZin-3 AM und Zinpyr-1 am Durchflusszytometer durchgeführt. Mit beiden Sonden konnte eine signifikant verringerte Zinkmenge unter Zinkmangel nachgewiesen werden (Abb. 19).

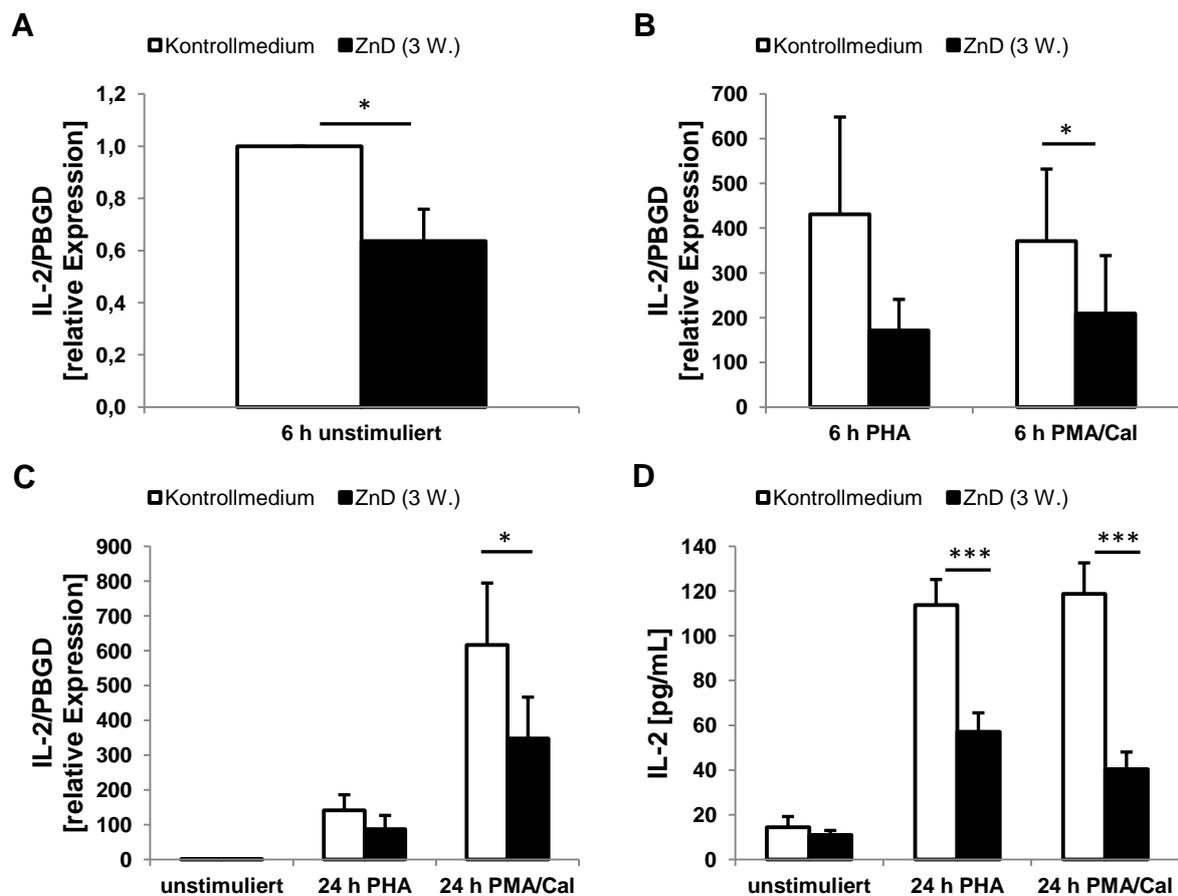


**Abbildung 19: Verringerter intrazellulärer Zinkgehalt nach dreiwöchigem Zinkmangel.**

Nachdem Jurkat Zellen für drei Wochen in Kontrollmedium oder CH50-Medium kultiviert wurden, wurde der intrazelluläre Zinkgehalt mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von FluoZin-3 AM (A,  $n = 18$ ) und Zinpyr-1 (B,  $n = 17$ ) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test bestimmt (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 4.3.3 IL-2-Produktion

Die IL-2-Expression war im Langzeitmodell wie auch im Kurzzeitmodell (Kap. 4.2.2) in stimulierten Zellen auf RNA- sowie auf Proteinebene signifikant verringert (Abb. 20). Wie in Abb. 20 A zu sehen ist, war die IL-2-Expression auf RNA-Ebene bereits in unstimulierten Ansätzen erniedrigt. Zur besseren graphischen Darstellung wurden die gewonnenen RNA-Ergebnisse in zwei separaten Abbildungen (Abb. 20 A und B) dargestellt.

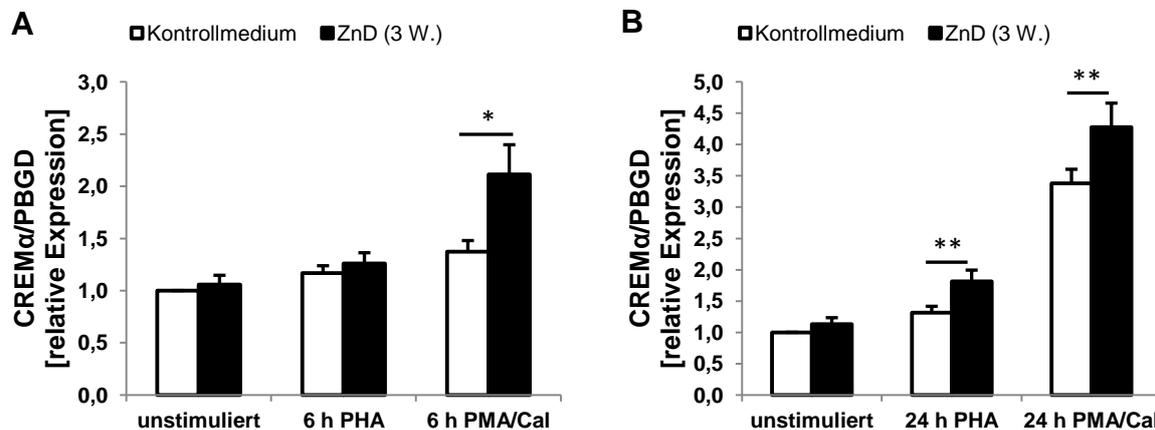


**Abbildung 20: Reduzierte IL-2-Expression nach dreiwöchigem Zinkmangel.**

Nachdem Jurkat Zellen für drei Wochen im Kontroll- oder Zinkmangelmedium kultiviert wurden, wurde die IL-2-Expression nach 6-stündiger (A, B, n = 12) und 24-stündiger (C, n = 12) PHA- oder PMA/Cal-Stimulation auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR untersucht. PBGD wurde als Referenzgen verwendet und die Expressionsstärke wurde auf unbehandelte (zinkadäquate) Jurkat Kontrollzellen normalisiert. Die Menge an IL-2 auf Proteinebene wurde in den Überständen mittels ELISA bestimmt (D, n = 19). Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test bestimmt (\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001).

### 4.3.4 CREM $\alpha$ -Expression

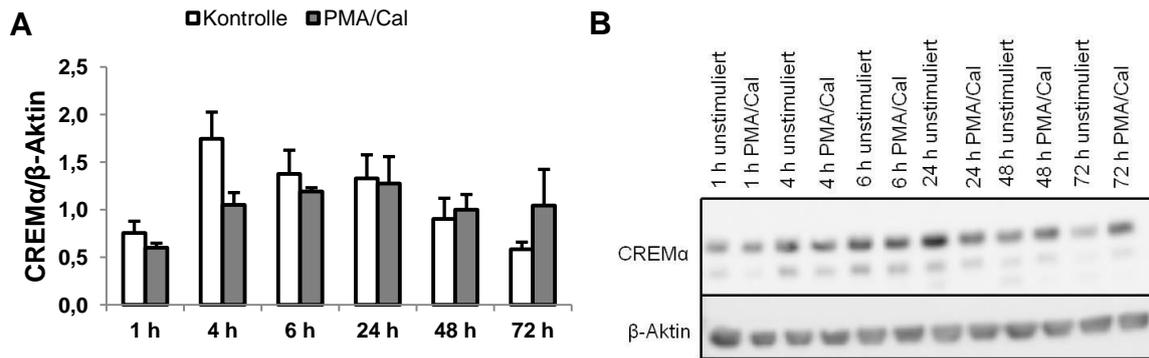
Im Langzeitmodell war ein Anstieg in der CREM $\alpha$ -Expression unter Zinkmangel, analog zum Kurzzeitmodell (Kap. 4.2.3), nach 6-stündiger (Abb. 21 A) sowie 24-stündiger (Abb. 21 B) Stimulation in Jurkat Zellen zu beobachten.



**Abbildung 21: Erhöhte CREM $\alpha$ -Expression auf RNA-Ebene nach dreiwöchigem Zinkmangel.**

Nachdem Jurkat Zellen für drei Wochen in Kontroll- oder Zinkmangelmedium kultiviert wurden, wurde die CREM $\alpha$ -Expression mittels qRT-PCR nach 6-stündiger (A) und 24-stündiger (B) PHA- sowie PMA/Cal-Stimulation mittels qRT-PCR untersucht. PBGD wurde als Referenzgen verwendet und die Expressionsstärke wurde auf unbehandelte (zinkadäquate) Jurkat Kontrollzellen normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von  $n = 12$  unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test bestimmt (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

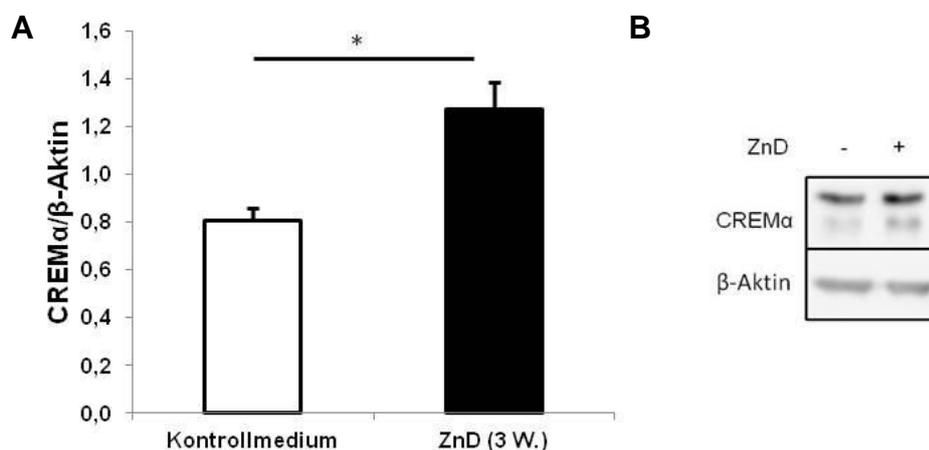
Um die auf RNA-Ebene gewonnenen Ergebnisse auch auf Proteinebene zu validieren, wurde ein adäquater Antikörper gesucht. Das CREM-Gen kodiert für verschiedene Isoformen. Aus diesem Grund war die Etablierung eines CREM $\alpha$ -Antikörpers schwierig, da es keinen kommerziell erhältlichen Antikörper gab. Zunächst wurde ein polyklonaler CREM-Antikörper zum Proteinnachweis in cytosolischen Extrakten sowie Zellkernextrakten ausgetestet, bei dem es zum Nachweis einer Vielzahl von Banden kam (Daten nicht gezeigt). Da mit diesem Antikörper ein eindeutiger CREM $\alpha$ -Nachweis nicht möglich war, wurde ein anderer monoklonaler Antikörper (C-2) getestet. Mit diesem Antikörper war es möglich, spezifische Banden nachzuweisen (Abb. 22). Um eine Übersicht über die CREM $\alpha$ -Produktion auf Proteinebene zu erhalten, wurde zunächst eine Zeitkinetik durchgeführt (Abb. 22).



**Abbildung 22: CREMα-Zeitkinetik auf Proteinebene.**

In Jurkat Zellen wurde nach PMA/Cal-Stimulation über Zeiträume von 1 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h und 72 h die Produktion von CREMα mittels Western Blot analysiert. Parallel wurden unstimulierte Kontrollproben zu den jeweiligen Zeitpunkten untersucht. Als Referenzgen wurde β-Aktin verwendet. (A) Densitometrische Quantifizierung von n = 3 unabhängigen Experimenten sind als Mittelwert + SEM dargestellt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede mittels Student's t-Test bestimmt werden. (B) Immunodetektion eines repräsentativen Western Blots.

Nachdem mit dem monoklonalen C-2-Antikörper ein geeigneter Antikörper zum Nachweis von CREMα gefunden wurde, konnte der Einfluss eines dreiwöchigen Zinkmangels auf CREMα auf Proteinebene untersucht werden. Die Ergebnisse, die zuvor auf RNA-Ebene gewonnen wurden, konnten dabei auf Proteinebene bestätigt werden und zeigten eine verstärkte CREMα-Produktion unter Zinkmangel (Abb. 23).

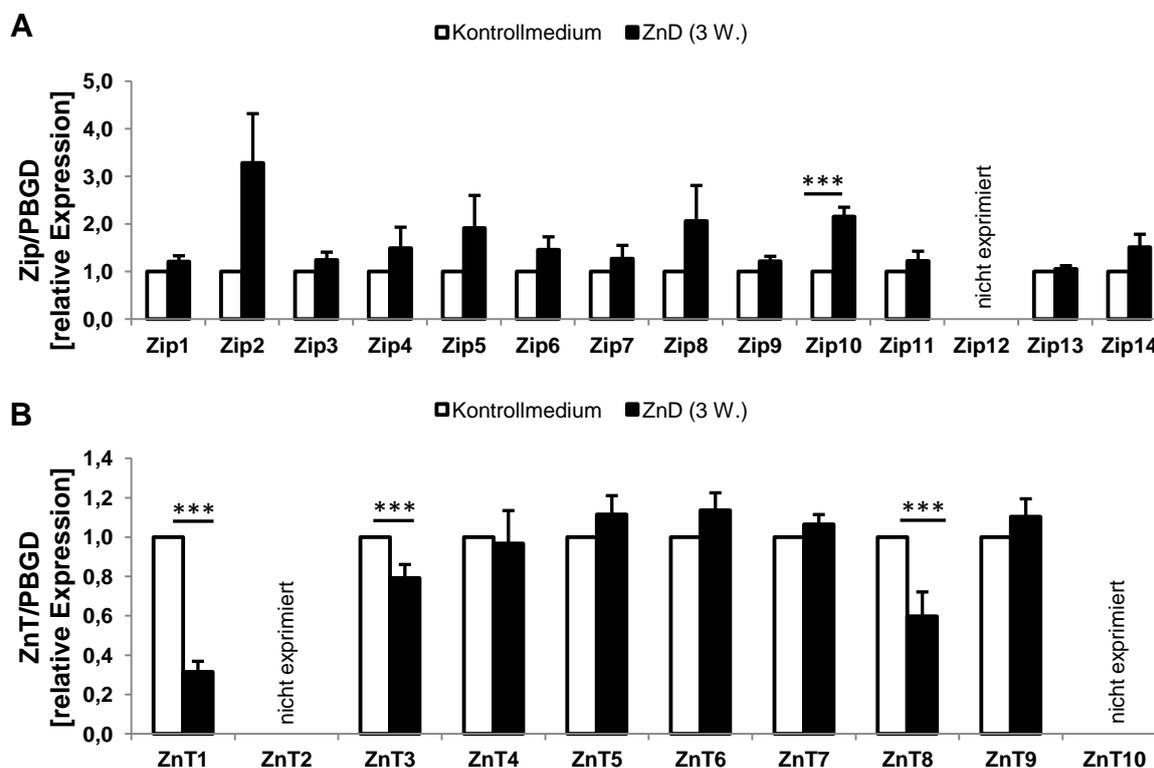


**Abbildung 23: Erhöhte CREMα-Expression auf Proteinebene nach dreiwöchigem Zinkmangel.**

Jurkat Zellen wurden für drei Wochen unter Zinkmangel sowie Kontrollbedingungen kultiviert. Daraufhin folgte ein CREMα-Nachweis im Zelllysat auf Proteinebene mittels Western Blot. β-Aktin wurde als Referenzgen verwendet. (A) Densitometrische Quantifizierung von n = 5 unabhängigen Experimenten sind als Mittelwert + SEM dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test bestimmt (\* p < 0,05). (B) Immunodetektion eines repräsentativen Western Blots.

### 4.3.5 Zinktransporter-Expression

Aufgrund des reduzierten intrazellulären Zinkgehalts in Jurkat Zellen nach dreiwöchigem Zinkmangel wurde die Expression der Zinktransporter auf RNA-Ebene untersucht (Abb. 24). Es wurde sowohl die Expression der Zip-Importer (Abb. 24 A) als auch die Expression der ZnT-Exporter (Abb. 24 B) nach langzeitigem Zinkmangel untersucht, verglichen zu Kontrollzellen. Die Zip-Expression war in zinkdefizienten Zellen allgemein erhöht. Signifikant erhöht war die Expression des Zip10-Transporters, während der Zip12-Transporter in Jurkat Zellen nicht exprimiert wurde. Dagegen war die Expression der ZnT1-, ZnT3- und ZnT8-Transporter signifikant verringert (Abb. 24 B). In Jurkat Zellen konnte eine Expression der Exporter ZnT2 und ZnT10 nicht nachgewiesen werden.

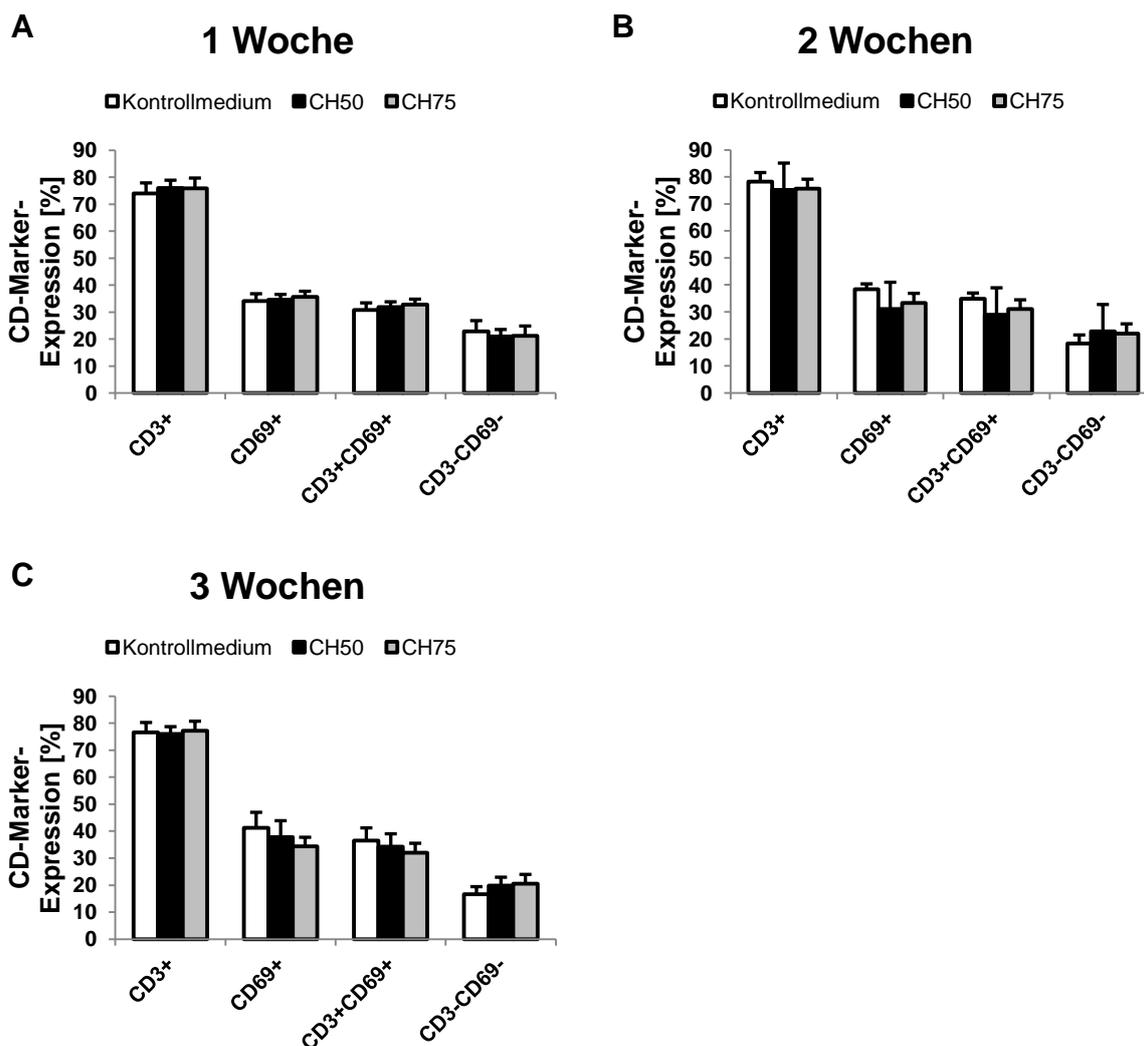


**Abbildung 24: Veränderte Expression der Zinktransporter nach dreiwöchigem Zinkmangel.**

Die Expression der Zip-Importer (A) und der ZnT-Exporter (B) wurde nach dreiwöchigem Zinkmangel in Jurkat Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen mittels qRT-PCR analysiert. PBGD wurde als Referenzgen verwendet und die Expressionsstärke wurde auf unbehandelte (zinkadäquate) Jurkat Kontrollzellen normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von n = 9 unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test bestimmt (\*\*\*) p < 0,001).

#### **4.3.6 Einfluss von Zink auf die CD3- und CD69-Expression**

Als T-Zellmarker und Bestandteil des TCR wurde die Expression von CD3 im Rahmen des Zinkmangel-Langzeitmodells genauer untersucht sowie eine mögliche veränderte Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69. Die Expression der CD3- und CD69-Marker wurde dabei nach 1, 2 und 3 Wochen in Jurkat Zellen untersucht, die entweder in Kontrollmedium, CH50- oder CH75-Medium kultiviert wurden (Abb. 25). Die Expression der CD-Marker zeigte unter Zinkmangel keine Unterschiede, verglichen mit Kontrollzellen. Darüber hinaus war kein Unterschied in der Expression der CD-Marker über die Zeit, also nach 1, 2 oder 3 Wochen, zu beobachten.



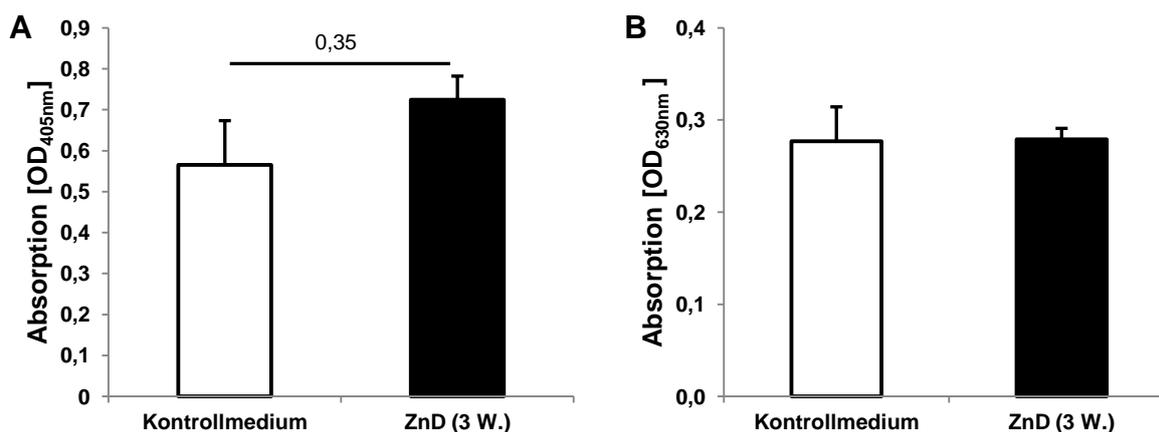
**Abbildung 25: Analyse der CD3- und CD69-Expressionen in Abhängigkeit vom intrazellulären Zinkgehalt.**

Nach 1 Woche (A), 2 Wochen (B) und 3 Wochen (C) Inkubation in Kontroll- oder Zinkmangelmedium (CH50 bzw. CH75) wurden Jurkat Zellen hinsichtlich ihrer CD3- und CD69-Expressionen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von n = 4-5 unabhängigen Experimenten. Es konnten keine signifikanten Unterschiede mittels Student's t-Test beim Vergleich der Expressionen von jeweils CD3+, CD69+, CD3+CD69+ sowie CD3-CD69- unter Zinkmangel im Vergleich zu Kontrollzellen bestimmt werden.

#### 4.3.7 Einfluss von Zink auf die Phosphataseaktivität

Aus der Literatur ist bekannt, dass die PP2A zu einer verstärkten Dephosphorylierung des *specificity protein* (SP)-1 in T-Zellen von SLE-Patienten führt. Dies wiederum verstärkt die Bindung von SP-1 an den CREM-Promotor, wodurch die CREM $\alpha$ -Expression verstärkt wird (65). Aus diesem Grund wurde die Phosphataseaktivität in Jurkat Zelllysaten nach dreiwöchigem Zinkmangel im

Vergleich zu Kontrollzellen zunächst mittels pNPP-Assay bestimmt (Abb. 26 A). Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Zellen, die unter Zinkmangel, und Zellen, die unter Kontrollbedingungen kultiviert wurden, nachgewiesen werden. Es war allerdings eine Tendenz zu einer erhöhten Phosphataseaktivität unter Zinkmangel zu beobachten. Außerdem wurde das für die PP2A spezifischere Substrat RRApTVA getestet. Mit diesem Substrat konnte ebenfalls kein signifikanter Einfluss von Zink auf die Phosphataseaktivität gezeigt werden (Abb. 26 B).

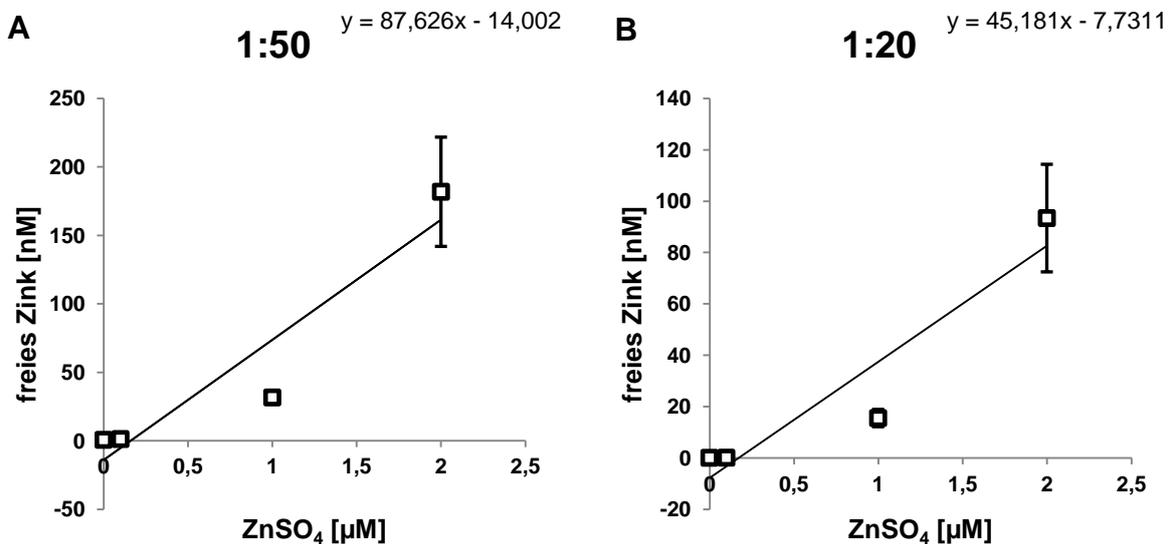


**Abbildung 26: Einfluss von Zink auf die Phosphataseaktivität in T-Zellen.**

Nach dreiwöchigem Zinkmangel wurde die Aktivität der alkalischen Proteinphosphatasen in Jurkat Zelllysaten im Vergleich zu der Aktivität in Kontrollzellen mittels pNPP-Assay bestimmt (A). Außerdem wurde das für die PP2A spezifischere Substrat RRApTVA zur Überprüfung der Phosphataseaktivität getestet (B). Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von  $n = 5$  unabhängigen Experimenten. Es konnten keine signifikanten Unterschiede mittels Student's t-Test bestimmt werden.

Da mithilfe dieser Tests die alleinige Messung der PP2A-Aktivität nicht möglich ist, wurde der Einfluss von Zink auf das aufgereinigte PP2A-Enzym untersucht. Zunächst wurde die Zinkpufferkapazität des PP2A-Reaktionspuffers ermittelt, um die frei verfügbare Zinkmenge zu bestimmen (Abb. 27). Durch das im Reaktionspuffer enthaltene DTT kann es bspw. zu einer verringerten frei verfügbaren Zinkmenge kommen. Der Puffer wurde mit verschiedenen  $\text{ZnSO}_4$ -Konzentrationen ( $0 \mu\text{M}$ ,  $0,1 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$  und  $2 \mu\text{M}$ ) supplementiert, und das freie Zink wurde im Anschluss mittels FluoZin-3 *Tetrapotassium Salt* am Fluoreszenzplattenleser gemessen. In Abb. 27 A ist die Zinkpufferkapazität des Reaktionspuffers unter den Bedingungen dargestellt, bei denen das PP2A-Enzym in einer Verdünnung von 1:50 dem Test zugegeben wurde, während in Abb. 27 B die Zinkpufferkapazität des Puffers unter den Bedingungen dargestellt ist, bei denen das PP2A-Enzym in einer Verdünnung

von 1:20 zur Aktivitätsmessung hinzugegeben wurde. Bei höheren eingesetzten Zinkkonzentrationen war eine Messung des freien Zinks aufgrund des Konzentrationsoptimums von FluoZin-3 nicht möglich. Unter Annahme einer linearen Abhängigkeit wurde deshalb die freie Zinkkonzentration mithilfe der in Abb. 27 A bzw. 27 B dargestellten Formeln berechnet.

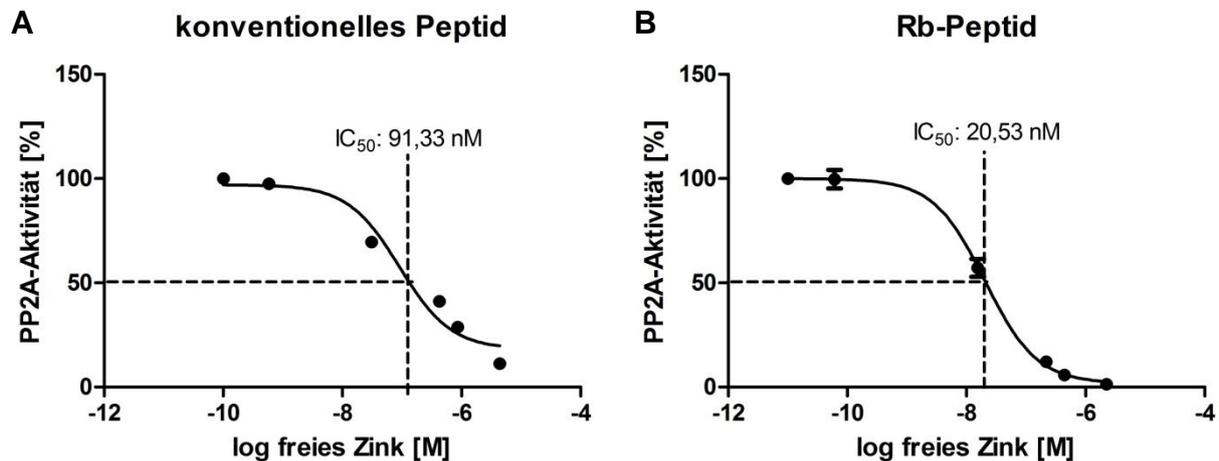


**Abbildung 27: Bestimmung der Menge an frei verfügbarem Zink im PP2A-Puffer.**

Nach Zugabe von ZnSO<sub>4</sub> (0 µM, 0,1 µM, 1 µM und 2 µM) zum PP2A-Puffer wurde das freie Zink mittels FluoZin-3 *Tetrapotassium Salt* am Fluoreszenzplattenleser bestimmt. Unter Annahme einer linearen Abhängigkeit ist jeweils die Formel dargestellt, die zur Berechnung der freien Zinkmenge bei höheren eingesetzten Zinkkonzentrationen verwendet wurde. (A) Gemessene freie Zinkmenge im PP2A-Reaktionspuffer, in dem das PP2A-Enzym 1:50 vorverdünnt wurde. (B) Gemessene freie Zinkmenge im PP2A-Reaktionspuffer, in dem das PP2A-Enzym 1:20 vorverdünnt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von n = 3 unabhängigen Experimenten

Anschließend konnte die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) von freiem Zink auf die PP2A-Aktivität nach ZnSO<sub>4</sub>-Zugabe (0 µM, 0,1 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM und 50 µM) bestimmt werden (Abb. 28). Das aufgereinigte Enzym wurde von Frau Prof. Veerle Janssens (KU Leuven/Belgien) hergestellt und die Enzymaktivität nach Zugabe der verschiedenen ZnSO<sub>4</sub>-Konzentrationen durch sie bestimmt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die hinzugegebenen Zinkkonzentrationen auf das freie Zink normalisiert (Abb. 27). Eine 50 %-ige Inhibition der PP2A erfolgte bei einer freien Zinkkonzentration von 91,33 nM in Anwesenheit eines konventionellen Peptids als PP2A-Substrat (Abb. 28 A). Hierbei wurde das PP2A-Enzym mit einer Verdünnung von 1:50 zum Reaktionspuffer hinzugegeben und die gemessenen

Werte beziehen sich daher auf die in Abb. 27 A bestimmten Zinkpufferkapazitäten. Dagegen zeigte die Verwendung eines physiologischen Substrats (Rb-Peptid) einen  $IC_{50}$ -Wert von 20,53 nM (Abb. 28 B). Bei diesem Testansatz wurde das Enzym mit einer Verdünnung von 1:20 eingesetzt und bezieht sich daher auf die in Abb. 27 B bestimmten Zinkpufferkapazitäten.



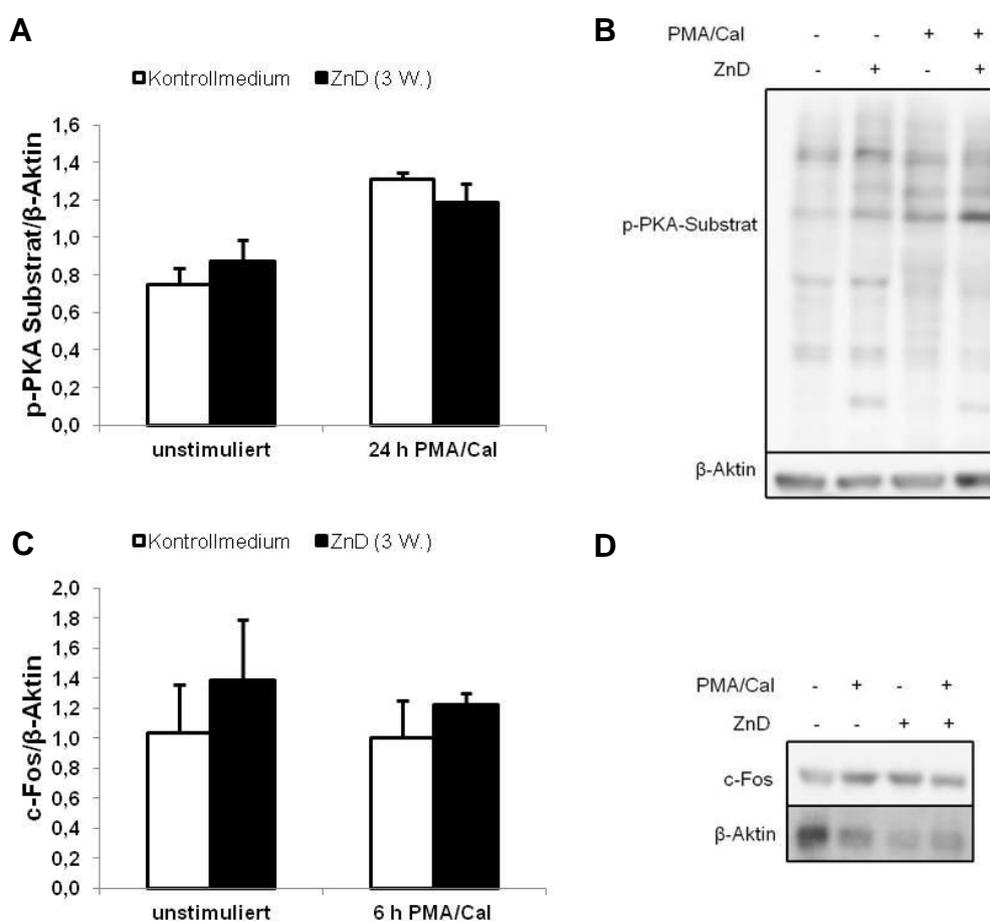
**Abbildung 28: Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes von Zink auf die PP2A-Aktivität.**

Der  $IC_{50}$ -Wert wurde durch PP2A-Aktivitätsmessungen nach Zinksupplementation (0  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 50  $\mu$ M  $ZnSO_4$ ) am Plattenleser bestimmt und auf das freie Zink im Reaktionspuffer normalisiert. Für die Bestimmung der PP2A-Aktivität in Anwesenheit des konventionellen Peptids, bei der das Enzym mit einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt wurde, wurden die zugegebenen Zinkkonzentrationen auf die in Abb. 27 A dargestellten freien Zinkkonzentrationen normalisiert (A). Im Gegensatz dazu wurden die zugegebenen Zinkkonzentrationen für die Bestimmung der PP2A-Aktivität in Anwesenheit des physiologischeren Rb-Peptids, bei der das Enzym mit einer Verdünnung von 1:20 eingesetzt wurde, auf die in Abb. 27 B dargestellten freien Zinkkonzentrationen normalisiert (B). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3$  unabhängigen Experimenten.

#### 4.3.8 Mögliche Zielmoleküle von Zink im *upstream* Signalweg von IL-2 und CREM $\alpha$

Es ist bereits beschrieben, dass die Isoform CREM $\tau$  am Serinrest 117 durch die Proteinkinase (PK)A phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung ist für die Aktivierung der darauffolgenden Genexpressionen wichtig (66). Eine Analyse des phosphorylierten PKA Substrats im Rahmen dieser Arbeit zeigte allerdings keinen Unterschied im Phosphorylierungsmuster unstimulierter sowie stimulierter Jurkat Zellen unter Zinkmangel oder zinkadäquaten Bedingungen (Abb. 29 A, B).

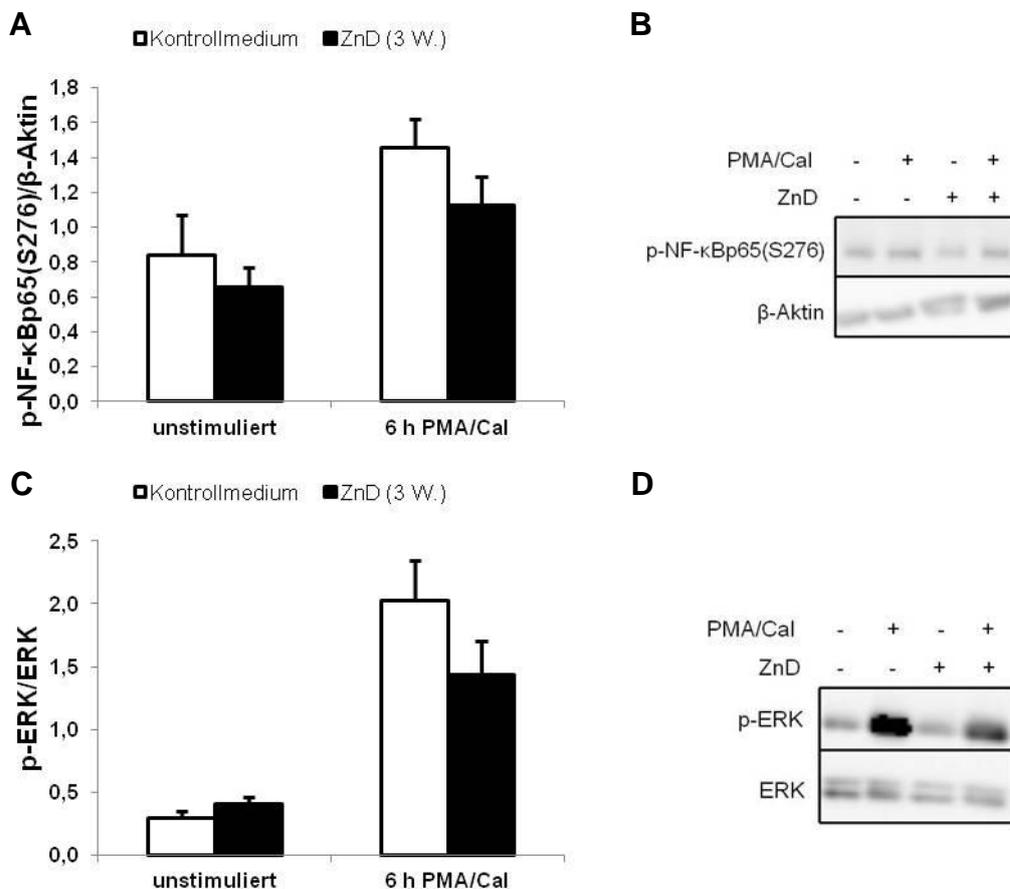
Der Transkriptionsfaktor c-Fos, welcher zur AP-1 Familie gehört, ist an der Induktion der IL-2-Transkription nach T-Zellstimulation beteiligt. Eine CREM $\alpha$ -Bindung an den c-Fos-Promotor führte zu einer verringerten c-Fos-Expression in T-Zellen von Patienten, die an SLE erkrankt waren (67). Aus diesem Grund kann der AP-1-Komplex nicht mehr richtig ausgebildet werden, was zu einer verringerten IL-2-Expression führt (67). Es konnten in dieser Arbeit keine Unterschiede in den Mengen an c-Fos zwischen Kontroll- und zinkdefizienten Zellen detektiert werden (Abb. 29 C, D).



**Abbildung 29: Einfluss eines dreiwöchigen Zinkmangels auf das phosphorylierte PKA Substrat und c-Fos.**

Nach dreiwöchigem Zinkmangel wurden das phosphorylierte (p-)PKA Substrat (A, B, n = 4) und c-Fos (C, D, n = 3), jeweils normalisiert auf die  $\beta$ -Aktin-Expression, in unstimulierten sowie PMA/Cal-stimulierten Jurkat Zellen untersucht. (A, C) Densitometrische Quantifizierung von n = 3-4 unabhängigen Experimenten sind als Mittelwert + SEM dargestellt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede mittels Student's t-Test bestimmt werden. (B, D) Immunodetektion eines repräsentativen Western Blots.

Desweiteren wurde ein möglicher Einfluss von Zink auf die S276-Phosphorylierung der NF- $\kappa$ B Untereinheit p65 untersucht (Abb. 30 A, B) sowie ein möglicher Einfluss auf die Phosphorylierung von T202/Y204 von ERK (Abb. 30 C, D). Beide Positionen stellen wichtige Phosphorylierungsstellen dar, die an einer Induktion der IL-2-Transkription beteiligt sind (13, 37). Es konnte kein signifikanter Einfluss einer verringerten Zinkmenge auf die Stärke der Phosphorylierungen detektiert werden. Es war lediglich eine leicht verringerte Phosphorylierung in zinkdefizienten Zellen zu sehen im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 30).

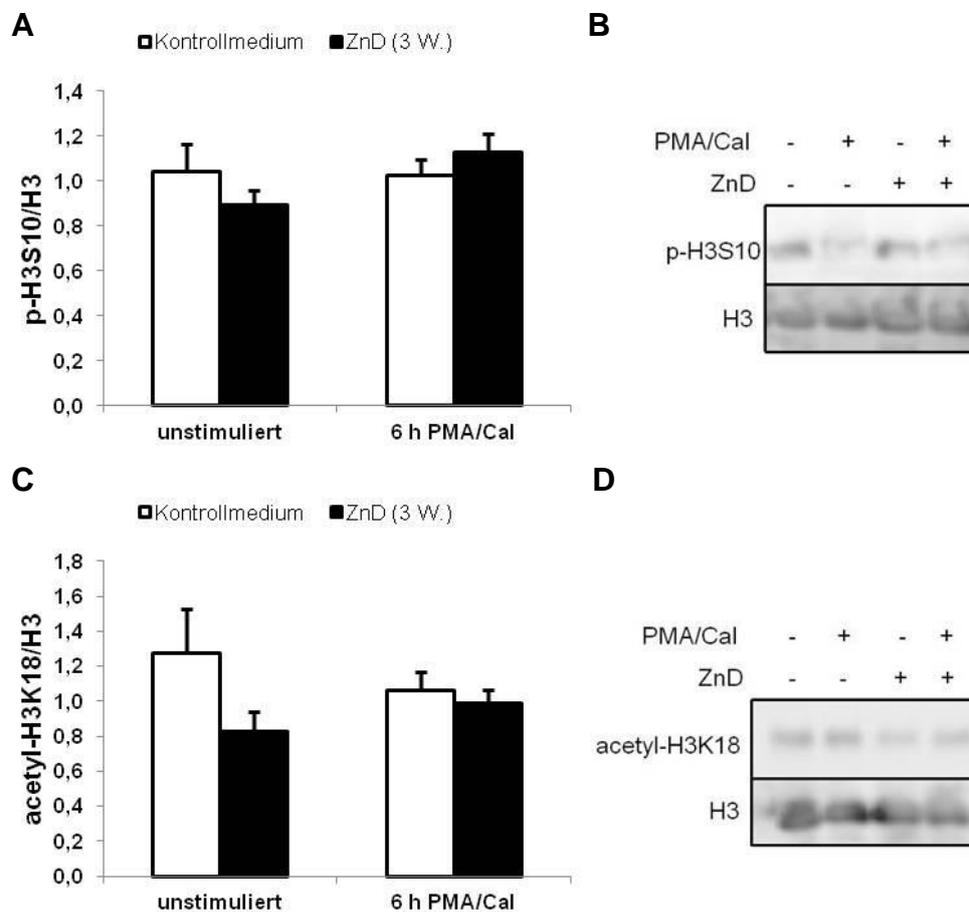


**Abbildung 30: Einfluss eines dreiwöchigen Zinkmangels auf p-NF- $\kappa$ Bp65(S276) und p-ERK.**

Nach dreiwöchigem Zinkmangel wurden p-NF- $\kappa$ Bp65(S276), was auf die  $\beta$ -Aktin-Expression normalisiert wurde (A, B,  $n = 3$ ), und p-ERK, was auf die ERK-Expression normalisiert wurde (C, D,  $n = 3$ ), in unstimulierten sowie PMA/Cal-stimulierten Jurkat Zellen untersucht. (A, C) Densitometrische Quantifizierung von  $n = 3$  unabhängigen Experimenten sind als Mittelwert + SEM dargestellt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede mittels Student's t-Test bestimmt werden. (B, D) Immunodetektion eines repräsentativen Western Blots.

Neben den o.g. untersuchten Zielmolekülen ist eine Regulation durch epigenetische Mechanismen denkbar. Daher wurde der Phosphorylierungsstatus von S10 des

Histons (H)3 (Abb. 31 A, B) sowie die Acetylierung von H3K18 (Abb. 31 C, D) untersucht. Es waren keine Unterschiede in diesen PTMs aufgrund unterschiedlicher Zinkkonzentrationen messbar.

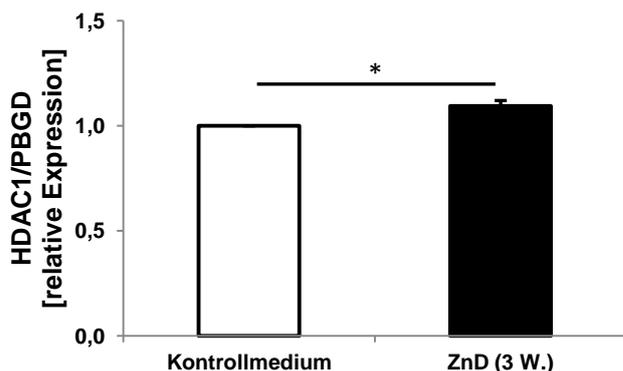


**Abbildung 31: Einfluss eines dreiwöchigen Zinkmangels auf p-H3S10 und acetyl-H3K18.**

Nach dreiwöchigem Zinkmangel wurden p-H3S10 (A, B, n = 6) und acetyl-H3K18 (C, D, n = 4), jeweils normalisiert auf die H3-Expression, in unstimulierten sowie PMA/Cal-stimulierten Jurkat Zellen untersucht. (A, C) Densitometrische Quantifizierung von n = 4-6 unabhängigen Experimenten sind als Mittelwert + SEM dargestellt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede mittels Student's t-Test bestimmt werden. (B, D) Immunodetektion eines repräsentativen Western Blots.

#### 4.3.9 Einfluss von Zink auf die HDAC1-Aktivität

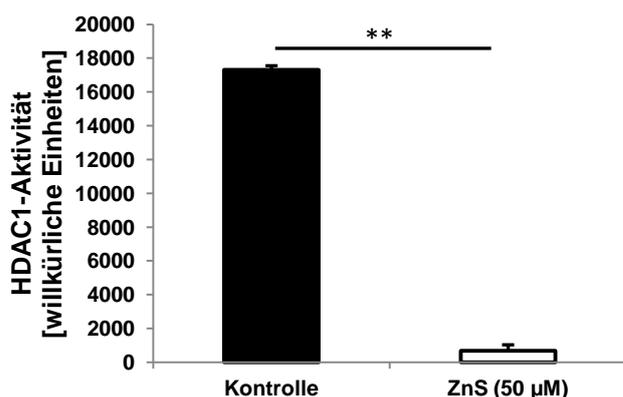
Es ist bekannt, dass CREM $\alpha$  in T-Zellen von SLE-Patienten verstärkt HDAC1 an den IL-2-Promotor rekrutiert, was zu einer verstärkten Deacetylierung von H3K18 führt und mit einer verringerten IL-2-Produktion einhergeht (56). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression der HDAC1 zunächst auf RNA-Ebene in Jurkat Zellen untersucht, was eine verstärkte Expression nach dreiwöchigem Zinkmangel zeigte (Abb. 32).



**Abbildung 32: Erhöhte HDAC1-Expression nach dreiwöchigem Zinkmangel.**

Die HDAC1-Expression wurde in Jurkat Zellen nach dreiwöchigem Zinkmangel mittels qRT-PCR in zinkdefizienten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen untersucht. PBGD wurde als Referenzgen verwendet und die Expressionsstärke auf unbehandelte (zinkadäquate) Jurkat Kontrollzellen normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von  $n = 6$  unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test bestimmt (\*  $p < 0,05$ ).

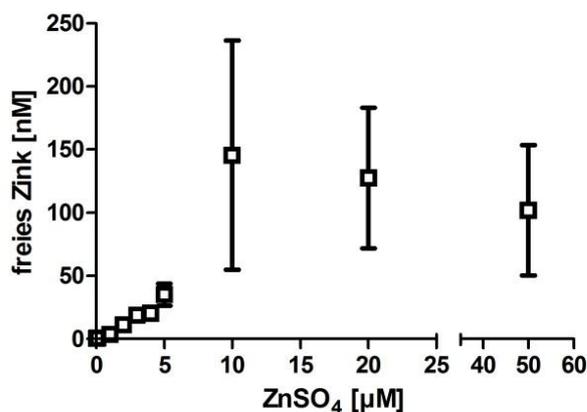
In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss von Zink auf die Aktivität der HDAC1 überprüft. Durch eine Supplementation mit  $50 \mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  kam es zu einer fast vollständigen Inhibition des Enzyms (Abb. 33). Nach Bestimmung der Zinkpufferkapazität des verwendeten Puffers stellte sich heraus, dass eine Supplementation mit  $50 \mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  einer freien Zinkkonzentration von  $102 \text{ nM}$  im Puffer entspricht (Abb. 34).



**Abbildung 33: Verringerte HDAC1-Aktivität nach Zinksupplementation.**

Die Aktivität der HDAC1 wurde nach Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}$  als Kontrolle bestimmt. Außerdem wurde die HDAC1-Aktivität nach Zugabe von  $50 \mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , welches in  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst wurde, gemessen. Die Zugabe von  $50 \mu\text{M}$  entspricht der Menge von  $102 \text{ nM}$  freiem Zink im Puffer, was mittels Zinkpufferkapazität bestimmt wurde (Abb. 34). Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von  $n = 3$  unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test bestimmt (\*\*  $p < 0,01$ ).

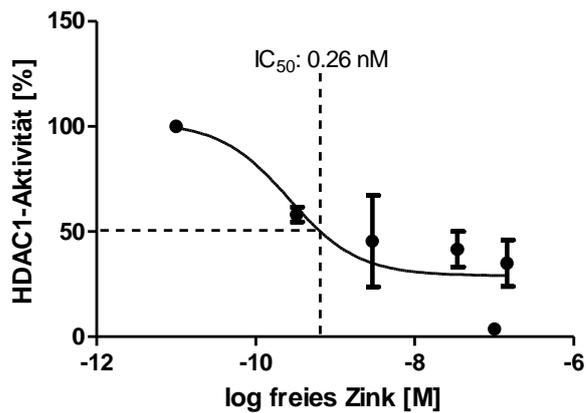
Aufgrund der starken Inhibition der HDAC1 durch Zink wurde im Weiteren die  $IC_{50}$  von freiem Zink auf das Enzym bestimmt. Zunächst wurde die Zinkpufferkapazität des HDAC1-Testpuffers untersucht, um herauszufinden, wie viel des zugegebenen  $ZnSO_4$  im Puffer frei verfügbar ist (Abb. 34). Durch Komponenten, die im verwendeten Puffer enthalten sind und das zugegebene Zink binden, kann die frei verfügbare Zinkmenge beeinflusst werden. Der Puffer wurde mit verschiedenen  $ZnSO_4$ -Konzentrationen (0  $\mu M$ , 0,1  $\mu M$ , 1  $\mu M$ , 2  $\mu M$ , 3  $\mu M$ , 4  $\mu M$ , 5  $\mu M$ , 10  $\mu M$ , 20  $\mu M$  und 50  $\mu M$ ) supplementiert. Das freie Zink wurde im Anschluss mittels FluoZin-3 *Tetrapotassium Salt* am Fluoreszenzplattenleser gemessen.



**Abbildung 34: Bestimmung der Menge an frei verfügbarem Zink im HDAC1-Puffer.**

Nach Zugabe von  $ZnSO_4$  (0  $\mu M$ , 0,1  $\mu M$ , 1  $\mu M$ , 2  $\mu M$ , 3  $\mu M$ , 4  $\mu M$ , 5  $\mu M$ , 10  $\mu M$ , 20  $\mu M$  und 50  $\mu M$ ) zum HDAC1-Puffer wurde das freie Zink mittels FluoZin-3 *Tetrapotassium Salt* am Fluoreszenzplattenleser bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3$  unabhängigen Experimenten.

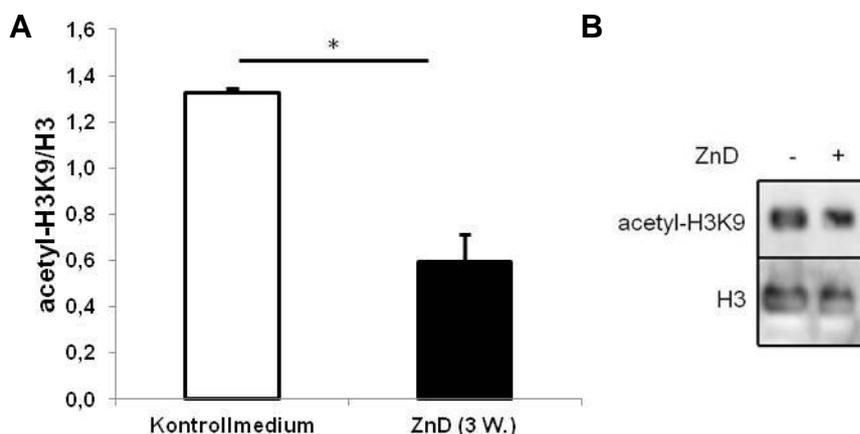
Im nächsten Schritt konnte der  $IC_{50}$ -Wert mithilfe von HDAC1-Aktivitätsmessungen nach der Zugabe von  $ZnSO_4$  (0  $\mu M$ , 0,1  $\mu M$ , 1  $\mu M$ , 5  $\mu M$ , 10  $\mu M$  und 50  $\mu M$ ) bestimmt werden. Die supplementierten Zinkkonzentrationen wurden auf das freie Zink normalisiert, welches zuvor im Reaktionspuffer gemessen wurde (Abb. 34). Eine 50 %-ige Inhibition der HDAC1 erfolgte bei einer Konzentration von 0,26 nM freiem Zink (Abb. 35).



**Abbildung 35: Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes von Zink auf die HDAC1-Aktivität.**

Der IC<sub>50</sub>-Wert wurde durch HDAC1-Aktivitätsmessungen nach Zinksupplementation (0  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 50  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>) am Fluoreszenzplattenleser bestimmt und auf das freie Zink im Reaktionspuffer normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n=3$  unabhängigen Experimenten.

Wie in Kap. 4.3.8 beschrieben wurde, konnte kein Unterschied in der H3K18-Acetylierung unter verschiedenen Zinkbedingungen detektiert werden. Dagegen zeigte die Analyse der H3K9-Acetylierung eine verringerte Acetylierung unter Zinkmangel (Abb. 36).



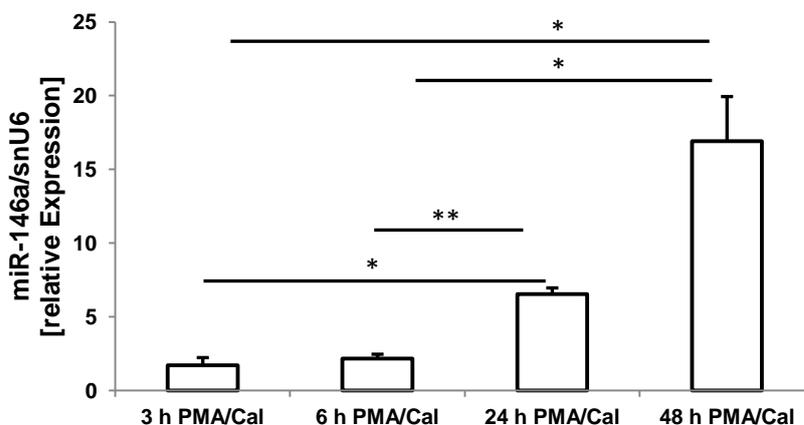
**Abbildung 36: Verringerte Acetylierung von H3K9 unter Zinkmangel.**

(A) Nachdem Jurkat Zellen für drei Wochen unter Zinkmangel kultiviert wurden, zeigte sich eine verminderte H3K9-Acetylierung in den Zelllysaten, verglichen zu Kontrollzellen. (A) Densitometrische Quantifizierung von  $n=3$  unabhängigen Experimenten sind als Mittelwert + SEM dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test bestimmt (\*  $p < 0,05$ ). (B) Immunodetektion eines repräsentativen Western Blots.

### 4.3.10 Einfluss von Zink auf die miR-146a-Expression

Neben den zuvor beschriebenen untersuchten Mechanismen, die in der Lage sind, die Genregulation zu beeinflussen, gibt es eine weitere Molekülgruppe, die an einer post-transkriptionellen Regulation beteiligt ist, und zwar die miRNAs. Die Methode zur Analyse dieser kleinen RNAs wurde im Rahmen dieser Arbeit am Institut etabliert.

Es wurde eine Zeitkinetik durchgeführt, um einen geeigneten Zeitpunkt für die Analyse eines möglichen Zinkeinflusses auf miR-146a zu bestimmen (Abb. 37).

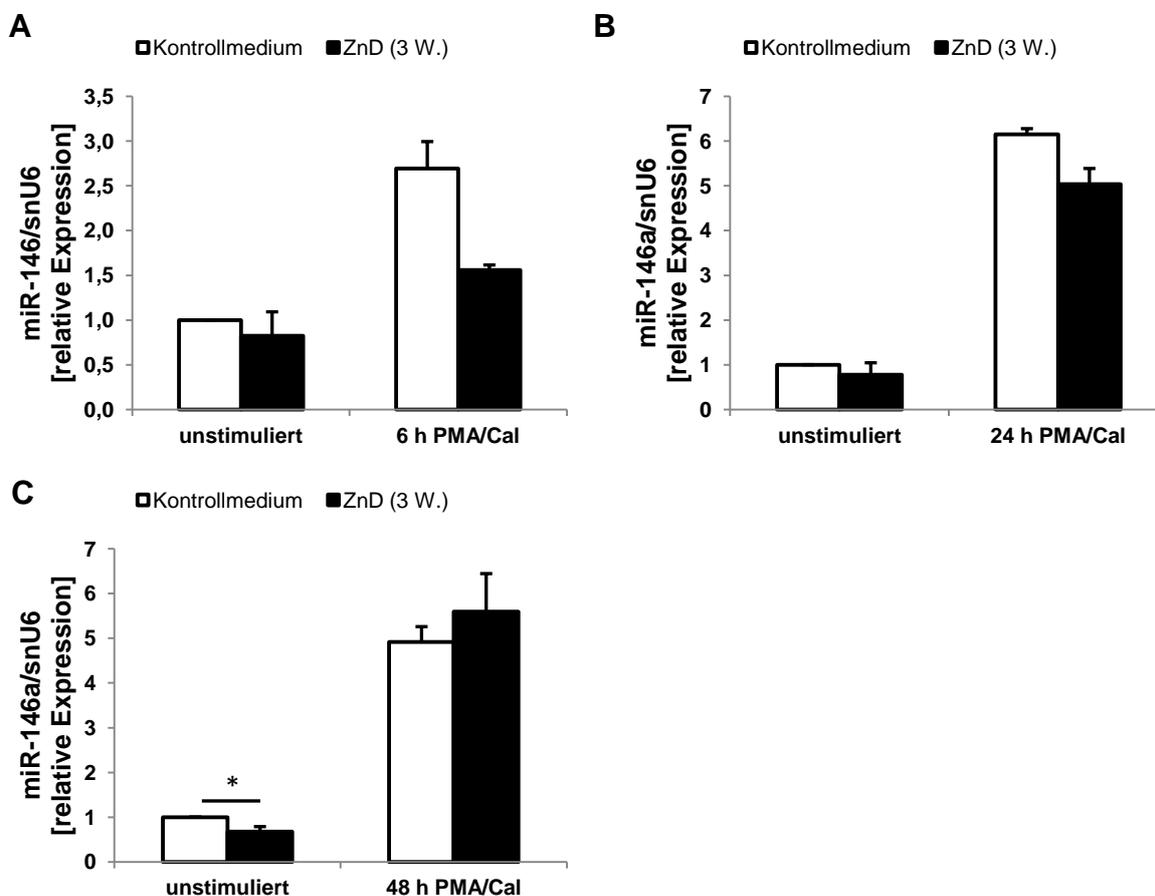


**Abbildung 37: Zeitkinetik der miR-146a-Expression.**

In Jurkat Zellen wurde nach 3-, 6-, 24- und 48-stündiger PMA/Cal-Stimulation die miR-146a-Expression mittels qRT-PCR analysiert. snU6 wurde als Referenzgen verwendet und die Expressionsstärke auf unstimulierte Kontrollzellen normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von  $n = 3$  unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test bestimmt (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

Nach 24-stündiger PMA/Cal-Stimulation nahm die Expression im Vergleich zu einer 3- sowie 6-stündigen Stimulation zu und erreichte nach 48-stündiger Stimulation die stärkste Expression. Aus diesem Grund wurde ein Einfluss von Zink auf die miR-146a-Expression nach 24- (Abb. 38 B) sowie nach 48-stündiger (Abb. 38 C) PMA/Cal-Stimulation untersucht. Da im Chelex-Langzeitversuch bereits nach 6-stündiger Stimulation von Jurkat Zellen interessante Ergebnisse hinsichtlich der IL-2- sowie CREM $\alpha$ -Expressionen beobachtet wurden (Kap. 4.3.3 und 4.3.4), wurde dieser Zeitpunkt ebenfalls zur Untersuchung eines möglichen Zinkeinflusses auf die miR-146a-Expression berücksichtigt (Abb. 38 A).

Nach dreiwöchigem Zinkmangel zeigte sich nach 6- und 24-stündiger Stimulation bzw. in unstimulierten Ansätzen tendenziell eine verringerte miR-146a-Expression, die nach einem 23-tägigen Zinkmangel signifikant verringert war (Abb. 38 C).



**Abbildung 38: Veränderte miR-146a-Expression nach dreiwöchigem Zinkmangel.**

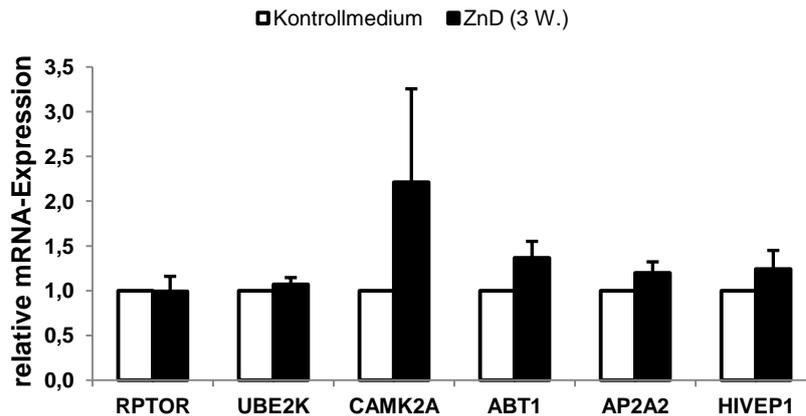
Nachdem Jurkat Zellen für drei Wochen unter Zinkmangelbedingungen kultiviert wurden, wurde die miR-146a-Expression in unstimulierten sowie PMA/Cal-stimulierten Jurkat Zellen nach 6 h (A, n = 2), 24 h (B, n = 2) und 48 h (C, n = 3) mittels qRT-PCR analysiert. snU6 wurde als Referenzgen verwendet und die Expressionsstärke wurde auf die Expression der unbehandelten Kontrolle normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test bestimmt (\* p < 0,05).

#### 4.3.11 Einfluss von Zink auf den Methylierungsstatus der DNA

Die DNA-Methylierung stellt einen weiteren wichtigen epigenetischen Regulationsmechanismus dar und könnte an einer veränderten IL-2-Expression aufgrund des verfügbaren Zinks in T-Zellen beteiligt sein. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit das Brain & Life Center beauftragt, einen EPIC Methylscreen Array durchzuführen.

Für die Analyse des Methylierungsmusters wurde DNA verwendet, die aus Jurkat Zellen isoliert wurde, die sich entweder für drei Wochen im Zinkmangel (CH50) befanden oder die unter zinkadäquaten Bedingungen kultiviert wurden. Nachdem der EPIC Methylscreen Array in Bonn durchgeführt wurde, war aufgrund der großen Datenmenge bioinformatische Unterstützung von Jan Hapala (Ph.D.) und Prof. Wolfgang Wagner notwendig, um die Daten angemessen zu analysieren. In Bezug auf das Methylierungsmuster des *IL2*-Gens konnte kein signifikanter Unterschied zwischen zinkadäquaten Kontrollzellen und zinkdefizienten Zellen festgestellt werden. Daher kann eine veränderte Methylierung des *IL2*-Gens durch Zink mit darauffolgender veränderter IL-2-Produktion ausgeschlossen werden.

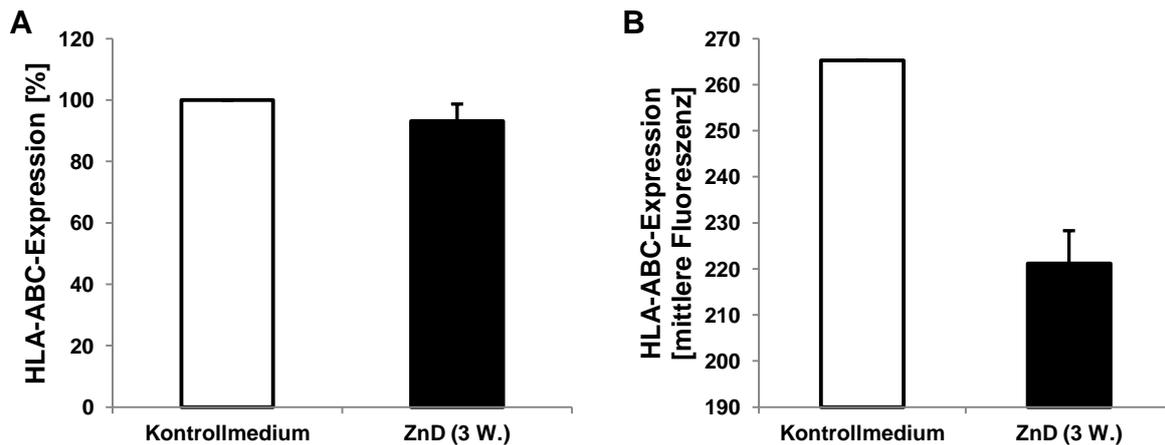
Neben der Methylierungsstelle im *IL2*-Gen wurden eine Vielzahl weiterer Methylierungsstellen mithilfe des EPIC Methylscreen Arrays untersucht. Nach Durchführung des Limma t-Tests, bei dem der p-Wert auf die Anzahl der CpG-Stellen angepasst wird, konnten sechs Zielgene analysiert werden, die signifikante Unterschiede in ihrem Methylierungsmuster nach dreiwöchigem Zinkmangel aufwiesen, verglichen zu Kontrollzellen. Diese Gene umfassten *RPTOR* (*regulatory associated protein of MTOR complex 1*), *UBE2K* (*ubiquitin conjugating enzyme E2 K*), *CAMK2A* (*calcium/calmodulin dependent protein kinase II  $\alpha$* ), *ABT1* (*activator of basal transcription 1*), *AP2A2* (*adaptor related protein complex 2  $\alpha$  2 subunit*) und *HIVEP1* (*human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 1*). Nachdem entsprechende Primer etabliert wurden, wurde die Expression der Gene auf RNA-Ebene in Jurkat Zellen nach dreiwöchigem Zinkmangel vs. zinkadäquaten Bedingungen untersucht. Bei der Analyse der Genexpressionen mittels qRT-PCR konnten keine signifikanten Unterschiede aufgrund verschiedener Zinkbedingungen detektiert werden (Abb. 39).



**Abbildung 39: Analyse eines Zinkeinflusses auf potenzielle Zielgene, die mittels Methylierungsanalysen identifiziert wurden.**

Nach dreiwöchiger Inkubation wurde DNA aus Jurkat Zellen isoliert, die unter zinkadäquaten sowie zinkdefizienten Bedingungen kultiviert wurden. Anschließend folgte eine Analyse der Methylierungsmuster der DNA mittels EPIC Methylscreen Array. Mithilfe des Limma t-Tests wurden signifikante Unterschiede in der Methylierung der Gene *RPTOR*, *UBE2K*, *CAMK2A*, *ABT1*, *AP2A2* und *HIVEP1* gefunden und als mögliche Zielgene eines Zinkmangels identifiziert. Die Expression dieser Gene wurde auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR untersucht. PBGD wurde als Referenzgen verwendet und die Expressionsstärke auf die Expression der unbehandelten Kontrolle normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von  $n = 11$  unabhängigen Experimenten. Es konnten keine signifikanten Unterschiede mittels Student's t-Test bestimmt werden.

Für das Genprodukt von *UBE2K* ist eine Beteiligung an der Verlagerung von neu synthetisierten  $\alpha$ -Ketten des MHC I-Komplexes aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Abbau in das Cytosol beschrieben (68). Daher wurden Jurkat Zellen nach dreiwöchigem Zinkmangel mittels Durchflusszytometrie in Hinblick auf ihre HLA-ABC (MHC I)-Expression im Vergleich zu Kontrollzellen untersucht (Abb. 40). Der Anteil an HLA-ABC positiven Zellen zeigte keinen Unterschied zwischen zinkdefizienten und zinkadäquaten Zellen (Abb. 40 A). Die Betrachtung der mittleren Fluoreszenz ergab eine leicht verringerte Intensität in zinkdefizienten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 40 B). Für diesen Versuch konnte keine statistische Auswertung durchgeführt werden, da dieser mit lediglich  $n = 2$  Replikaten durchgeführt wurde. Im Verlauf dieser Arbeit wurde der Fokus auf Untersuchungen eines Zinkeinflusses auf die Regulation der *IL2*-Genexpression gelegt, sodass weitere Analysen hinsichtlich der DNA-Methylierung nicht durchgeführt wurden. Dieses Ergebnis stellt aber einen interessanten Anknüpfungspunkt für weitere Untersuchungen dar.



**Abbildung 40: Analyse der HLA-ABC-Expression auf der Oberfläche von zinkdefizienten und zinkadäquaten Jurkat Zellen.**

Nach dreiwöchigem Zinkmangel wurden Jurkat Zellen mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich ihrer HLA-ABC-Expression im Vergleich zu Kontrollzellen untersucht. (A) Darstellung der HLA-ABC positiven Zellen [%]. (B) Darstellung der Fluoreszenzintensität [mittlere Fluoreszenz]. Mittelwerte + SEM von  $n = 2$  unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

## 4.4 Schweinemodell

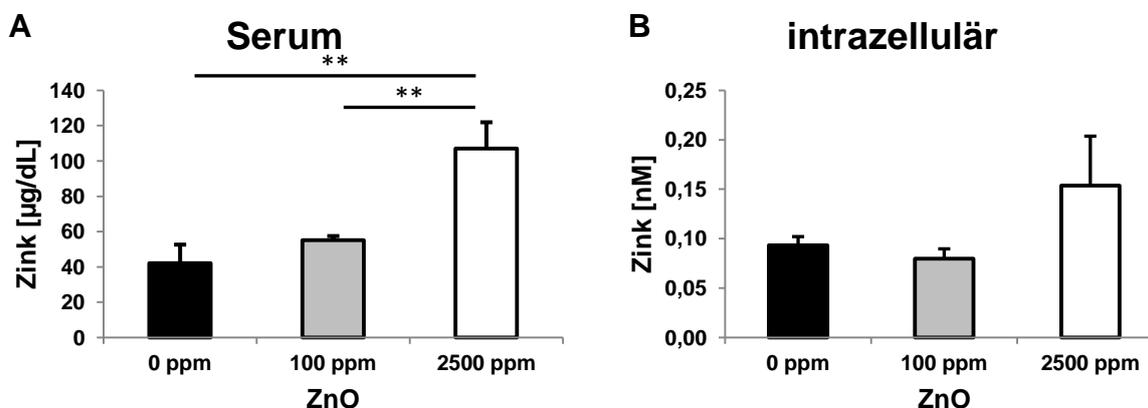
### 4.4.1 Zinkmessung

Im Rahmen dieser Arbeit ergab sich die Möglichkeit, einen Forschungsaufenthalt an der Universität Aarhus in Dänemark zu verbringen, wo eine Studie mit zinksupplementierten Schweinen durchgeführt wurde. Die untersuchten Schweine erhielten in ihrem Futter für 1-2 Wochen unterschiedliche Mengen an Zinkoxid (ZnO). Die Kontrollgruppe bekam Futter ohne zusätzliches Zink (0 ppm = Zn0), während die zweite untersuchte Schweinegruppe zusätzlich 100 ppm ZnO (Zn100) und eine dritte Schweinegruppe zusätzlich 2500 ppm ZnO (Zn2500) im Futter erhielten.

Im Serum der Schweine war ein Anstieg des Zinkgehalts nach Zn2500-Supplementation im Vergleich zu Zn0- und Zn100-Schweinen mittels ICP-MS (Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma) zu sehen (Abb. 41 A). Diese Daten wurden von Frau Prof. Karoline Blaabjerg (Aarhus University/Dänemark) zur Verfügung gestellt.

Außerdem wurde der intrazelluläre Zinkgehalt mithilfe von FluoZin-3 AM in PBMC, die aus dem Schweineblut isoliert wurden, nachgewiesen (Abb. 41 B). Dabei war lediglich ein Trend in Richtung eines erhöhten Zinkgehalts in Zn2500-Schweinen zu

beobachten. Um ein signifikantes Ergebnis zu erhalten, müssten weitere Schweine untersucht werden.

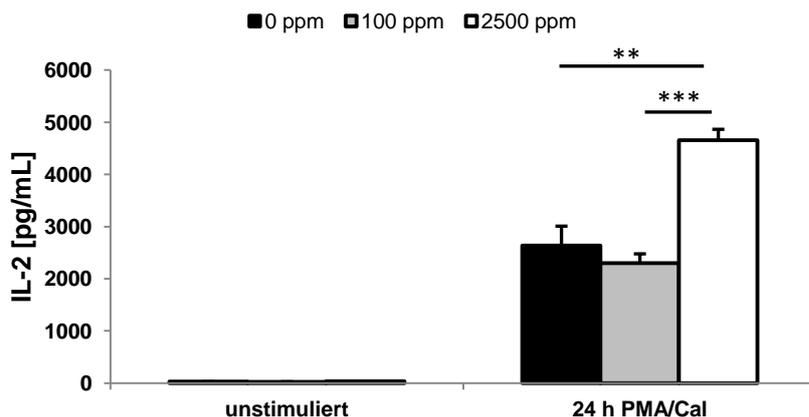


**Abbildung 41: Erhöhter Zinkgehalt nach ZnO-Supplementation von Schweinen.**

Das Futter der Schweine enthielt entweder kein zusätzliches Zink (0 ppm) oder es wurde mit 100 ppm bzw. 2500 ppm ZnO supplementiert. (A) Die Analyse des Serumzinks erfolgte mithilfe von ICP-MS (n = 5-6). (B) PBMC wurden aus Vollblut isoliert und zur Bestimmung des intrazellulären Zinkgehalts am Durchflusszytometer mithilfe von FluoZin-3 AM verwendet (n = 5). Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels ungepaartem t-Test bestimmt (\*\* p < 0,01).

#### 4.4.2 IL-2-Produktion

Der Einfluss einer Zinksupplementation auf die IL-2-Produktion wurde mithilfe von PBMC, die aus Schweineblut isoliert wurden, analysiert. Die isolierten PBMC wurden dazu mit PMA/Cal stimuliert und unstimulierte Kontrollen wurden parallel inkubiert. Im Anschluss wurde die IL-2-Konzentration in den Überständen mittels ELISA bestimmt (Abb. 42). In stimulierten PBMC von Zn2500 Schweinen war die IL-2-Menge signifikant erhöht, verglichen mit Zn0 und Zn100 Schweinen.

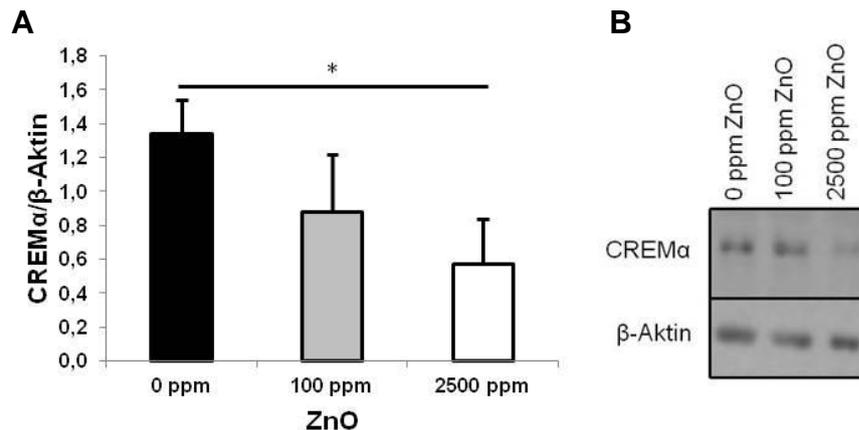


**Abbildung 42: Erhöhte IL-2-Produktion nach Zinksupplementation in Schweine-PBMC.**

PBMC wurden aus den verschiedenen ZnO-supplementierten Schweinen (0 ppm, 100 ppm und 2500 ppm) isoliert und mit PMA/Cal für 24 h stimuliert. Die IL-2-Mengen wurden in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von  $n = 5-6$  unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels ungepaarstem t-Test bestimmt (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 4.4.3 CREM $\alpha$ -Expression

Neben der IL-2-Produktion wurde die CREM $\alpha$ -Produktion in den PBMC, die aus dem Blut der verschiedenen Schweinegruppen isoliert wurden, bestimmt (Abb. 43). Die Menge an CREM $\alpha$  war auf Proteinebene in Zn2500-Schweinen signifikant verringert im Vergleich zu Zn0-Schweinen und bestätigt damit die im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* erhaltenen Ergebnisse auch *in vivo*.



**Abbildung 43: Verringerte CREMα-Produktion nach Zinksupplementation in Schweine-PBMC.**

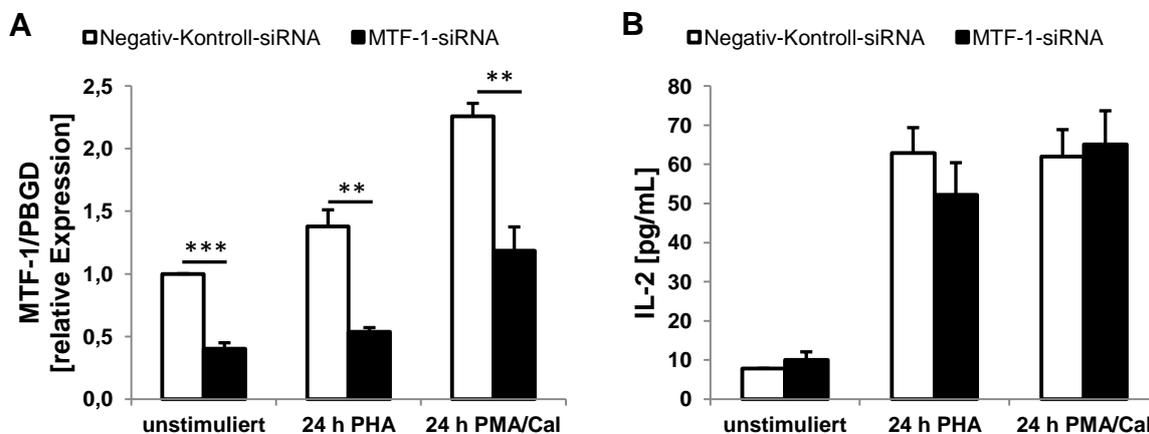
Zelllysate von isolierten PBMC der drei verschiedenen Schweinegruppen (0 ppm, 100 ppm und 2500 ppm ZnO) wurden im Western Blot analysiert. (A) Densitometrische Quantifizierung von  $n = 5$  unabhängigen Experimenten sind als Mittelwert + SEM dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden mittels ungepaartem t-Test bestimmt (\*  $p < 0,05$ ). (B) Immunodetektion eines repräsentativen Western Blots.

Neben der Analyse auf Proteinebene wurde die CREMα-Expression auch auf RNA-Ebene untersucht. Die Auswertung der Ergebnisse war allerdings nicht möglich, da kein geeignetes Referenzgen gefunden werden konnte. Es wurden zunächst verschiedene in der Literatur für Schweine beschriebene Referenzgene überprüft (RPL4 [ribosomal protein L4], TBP1 [TATA box binding protein 1], YWHAZ [tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta polypeptide], PPIA [peptidylprolyl isomerase A] und GAPDH [glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase]). Die Expression dieser Referenzgene war allerdings für keines der Gene stabil. Zudem variierte die Expressionsstärke über die Zeit oder nach erfolgter Stimulation, weshalb eine ordnungsgemäße Analyse mittels qRT-PCR nicht möglich war. Die Problematik, ein adäquates Referenzgen für die Analyse der Genexpression in PBMC, die aus Schweineblut isoliert wurden, zu finden, wurde bereits beschrieben (69).

#### 4.5 MTF-1-Genaktivierung

Der Transkriptionsfaktor MTF-1 bindet an MRE-Sequenzen (5'-TGCRNC-3'). In Anwesenheit von Zink wird die Zielsequenz durch MTF-1 erkannt und gebunden und stellt daher ein interessantes Zielmolekül für die Untersuchung eines Zinkeinflusses dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Bereich analysiert, der sich *upstream* des

TSS im *IL2*-Gen (NG\_016779) befindet. Dabei konnte eine MRE-Sequenz mit den Nukleotiden 5'-TGCCTG-3', die an Position 4085 startete, identifiziert werden. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der MTF-1-Aktivität und der IL-2-Produktion zu analysieren, wurden Jurkat Zellen mit siRNA transfiziert, die gegen die MTF-1 mRNA gerichtet war. Dadurch konnte die RNA nicht in das entsprechende MTF-1-Protein translatiert werden. Die Transfektion der Zellen erfolgte mithilfe der Elektroporation und der Erfolg dieser Stilllegung wurde mittels qRT-PCR überprüft. Alle Ansätze, die mit MTF-1-siRNA transfiziert wurden, zeigten eine signifikant verringerte MTF-1-Menge im Vergleich zu Zellen, die mit einer Negativ-Kontroll-siRNA transfiziert wurden (Abb. 44 A). Um einen möglichen Einfluss von MTF-1 auf die IL-2-Produktion zu überprüfen, wurde die Menge an IL-2 in den Überständen der transfizierten Zellen gemessen (Abb. 44 B). Zellen, die mit MTF-1-siRNA transfiziert wurden, zeigten keinen Unterschied in der IL-2-Produktion im Vergleich zu Zellen, die mit der Negativ-Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Somit kann eine verringerte IL-2-Produktion aufgrund einer verringerten MTF-1-Bindung an den IL-2-Promotor unter Zinkmangel ausgeschlossen werden.

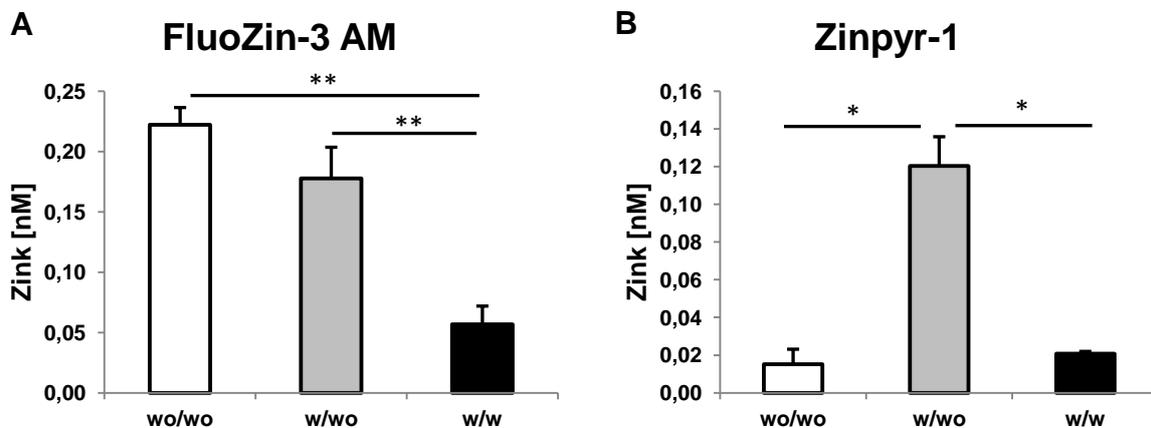


**Abbildung 44: Der Einfluss einer MTF-1-Gen-Stilllegung auf die IL-2-Produktion.**

Jurkat Zellen wurden entweder mit Negativ-Kontroll-siRNA oder mit MTF-1-siRNA mittels Elektroporation transfiziert. (A) Der Erfolg der Transfektion und damit der Stilllegung von MTF-1 wurde mittels qRT-PCR überprüft. PBGD wurde als Referenzgen verwendet. Die Expressionsstärke wurde auf die Expression der unbehandelten Kontrolle normalisiert. (B) Die Menge an IL-2 wurde in den Überständen der transfizierten Zellen mittels ELISA bestimmt, die entweder als Kontrollen unstimuliert blieben oder mit PHA sowie PMA/Cal für 24 h stimuliert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von n = 5 unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test bestimmt (\*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001).

## 4.6 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Jurkat T-Zellen

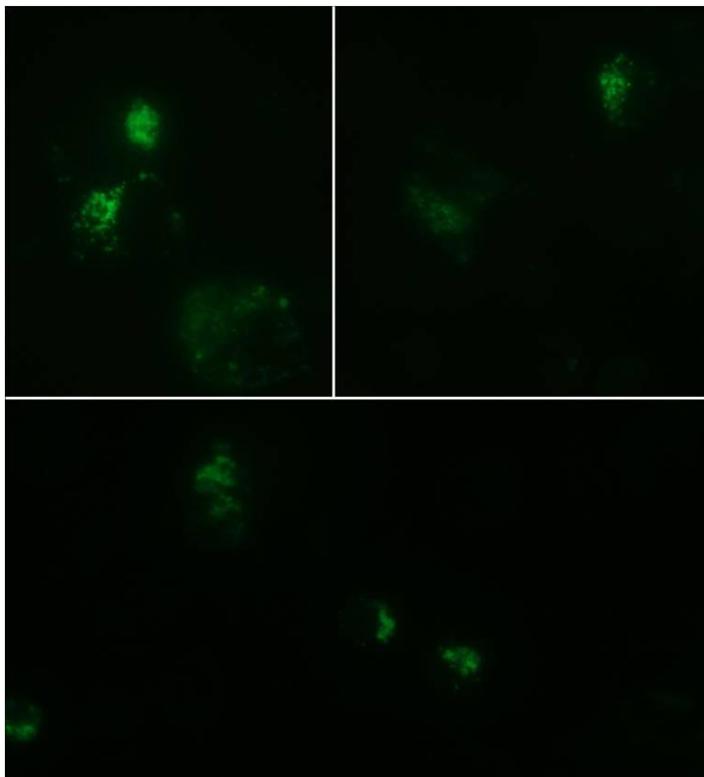
Neben den bislang beschriebenen untersuchten Zinkmangelansätzen wurde zu Beginn dieser Dissertation außerdem ein Zinkflux in der humanen Jurkat Zelllinie untersucht. Die Zellen wurden, wie in Kap. 3.2.3 beschrieben, inkubiert. Die Detektion des intrazellulären Zinkgehalts erfolgte mithilfe der Fluoreszenzsonden FluoZin-3 AM sowie Zinpyr-1 am Durchflusszytometer (Abb. 45). Interessanterweise wurde unter Verwendung der Fluoreszenzsonde FluoZin-3 AM im Zinkresupplementations-Ansatz (w/wo) weniger intrazelluläres Zink detektiert im Vergleich zu Kontrollzellen (wo/wo) (Abb. 45 A). Unter Verwendung von Zinpyr-1 wurde ein signifikanter Anstieg in der Zinkkonzentration im Zinkresupplementations-Ansatz (w/wo) detektiert im Vergleich zu den Kontroll- (wo/wo) sowie den Zinkmangel-Ansätzen (w/w) (Abb. 45 B). Der Zinkmangel-Ansatz (w/w) enthielt bei der Detektion des intrazellulären Zinkgehalts mit Zinpyr-1 etwa genauso viel Zink wie der Kontrollansatz (wo/wo).



**Abbildung 45: Detektion des intrazellulären Zinkgehalts in Jurkat Zellen unter verschiedenen Zinkbedingungen.**

Nachdem Jurkat Zellen für drei Tage in Kontrollmedium (wo) oder TPEN-haltigem Zinkmangelmedium (w) kultiviert wurden, wurde ein Mediumswechsel vorgenommen. Das Medium der Kontrollzellen wurde gegen frisches Kontrollmedium ausgetauscht (wo/wo) und das TPEN-behandelte Medium der Zinkmangelansätze wurde gegen Kontrollmedium (w/wo) oder gegen TPEN-behandeltes Medium (w/w) ausgetauscht, worauf eine 1-stündige Inkubation folgte. Anschließend wurde der intrazelluläre Zinkgehalt mittels FluoZin-3 AM (A, n = 4) und Zinpyr-1 (B, n = 3) am Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test bestimmt (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

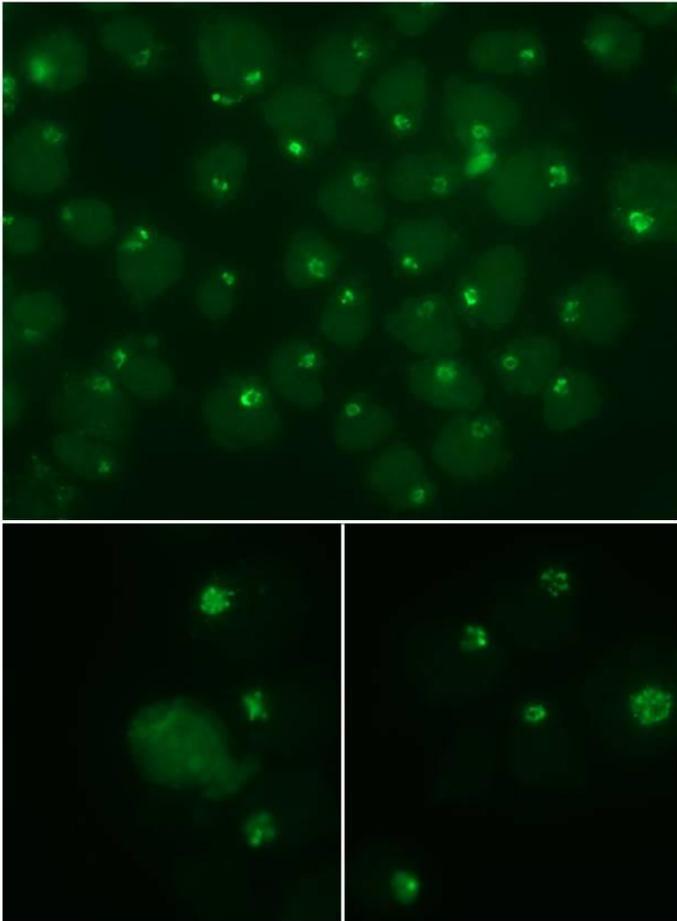
Die Ergebnisse, die durch die Verwendung der zwei unterschiedlichen Zinksonden erhalten wurden, lassen darauf schließen, dass Zink in verschiedenen Kompartimenten innerhalb der Jurkat Zelle vorliegt. Um Aufschluss über die genauere intrazelluläre Lokalisation des Zinks in Jurkat Zellen zu erhalten, wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Die Detektion mit FluoZin-3 AM war dabei besonders schwierig, da diese Sonde sehr sensitiv ist und schnell ausbleicht. Unter Verwendung von FluoZin-3 AM war eine Lokalisation von Zink (grün) in vesikulären Strukturen zu erkennen, die nicht auf einen bestimmten Teil der Zelle beschränkt war (Abb. 46).



**Abbildung 46: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Jurkat Zellen, die mit FluoZin-3 AM behandelt wurden.**

Um die intrazelluläre Lokalisation des Zinks (grün) innerhalb von Jurkat Zellen herauszufinden, wurden die Zellen mit FluoZin-3 AM gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop mit 630-facher Vergrößerung (in Öl) analysiert. Repräsentativ für  $n = 1$  von  $n = 5$  unabhängigen Versuchen.

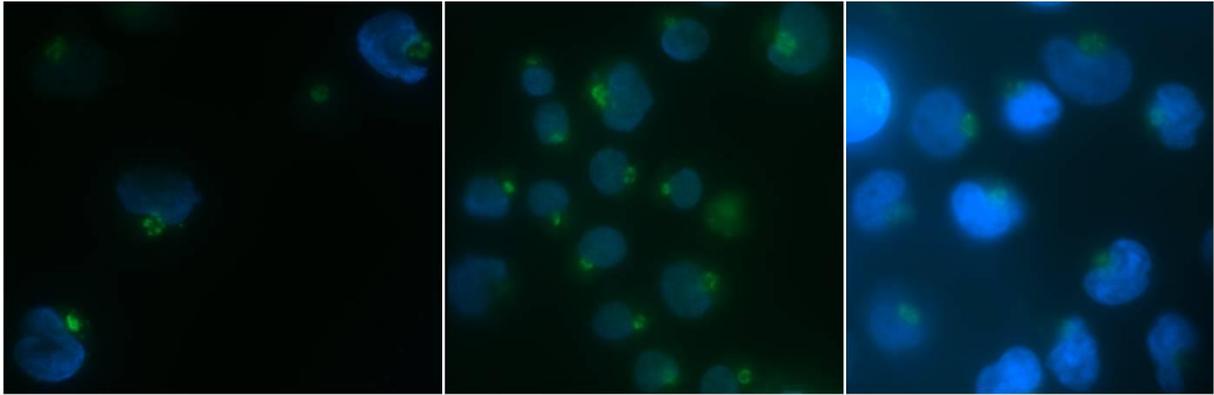
Im Gegensatz dazu ergab die Verwendung von Zinpyr-1 (grün) eine Lokalisation von Zink, die sich v.a. auf einen Zellpol beschränkte und vesikulär angeordnet war (Abb. 47).



**Abbildung 47: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des intrazellulären Zinks mit Zinpyr-1.**

Jurkat Zellen wurden mit Zinpyr-1 (grün) angefärbt und am Fluoreszenzmikroskop mit 630-facher Vergrößerung (in Öl) optisch dargestellt und untersucht. Repräsentativ für  $n=1$  von  $n=5$  unabhängigen Versuchen.

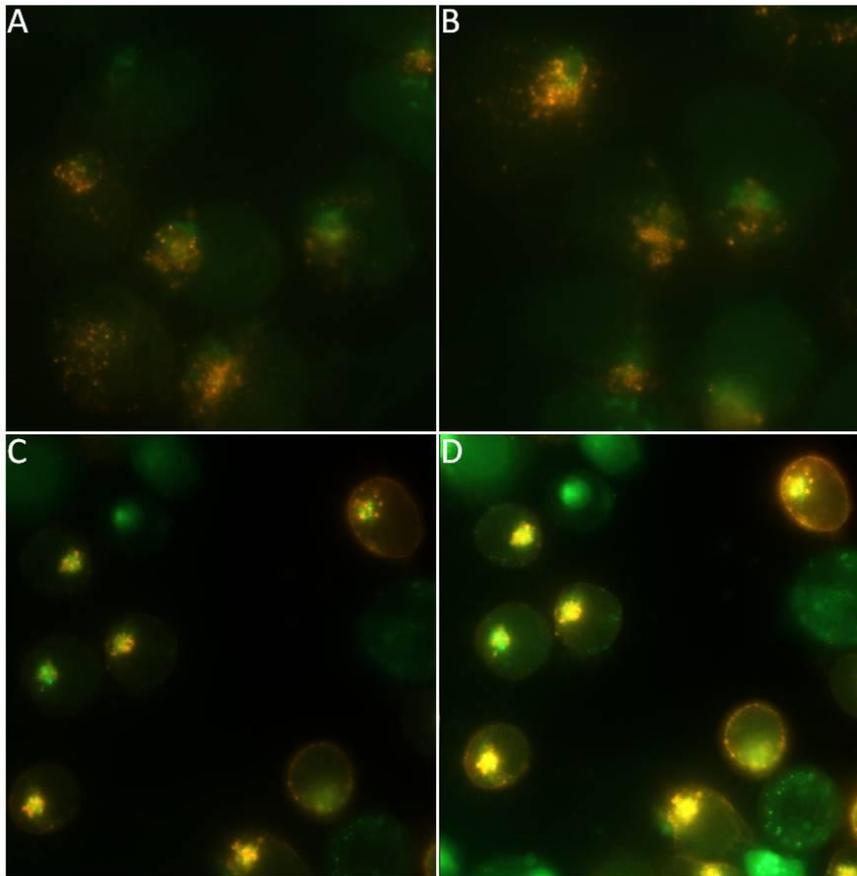
Um herauszufinden, ob das Zink bei der Färbung mit Zinpyr-1 im Cytosol oder im Zellkern lokalisiert war, wurde neben Zink (grün) der Zellkern mit Hoechst (blau) angefärbt (Abb. 48). Diese Färbung lässt die Vermutung zu, dass das Zink nicht im Zellkern, sondern im Cytosol vorliegt.



**Abbildung 48: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des intrazellulären Zinks mit Zinpyr-1 und Zellkernfärbung mit Hoechst.**

Jurkat Zellen wurden mit Zinpyr-1 (grün) und Hoechst (blau) angefärbt und mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie mit 630-facher Vergrößerung (in Öl) sichtbar gemacht. Repräsentativ für  $n = 1$  von  $n = 2$  unabhängigen Versuchen.

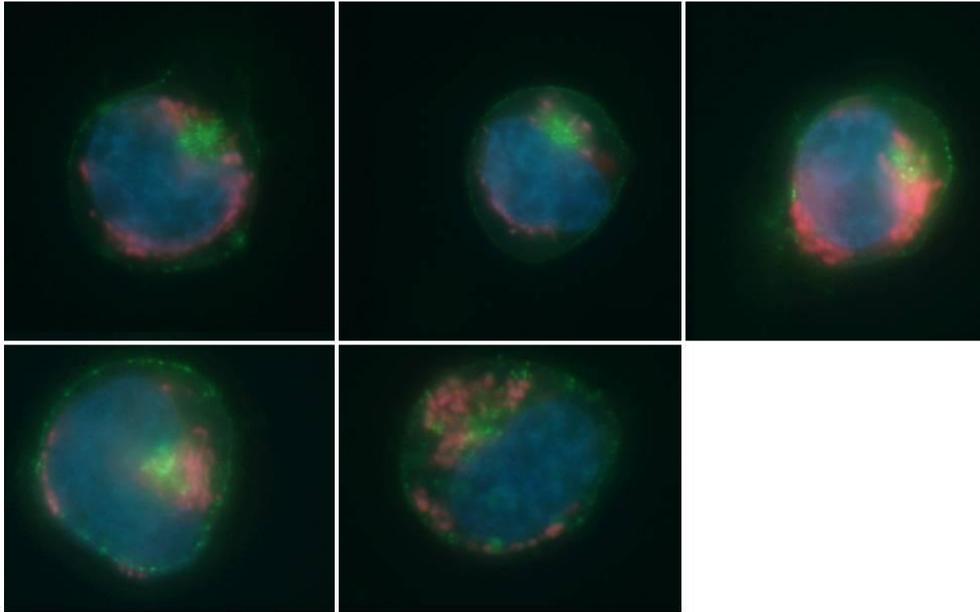
In einem nächsten Schritt wurde neben Zink der CD3-Rezeptor angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abb. 49). Interessanterweise schien es, als ob das Zink mit dem CD3-Rezeptor kolokalisierte. Es wurden zwei verschiedene CD3-Klone zur Visualisierung des Rezeptors verwendet, und zwar der Klon HIT3a (Abb. 49 A, B) sowie der Klon UCHT1 (Abb. 49 C, D). Wie in Abb. 49 gut zu erkennen ist, kommt es durch die Verwendung der zwei unterschiedlichen Klone zur Bindung verschiedener Epitope des CD3-Rezeptors auf der T-Zelle.



**Abbildung 49: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des intrazellulären Zinks mit Zinpyr-1 und des CD3-Rezeptors.**

Jurkat Zellen wurden mit einem CD3-PE konjugierten Antikörper (rot) Klon HIT3a (A, B) bzw. Klon UCHT1 (C, D) sowie Zinpyr-1 (grün) zur Färbung des intrazellulären Zinks behandelt. Anschließend erfolgte eine Auswertung mithilfe des Fluoreszenzmikroskops bei 630-facher Vergrößerung (in Öl). Repräsentativ für  $n = 1$  von  $n = 5$  (A, B) bzw. von  $n = 1$  (C, D) unabhängigen Versuchen.

Bei dieser möglichen Kolokalisation von CD3 und Zink konnte zunächst nicht ausgeschlossen werden, ob das Zink durch den Zellkern in die Nähe der Plasmamembran gedrängt wurde. Daher wurden in einem nächsten Versuch der Zellkern mit Hoechst (blau), das ER (rot) und der CD3-Rezeptor (grün) angefärbt (Abb. 50). Es zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung des ER innerhalb der Zelle und neben einer konzentrierten CD3-Expression zeigte sich darüber hinaus eine gleichmäßige CD3-Expression auf der Zellmembran. Damit kann ausgeschlossen werden, dass Zink durch einen das Cytoplasma ausfüllenden Zellkern an die Zellmembran gedrängt wird.



**Abbildung 50: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Jurkat Zellen, deren ER, Zellkern und CD3-Rezeptor mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden.**

Jurkat Zellen wurden mit ER-ID *Red Dye* (rot) zur Visualisierung des ER, mit Hoechst (blau) zur Färbung des Zellkerns und mit einem CD3-FITC konjugierten Antikörper (Klon UCHT1, grün) behandelt. Die Auswertung erfolgte mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops bei 630-facher Vergrößerung (in Öl, n = 1).

## 5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss eines Zinkmangels auf die IL-2-Produktion in T-Zellen genauer untersucht. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, die zu einer verringerten IL-2-Synthese unter Zinkmangel führen, sind noch nicht völlig entschlüsselt. Daher war das Ziel dieser Arbeit, eine molekulare Verbindung zu identifizieren, die die verringerte IL-2-Synthese unter Zinkmangel erklärt.

Zunächst musste ein geeignetes *in vitro*-Modell etabliert werden, in dem der Einfluss eines Zinkmangels auf die IL-2-Produktion untersucht werden konnte. Aus der Literatur war bereits bekannt, dass die murine EL-4 T-Zelllinie hierfür geeignet war und eine Stimulation mit IL-1 $\beta$  eine starke IL-2-Expression induzierte (37). Mit dem Ziel, eine adäquate humane T-Zelllinie zu identifizieren, wurden die humanen T-Zelllinien HuT-78 sowie Jurkat untersucht. Allerdings erwies sich eine IL-1 $\beta$ -Stimulation der humanen T-Zelllinien als nicht geeignet, um die IL-2-Expression zu induzieren. Vielmehr ergab eine IL-2-Zeitkinetik eine starke Induktion der IL-2-Produktion in den untersuchten Zelllinien EL-4, HuT-78 und Jurkat mittels PMA/Cal-Stimulation. Nach erfolgter PMA/Cal-Stimulation von HuT-78 sowie Jurkat Zellen, die sich in Medien mit unterschiedlichen Zinkgehalten befanden, war außerdem eine verringerte IL-2-Produktion in zinkdefizienten Zellen zu beobachten. Somit erschien die weitere Verwendung von humanen T-Zelllinien im Rahmen dieser Arbeit sinnvoll. Die differenzielle Produktion von IL-2 war sowohl in einem kurzzeitigen Zinkmangelmodell, in dem die Zellen für drei Tage in TPEN-behandeltem Medium inkubiert wurden, zu sehen als auch in einem langzeitigen Zinkmangelmodell, in dem die Zellen für drei Wochen in Chelex-behandeltem Medium inkubiert wurden.

Ein Zusammenhang zwischen einem Zinkmangel und einer verringerten IL-2-Produktion in T-Zellen wurde bereits in den späten 1980er Jahren beschrieben (34). Eine verringerte IL-2-Produktion aufgrund eines Zinkmangels beeinträchtigt Funktionen des Immunsystems, was wiederum mit einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen assoziiert wurde (28, 33). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein intrazellulärer Zinkmangel in HuT-78 und Jurkat Zellen nachgewiesen, die für Analysen eines kurzzeitigen Zinkmangels oder für Analysen eines langzeitigen Zinkmangels verwendet wurden. Bei der Behandlung des Mediums mit Chelex ist die pH-Wert-Einstellung auf 7,4 genauso wichtig wie das Recyceln der Chelex-Kügelchen, bevor das Medium für Versuche verwendet werden kann. In Monozyten,

die in nicht-recyceltem Chelexmedium inkubiert wurden, war eine verstärkte Zytokinproduktion zu beobachten, die nicht auf einen Zinkmangel zurückgeführt werden konnte (60). Um eine solche unspezifische Reaktion zu vermeiden, ist das Recyclen der Chelex-Kügelchen essenziell.

Nachdem Jurkat Zellen für drei Wochen unter Zinkmangel kultiviert wurden, wiesen diese eine veränderte Zinktransporter-Expression auf. Diese veränderte Expression resultierte vermutlich daraus, dass die Zellen versuchten, sich an die geringere Menge an verfügbarem Zink anzupassen. Es sind bislang 14 Zip-Importer (Zip1-Zip14) und 10 ZnT-Exporter (ZnT1-ZnT10) beschrieben, die die Regulation der Zinkhomöostase beeinflussen (70, 71). Durch eine Hochregulation der Zinkimporter in den Jurkat Zellen sollte vermutlich sichergestellt werden, dass möglichst viel Zink aus der Umgebung in die Zelle aufgenommen werden konnte. Durch das Herunterregulieren der Zinkexporter sollte dagegen ein Verlust des intrazellulären Zinks vermieden werden. Die Expression der ZnT1-, ZnT3- sowie ZnT8-Zinkexporter war in Jurkat Zellen signifikant verringert. Der ZnT1-Transporter wird ubiquitär in der Plasmamembran exprimiert, v.a. von Leukozyten, wodurch der Zinkexport in den Extrazellularraum gewährleistet wird (72). ZnT3 wird ebenfalls in Leukozyten exprimiert. Abgesehen davon ist eine ZnT3-Expression im Pankreas, Hoden und Gehirn beschrieben. Im Gegensatz zu ZnT1 findet sich der ZnT3-Transporter insbesondere in synaptischen Vesikeln von Neuronen (72, 73). Durch die signifikant veränderte ZnT3-Expression in Jurkat Zellen könnte daher ebenfalls eine Lokalisation des Transporters in cytosolischen Vesikeln vermutet werden. In CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden bereits sog. Zinkosomen beschrieben, in denen es vermutlich zu einer Ansammlung von Zink kommt und die Ähnlichkeiten mit vesikulären Strukturen aufweisen (74). Daneben könnte es eine ähnliche intrazelluläre Lokalisation für den ZnT8-Transporter in T-Zellen geben, der den dritten, in Jurkat differenziell exprimierten ZnT-Transporter darstellt.

Bislang wurde ZnT8 in sekretorischen Vesikeln von Leukozyten lokalisiert. Diese Lokalisation scheint allerdings nicht auf Leukozyten limitiert zu sein, da eine Expression auch in anderen Geweben beschrieben wurde. ZnT8 ist u.a. an der Bildung von Zink/Insulin-Kristallen beteiligt und repräsentiert das Haupt-Autoantigen in der Entwicklung des T1D (72, 73). Im Gegensatz zu den ZnT-Transportern war die Expression der Zip-Transporter unter Zinkmangel, wie zu erwarten, insgesamt erhöht. Die Expression von Zip10 war dabei signifikant erhöht. Zip10 wird in der

Plasmamembran von Leukozyten exprimiert und wurde bislang v.a. in humanen B- sowie murinen T-Zellen gefunden (37, 75). Eine differenzielle Regulation der Zinktransporter in Abhängigkeit des verfügbaren Zinks ist essenziell, um sicherzustellen, dass die intrazellulären zinkabhängigen Signalwege adäquat ablaufen können. Wird ein Zinkmangel induziert, wie im Rahmen dieser Arbeit, wird die Expression der Transporter verändert, um weiterhin eine optimale Zinkzufuhr zu gewährleisten. Ist der Mangel an Zink zu groß, kann eine optimale Funktion der Zelle allerdings nicht mehr gewährleistet werden, da der Zinkverlust nicht ausgeglichen werden kann.

Unter Verwendung der beiden Fluoreszenzsonden FluoZin-3 AM sowie Zinpyr-1 wurden in Jurkat Zellen offensichtlich verschiedene zinkhaltige Kompartimente intrazellulär gefärbt. Mithilfe von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen gelang die Visualisierung des intrazellulären Zinks innerhalb von zinkadäquaten Jurkat Zellen und bestätigte eine unterschiedliche Lokalisation des Zinks in Abhängigkeit von der verwendeten Sonde. Insbesondere mithilfe der Zinpyr-1-Färbung war eine Lokalisation von Zink in vesikulären Strukturen zu erkennen, die sich auf einen Zellpol beschränkte. Im Gegensatz dazu kam es unter Verwendung der FluoZin-3 AM-Sonde zu einer Färbung von Zink in vesikulären Strukturen, die sich auf das gesamte Cytosol verteilten. Außerdem war eine mögliche Kolo-kalisation des mit Zinpyr-1 gefärbten Zinks mit dem CD3-Rezeptor zu beobachten. Es ist bereits bekannt, dass der TCR-Signalweg durch Zink beeinflusst wird. Im Detail ist beschrieben, dass Zink die Rekrutierung der Tyrosinkinase Lck an den TCR-Komplex induziert sowie die Autophosphorylierung der Lck aktiviert. Im Weiteren dephosphorylieren Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) verschiedene Phosphotyrosinmotive im TCR-Signalweg. Neben der Lck-Aktivierung vermittelt Zink die Inhibition von PTPs, was eine weitere mögliche Regulation des TCR-Signalwegs durch Zink darstellt (76).

Weiterhin ist bekannt, dass nach T-Zell-Aktivierung eine immunologische Synapse (IS) ausgebildet wird, was ein wichtiges Merkmal des adaptiven Immunsystems darstellt. Die T-Zell-Aktivierung erfolgt an sog. Mikroclustern (MC) am TCR, in denen sich TCRs und Signalmoleküle vor Ausbildung der IS zusammenfinden. Jeder TCR-MC-Komplex ist dabei zeitweise durch eine Ringstruktur eingegrenzt, die in der frühen Phase der Zellaktivierung aus Integrinen und fokalen Adhäsionsmolekülen, wie z.B. Paxillin sowie Pyk2, besteht. Eine Störung des Mikroadhäsionsrings wurde

mit einer beeinträchtigten Ausbildung von TCR-MC-Komplexen assoziiert und resultierte in einer beeinträchtigten Signalweiterleitung sowie beeinträchtigten Funktionen innerhalb der Zelle, wie z.B. in einer verminderten IL-2-Produktion. Dies macht die Struktur, die einer Synapse ähnelt, zu einer wichtigen Struktur in der anfänglichen T-Zell-Aktivierung (77).

Eine mögliche Lokalisation von Zink in der Nähe des CD3-Rezeptors könnte eine schnelle Signalweiterleitung sicherstellen. Wird die T-Zelle aktiviert, kommt es zur Ausbildung eines TCR-MC-Komplexes, wodurch die intrazelluläre Signalkaskade aktiviert wird. Die Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Zink, CD3, Paxillin sowie Pyk2 stellt daher einen interessanten Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen dar. Um herauszufinden, ob die Expressionen von CD3 sowie des Lymphozyten-Aktivierungsmarkers CD69 durch einen Zinkmangel beeinflusst werden, wurden deren Expression nach ein-, zwei- und dreiwöchigem Zinkmangel untersucht. Die Expression der CD-Marker blieb sowohl über die Zeit als auch unter verschiedenen Zinkbedingungen unverändert, weshalb eine Regulation durch Zink ausgeschlossen werden kann.

Ein interessanter Transkriptionsfaktor, der an der Regulation von zinkabhängigen Prozessen beteiligt ist, ist der Transkriptionsfaktor MTF-1. MTF-1 bindet an MRE-Sequenzen in Zielgenen mit der Sequenz 5'-TGCRNC-3' und trägt damit zur Regulation der Genexpression bei (29). Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine MRE-Bindungsstelle im *upstream*-Bereich des TSS von IL-2 (NG\_016779) mit der Nukleotidsequenz 5'-TGCACTG-3' identifiziert werden. Diese Sequenz weist Ähnlichkeiten zu der CRE-Halbseite „5'-TGAC“ auf, welche ebenfalls innerhalb des IL-2-Promotorbereichs an Position -180 des TSS lokalisiert ist (56). Um herauszufinden, ob eine verringerte MTF-1-Bindung an den IL-2-Promotor zu einer verringerten IL-2-Transkription führt, wurde die Translation zum MTF-1-Protein durch Transfektion der Zellen mit siRNA stillgelegt. Anschließende qRT-PCR-Analysen bestätigten verringerte Mengen an MTF-1-RNA in den untersuchten Jurkat Zellen. Die IL-2-Produktion auf Proteinebene war von der Stilllegung allerdings nicht betroffen. Daher kann ein Zusammenhang zwischen einer veränderten IL-2-Produktion durch eine verringerte MTF-1-Bindung an den IL-2-Promotor unter Zinkmangel ausgeschlossen werden.

Neben den erwähnten MRE- und CRE-Zielsequenzen beinhaltet der IL-2-Promotor weitere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die für die Transkription des *IL2*-

Gens wichtig sind, wie z.B. eine NF- $\kappa$ B-Bindungsstelle. In zinkdefizienten HuT-78 Zellen wurde eine verringerte Aktivierung von NF- $\kappa$ B mit einer reduzierten IL-2-Expression assoziiert (78). Im Gegensatz dazu resultierte eine Zinksupplementation von zinkdefizienten murinen T-Zellen in einer erhöhten Phosphorylierung der *mitogen-associated protein kinase* (MAPK) p38 sowie der p65-Untereinheit von NF- $\kappa$ B, was wiederum mit einer erhöhten IL-2-Produktion einherging (37). Im Rahmen dieser Arbeit war allerdings nur ein leichter Rückgang in der p65-Phosphorylierung unter Zinkmangel zu beobachten, der nicht signifikant war. Aus diesem Grund müssen weitere Mechanismen an der Genregulation von *IL2* unter Zinkmangel beteiligt sein.

Eine weitere Molekülgruppe, die an der Regulation der Genexpression auf post-transkriptioneller Ebene beteiligt ist, sind miRNAs. Wie bereits beschrieben, sind miRNAs kleine, nicht-kodierende RNA-Sequenzen, die die Translation von mRNA inhibieren, indem sie an die 3'-UTR des Zielgens binden (79). Der miR-146a werden regulierende Eigenschaften in der adaptiven Immunantwort zugeschrieben. Nach Stimulation des TCR wird die Expression der miR-146a induziert, was bspw. zu einer beeinträchtigten AP-1-Aktivität sowie einer beeinträchtigten IL-2-Produktion führte (80). Aufgrund dieser IL-2-regulierenden Eigenschaften wurde die Hypothese aufgestellt, dass die miR-146a-Expression unter Zinkmangel verstärkt sein könnte. Dies wiederum würde eine weitere Erklärung für eine verringerte IL-2-Produktion unter Zinkmangel liefern.

Ein solcher Zusammenhang konnte im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht bestätigt werden. Im Gegenteil kam es zu einer signifikanten Verringerung der miR-146a-Expression nach 23-tägigem Zinkmangel in Jurkat Zellen. Interessanterweise konnte in bislang unveröffentlichten Arbeiten von Kulik *et al.* an diesem Institut eine T-Zell-Differenzierung in Treg-Zellen unter Zinkmangel beobachtet werden. Dieses Ergebnis war zunächst überraschend, da bislang eine Induktion von Treg-Zellen nach Zinksupplementation beschrieben wurde, die mit einer verbesserten Immunantwort einherging (81-84). Es bestand die Annahme, dass es unter Zinkmangel zu einer verringerten bzw. inhibierten Differenzierung in Treg-Zellen und damit beeinträchtigten Funktionen kommt. Eine Erklärung dafür, dass es trotz Zinkmangel zu einer Differenzierung in Treg-Zellen kam, die aber nicht funktionsfähig sind, könnte die im Rahmen dieser Arbeit gemachte Beobachtung einer verringerten Expression von miR-146a sein. In einem Mausmodell wurde ein Zusammenhang

zwischen Treg-Zellen und der Expression von miR-146a beschrieben, welcher für die Suppressorfunktionen der Treg-Zellen wichtig zu sein scheint. Ein Mangel an miR-146a in Treg-Zellen führte in den Untersuchungen von Lu *et al.* zu einem Zusammenbruch der immunologischen Toleranz, was sich in schwerwiegenden IFN- $\gamma$ -abhängigen Läsionen verschiedener Organe manifestierte (85). Diese miRNA scheint daher besonders wichtig für die Fähigkeit von Treg-Zellen zu sein, IFN- $\gamma$ -vermittelte pathologische Th1-Antworten und Entzündungen zu regulieren.

Untersuchungen von Bao *et al.* legen die Vermutung nahe, dass die Veränderungen in der IL-2-Expression aus einer veränderten Genexpression, d.h. prä-transkriptionell, resultierten (86). Diese Hypothese kann durch die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse unterstützt werden. CREM $\alpha$  scheint durch eine erhöhte Produktion unter Zinkmangel zu einer verringerten Transkription des *IL2*-Gens zu führen. Ein hoher Gehalt an CREM $\alpha$  geht mit einer gesteigerten Bindung an die -180-CRE-Stelle innerhalb des IL-2-Promotors einher und führt zu einer verminderten Transkription des *IL2*-Gens (87, 88).

Nach kurzzeitiger sowie langzeitiger Inkubation von T-Zellen unter Zinkmangel war eine verstärkte CREM $\alpha$ -Produktion *in vitro* zu beobachten, was mit einer verringerten IL-2-Expression einherging. Darüber hinaus konnte ein Zusammenhang zwischen Zink, IL-2 und CREM $\alpha$  in einem Versuch mit Schweinen *in vivo* nachgewiesen werden. Die Menge an CREM $\alpha$  in PBMC von Zn2500-Schweinen war im Vergleich zu Schweinen ohne zusätzlicher Zinksupplementation (Zn0) bzw. mit 100 ppm Zinksupplementation (Zn100) verringert. Diese verringerte Menge an CREM $\alpha$  ging mit einer erhöhten IL-2-Produktion einher. Außerdem umfasste der Serumzinkgehalt in Zn2500-Schweinen  $107,11 \pm 14,8 \mu\text{g/dL}$  und ähnelt damit dem physiologischen Zinkgehalt im Serum von Menschen, der im Bereich zwischen  $83\text{-}102 \mu\text{g/dL}$  Zink liegt (89-91).

Interessanterweise wiesen Genomanalysen aus Schweinen, Mäusen und Menschen mehr Ähnlichkeiten zwischen den Genomen aus Schweinen und Menschen auf, als zwischen Menschen und Mäusen. Der Vergleich von immunologisch relevanten Genen ergab dabei 80 %-ige Ähnlichkeiten zwischen Menschen und Schweinen (7). Die Verwendung eines Schweinmodells scheint daher eine Verbesserung für die Beantwortung immunologischer Fragestellungen im Menschen zu sein und erlaubt eine bessere Übertragung der Ergebnisse auf das humane System.

Die Methylierung spielt als epigenetischer Regulator eine wichtige Rolle in der IL-2-Produktion. Eine differenzielle Methylierung im IL-2-Promotorbereich scheint für die Regulation der IL-2-Transkription wichtig zu sein (20, 92, 93). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Methylierungsmuster von Jurkat-DNA nach langzeitigem, d.h. dreiwöchigem, Zinkmangel analysiert. Die Methylierung, die das *IL2*-Gen betraf, zeigte dabei keine signifikanten Veränderungen zwischen Kontrollzellen sowie zinkdefizienten Zellen. Damit kann eine veränderte Methylierung im *IL2*-Gen als Ursache für eine verringerte IL-2-Transkription ausgeschlossen werden. Neben der Methylierung innerhalb des *IL2*-Gens wurden nach Durchführung des Limma t-Tests sechs potenzielle Zielgene identifiziert, die signifikante Unterschiede in ihrem Methylierungsmuster aufwiesen. Die Analyse der Transkripte auf RNA-Ebene zeigte allerdings keine signifikanten Unterschiede, weshalb die Transkription dieser Gene durch differenzielle Methylierungsmuster offensichtlich nicht verändert wurde. Allerdings könnte es in Hinblick auf das *UBE2K*-Gen auf Proteinebene einen Einfluss von Zink geben, da die Fluoreszenzintensität von HLA-ABC unter Zinkmangel leicht erniedrigt vorlag. Weil der Fokus im Rahmen dieser Arbeit auf die differenzielle IL-2-Expression gelegt wurde, wurde dieses Ergebnis nicht weiter verfolgt und stellt einen interessanten Ausgangspunkt für weitere Analysen dar.

Interessanterweise ist der Serumzinkgehalt in Patienten, die an SLE erkrankt waren, erniedrigt im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (40-42). Dies lässt erneut einen möglichen Rückschluss auf eine Verbindung zwischen Zink und einer veränderten CREM $\alpha$ - sowie IL-2-Expression in Autoimmunerkrankungen zu. Die CREM $\alpha$ -Expression war bereits in unstimulierten Zellen unter kurzzeitigem Zinkmangel erhöht. Dies deutet darauf hin, dass CREM $\alpha$  in unstimulierten, zinkdefizienten Zellen an den IL-2-Promotor bindet und eine anschließende Stimulation der Zellen zu einer geringeren Induktion des *IL2*-Gens führt.

Warum es unter Zinkmangel zu einer erhöhten CREM $\alpha$ -Expression kam, war allerdings noch nicht geklärt. Eine erhöhte Enzymaktivität der Serin/Threonin-Phosphatase PP2A führte in T-Zellen von SLE-Patienten zu einer verstärkten Dephosphorylierung des Serinrestes 59 der SP-1. Dadurch kam es zu einer erhöhten SP-1-Bindung an den CREM-Promotor, gefolgt von einer verstärkten CREM $\alpha$ -Expression (65, 94). Eine verstärkte PP2A-Aktivität unter Zinkmangel könnte damit die beobachtete erhöhte CREM $\alpha$ -Transkription erklären. In Neuronen wurde bereits eine Inhibition der PP2A durch Zink beschrieben (95). Darüber hinaus konnte eine

direkte Inhibition des Enzyms durch Zink beobachtet werden (96). Allerdings wurde von Xiong *et al.* kein  $IC_{50}$ -Wert bestimmt, und die Ergebnisse wurden nicht auf frei verfügbares Zink normalisiert. Im Gegensatz dazu kam es unter Zinkmangel zu einer verstärkten PP2A-Aktivität in neuronalen Zellen, was wiederum Phosphorylierungen durch ERK1/2 beeinflusste (97). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Phosphataseaktivität in Jurkat Zellysaten nach dreiwöchigem Zinkmangel überprüft. Als Substrat wurde hierfür pNPP verwendet, was häufig als geeignetes Substrat für die Testung alkalischer Phosphatasen verwendet wird. Es zeigte sich allerdings nur eine leicht verstärkte PP2A-Aktivität unter Zinkmangel, die nicht signifikant war. Nach weiterer Recherche stellte sich heraus, dass pNPP nicht das bevorzugte Substrat für PP2A ist, obwohl es in der Literatur zur Überprüfung der Aktivität beschrieben wird (98-100). pNPP ähnelt in seinem molekularen Aufbau v.a. dem Tyrosin. Da die PP2A aber v.a. Phosphate an Serin/Threonin-Resten abspaltet, könnte es sein, dass pNPP als Substrat nicht spezifisch genug ist. Aus diesem Grund wurde ein neues Substrat verwendet, und zwar das Peptid mit der Sequenz RRApTVA, welches an einem Threoninrest phosphoryliert vorliegt (101). Die Verwendung des neuen Substrats wies allerdings ebenfalls keinen Einfluss von Zink auf die Phosphataseaktivität auf. Mithilfe der bislang verwendeten Enzymtests wird die Aktivität aller alkalischen Phosphatasen, die in den Zellysaten enthalten sind, gemessen. Daher wurde außerdem der Zinkeinfluss auf das aufgereinigte PP2A-Enzym untersucht. Es zeigte sich eine zinkabhängige Inhibition der PP2A. Bei Betrachtung der PP2A-Aktivität bei Anwesenheit eines physiologischen Substrats konnte eine  $IC_{50}$  von 20,53 nM freiem Zink bestimmt werden. Dieser Wert übersteigt den intrazellulären Zinkgehalt in Jurkat Zellen, der mittels Fluoreszenzsonden gemessen wurde. Dies könnte durch die Anwesenheit von DTT im Reaktionspuffer bedingt sein, wodurch das zugegebene Zink oder die Fluoreszenzmessung bei Bestimmung der Zinkpufferkapazität beeinflusst werden könnte. Außerdem kann die Zinkkonzentration, je nach intrazellulärer Lokalisation, variieren und durchaus die Werte überschreiten, die mithilfe der Fluoreszenzsonden gemessen wurden, d.h. in einem Teil der Zelle kann die Zinkkonzentration höher sein als in einem anderen Zellteil bzw. Kompartiment. Insgesamt kann festgestellt werden, dass unter Zinkmangel die Aktivität der PP2A erhöht ist, was vermutlich zu einer verstärkten Dephosphorylierung von SP-1 und damit zu einer erhöhten CREM $\alpha$ -Expression führt.

Es blieb weiterhin die Frage offen, wie CREM $\alpha$  die verringerte IL-2-Produktion vermittelte. In der Literatur wurde beschrieben, dass die Bindung von CREM $\alpha$  an den IL-2-Promotor zu einer aktiven Rekrutierung der HDAC1 und damit einhergehend zu einer verstärkten Histon-Deacetylierung führte. In der Folge wurde die Zielgenexpression auf transkriptioneller Ebene gehemmt (102). Die Deacetylierung ist Bestandteil der Epigenetik, welche sich durch vererbare Veränderungen der Genexpression auszeichnet, die ohne Veränderungen der DNA-Sequenz entstehen. PTMs verändern Histone bspw. durch Acetylierung, Methylierung sowie Phosphorylierung. Dabei wird ein Histoncode gebildet, der von anderen Proteinen abgelesen werden kann und damit zur Regulation der Genexpression beiträgt (43). Transkriptionelle Aktivierung von Genen wird bspw. durch Acetylierung sichergestellt, was zu einer offenen Chromatinstruktur führt. Dies macht die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA möglich. Die Entfernung der Acetylgruppen ist gleichermaßen wichtig und wird durch HDACs sichergestellt. Dadurch wird ein kondensierter Zustand der DNA gefördert, was wiederum zu einer Inaktivierung der Gentranskription führt (53).

Wie bereits erwähnt, transportierte CREM $\alpha$  die HDAC1 an die -180-CRE-Stelle innerhalb des IL-2-Promotors in T-Zellen von SLE-Patienten, was zu einer verstärkten H3K18-Deacetylierung führte und damit die IL-2-Transkription inhibierte (103). Die zinkabhängige HDAC1 gehört zur Familie der Klasse I Enzyme und wurde darüber hinaus als essenzielles Enzym für die Bildung von Thymozyten und peripheren T-Zellen in Mäusen beschrieben (104, 105). Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die Expression der HDAC1 unter Zinkmangel erhöht war. Darüber hinaus konnte zum ersten Mal eine Inhibition der HDAC1-Aktivität durch Zink gezeigt werden. Durch die Zugabe von 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , was einer freien Zinkkonzentration von 102 nM entsprach, war eine fast vollständige Inhibition des Enzyms zu beobachten. Außerdem war es möglich, die halbmaximale inhibitorische Konzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) von Zink auf die HDAC1 zu bestimmen. Bei einer Konzentration von 0,26 nM freiem Zink wurde die HDAC1 zu 50 % inhibiert. Dieser Wert liegt im physiologischen Bereich und ist daher besonders interessant. Die gemessene intrazelluläre Zinkkonzentration in zinkadäquaten Jurkat Zellen mithilfe der Fluoreszenzsonde FluoZin-3 AM ergab eine Konzentration von  $0,22 \text{ nM} \pm 0,02 \text{ nM}$   $\text{Zn}^{2+}$ . Im Gegensatz dazu wurde unter Zinkmangel eine Konzentration von  $0,10 \text{ nM} \pm 0,05 \text{ nM}$   $\text{Zn}^{2+}$  gemessen.

Man kann also davon ausgehen, dass die HDAC1 unter zinkadäquaten Bedingungen durch Zink inhibiert wird. Je weniger Zink sich in der Zelle befindet, desto aktiver wird das Enzym und ist unter den hier simulierten Zinkmangelbedingungen aktiv. Die erhöhte HDAC1-Aktivität verstärkt wiederum die in dieser Arbeit beobachtete Deacetylierung von H3K9, was eine kondensierte Chromatinstruktur begünstigt und damit zu einer verringerten IL-2-Transkription führt. Veränderungen in der Acetylierung von H3K18, die in T-Zellen von SLE-Patienten beschrieben wurden, konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Eine Regulation durch eine differenzielle Acetylierung von H3K9 scheint in diesem Fall wahrscheinlicher.

In einer weiteren, aktuellen Studie wurde die HDAC1 mit der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) in Verbindung gebracht. EAE stellt eine Autoimmunerkrankung in Mäusen dar und repräsentiert ein Äquivalent in der Untersuchung der Multiplen Sklerose (MS). Nach einer T-Zell-spezifischen Deletion der HDAC1 im EAE-Mausmodell wurden die untersuchten Mäuse vor einer Entwicklung von EAE geschützt. Aus diesem Grund stellt die HDAC1 ein mögliches Zielenzym in der Behandlung von MS dar. Interessanterweise waren die CD4<sup>+</sup>, HDAC1-defizienten T-Zellen immer noch in der Lage, in Th17-Zellen zu differenzieren (106). Eine andere Studie von Rosenkranz *et al.* ergab, dass die Supplementation von Mäusen mit Zink einen positiven Einfluss auf die Entstehung von EAE hatte. In diesem Modell war der Anteil an Th17-Zellen durch Zink verringert und der Anteil an induzierbaren (i)Treg-Zellen erhöht (83). Betrachtet man diese beiden Studien im Zusammenhang mit der im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtung, dass die HDAC1 durch Zinkzugabe inhibiert wird, wird die Bedeutung eines adäquaten Zinkstatus, insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen, verdeutlicht. So könnte es einen Zusammenhang zwischen einer durch Zink inhibierten HDAC1 und dem positiven Einfluss auf einen verbesserten Immunstatus in EAE-Mäusen geben.

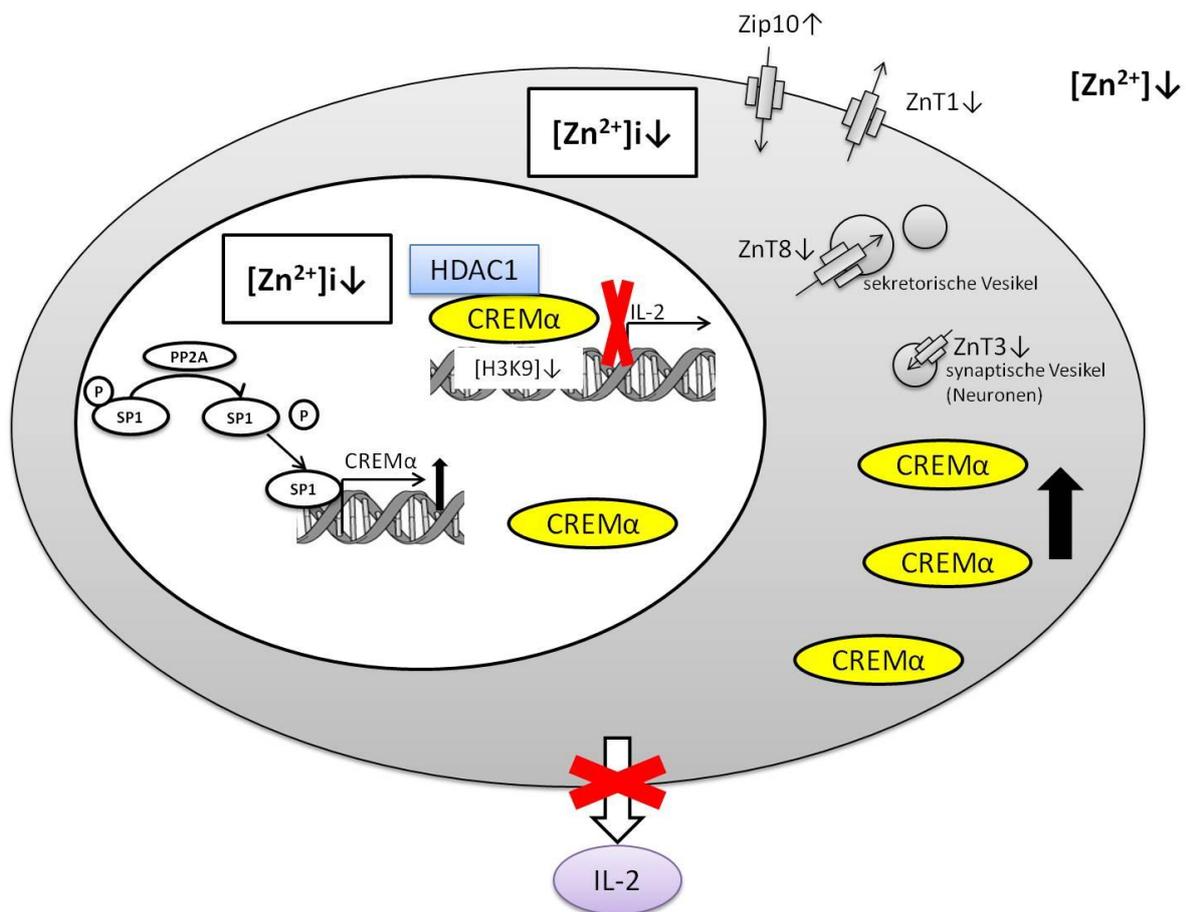
Für HDAC1-Inhibitoren wurde eine Vielzahl an positiven Eigenschaften bei unterschiedlichen Erkrankungen beschrieben, wie z.B. im Mausmodell der allergischen Rhinitis. Die Verwendung eines HDAC1-Inhibitors in der Studie von Wang *et al.* zeigte eine erhöhte H3K9-Acetylierung in der Nasenschleimhaut der untersuchten Mäuse, was wiederum mit einer erhöhten IL-2-Menge im Mausextrakt einherging (107). Diese Ergebnisse unterstützen ebenfalls die Hypothese, dass Zink einen direkten Einfluss auf die Enzymaktivität der HDAC1 besitzen könnte.

Ältere Menschen scheinen besonders anfällig gegenüber Infektionen zu sein. Diese Anfälligkeit könnte durch eine Mangelernährung bedingt sein, die zu einer verringerten Aufnahme von Vitaminen und Spurenelementen führt. Desweiteren besteht die Annahme, dass die Immunantwort mit zunehmendem Alter abnimmt, was wiederum die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Infektionen, Tumoren oder Autoimmunerkrankungen erhöht (108). Schätzungen zufolge geht man davon aus, dass fast 60 % der älteren Menschen in den USA unter einem Zinkmangel leiden (109). Zudem zeigte sich in dieser Population ein Einfluss von Zink auf die Zytokinproduktion sowie auf die Th1- und Th2-Populationen (110). Bei älteren Menschen mit einem leichten Zinkmangel wurde bspw. eine verringerte IL-2-Aktivität in Th-Zellen festgestellt (111). Th1-Zellen von Studienteilnehmern, die experimentell in einen Zinkmangel gebracht wurden, produzierten ebenfalls weniger IL-2, so dass dieser Zusammenhang nicht ausschließlich auf ältere Menschen begrenzt ist (36).

Neben diesem Zusammenhang eines Zinkmangels bei älteren Menschen und einer verringerten IL-2-Produktion ergaben Tierversuche einerseits eine erhöhte HDAC1-Aktivität in Lebern von alten Mäusen und andererseits eine verringerte H3K9-Acetylierung in Lebern von alten Ratten (112, 113). Verbindet man diese Ergebnisse mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit, könnte man die verringerte IL-2-Expression in älteren Menschen mit einer erhöhten Menge an CREM $\alpha$  unter Zinkmangel erklären. Dadurch kommt es zu einer verstärkten HDAC1-Rekrutierung an die IL-2-Promotorregion, was in der Folge zu einer verstärkten H3K9-Deacetylierung und damit zu einer verringerten IL-2-Transkription führt.

Eine Supplementation älterer Menschen mit Zink könnte daher vorteilhaft sein, um eine adäquate Immunantwort zu gewährleisten. Einen positiven Einfluss zeigte eine Zinksupplementation von älteren Menschen bereits in Hinblick auf die IL-6-Synthese, wobei es zu einer verringerten spontanen Zytokinproduktion kam (114). Eine Zinksupplementation könnte dabei nicht nur in älteren Menschen von Vorteil sein, sondern auch allgemein in Menschen, die einen leichten Zinkmangel aufweisen. Aus der Literatur geht hervor, dass die CREM $\alpha$ -Expression bislang insbesondere in Patienten untersucht wurde, die an SLE erkrankt waren. Auf Basis der hier erhaltenen Ergebnisse scheint es von besonderem Interesse zu sein, die Analyse von CREM $\alpha$  auf weitere Populationen auszuweiten, die anfällig für einen Zinkmangel sind, wie bspw. ältere Menschen oder auch Vegetarier.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Studie trägt zu einem besseren Verständnis der IL-2-Regulation unter Zinkmangel bei. Zum ersten Mal konnte mit dem Transkriptionsfaktor CREM $\alpha$  eine direkte molekulare Verbindung zwischen einem Zinkmangel in T-Zellen und einer verringerten IL-2-Produktion gezeigt werden. In Abb. 51 ist eine Zusammenfassung der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zur Regulation der IL-2-Produktion unter Zinkmangel dargestellt.



**Abbildung 51: Übersicht über die molekularen Mechanismen, die zu einer verringerten IL-2-Expression unter Zinkmangel in T-Zellen führen.**

Unter Zinkmangel kommt es durch eine verstärkte PP2A-Aktivität zu einer erhöhten CREM $\alpha$ -Expression, was wiederum eine verstärkte Rekrutierung der HDAC1 an den IL-2-Promotor zur Folge hat. Die HDAC1 ist unter Zinkmangel aktiver und führt zu einer verstärkten Deacetylierung von H3K9, was wiederum zu einer verringerten IL-2-Transkription führt. Die Zinktransporter ZnT1, ZnT3 sowie ZnT8 sind unter Zinkmangel verringert exprimiert, während der Zip10-Transporter eine verstärkte Expression aufweist.

## 6 Zusammenfassung

Ein Zinkmangel in T-Zellen hat eine verringerte IL-2-Produktion zur Folge. Die genauen molekularen Mechanismen hierzu sind noch weitestgehend unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal eine molekulare Verbindung zwischen einem Zinkmangel und einer verringerten IL-2-Produktion in T-Zellen identifiziert werden. Diese Verbindung wird durch den Transkriptionsfaktor CREM $\alpha$  präsentiert. Unter Zinkmangel kommt es zu einer verstärkten Expression von CREM $\alpha$  auf RNA- sowie auf Proteinebene. Ein Zusammenhang zwischen Zink, IL-2 und CREM $\alpha$  konnte im Rahmen dieser Arbeit sowohl *in vitro* also auch *in vivo* bestätigt werden. *In vivo* wurde eine erhöhte IL-2-Produktion mit einer verringerten CREM $\alpha$ -Produktion nach Zinksupplementation von Schweinen assoziiert. Es ist anzunehmen, dass ein erhöhter Gehalt an CREM $\alpha$  in T-Zellen, bedingt durch eine erhöhte PP2A-Aktivität, zu einer verstärkten Rekrutierung der HDAC1 führt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die HDAC1 durch Zink inhibiert wird. Unter Zinkmangel ist die HDAC1 aktiver, d.h. es kommt zu einer erhöhten Deacetylierung von Histonen, was zu einer stärker kondensierten DNA führt und damit zu einer verringerten Transkription. Die halbmaximale Inhibition der HDAC1 durch Zink konnte ebenfalls bestimmt werden und liegt bei 0,26 nM, was in etwa der Zinkmenge in zinkadäquaten Jurkat Zellen entspricht. Darüber hinaus kam es unter Zinkmangelbedingungen zu einer verstärkten Deacetylierung von H3K9.

Die Zinkhomöostase wird durch die Regulation von Zinktransportern sichergestellt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein signifikanter Anstieg in der Zip10-Expression nachgewiesen werden, während ZnT1, ZnT3 und ZnT8 signifikant herunterreguliert wurden. Eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors MTF-1 an der Regulation der IL-2-Expression kann ebenso wie eine differenzielle Methylierung des *IL2*-Gens unter Zinkmangel ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend konnte mit CREM $\alpha$  eine molekulare Verbindung zwischen Zink und einer beeinträchtigten IL-2-Produktion in T-Zellen gefunden werden. Durch die Erkenntnis, dass der Transkriptionsfaktor CREM $\alpha$  durch Zink beeinflusst wird, könnte es in Zukunft möglich sein, eine beeinträchtigte IL-2-Expression mittels Zinksupplementation positiv zu beeinflussen, um eine angemessene Immunantwort zu gewährleisten. Außerdem könnte der Einsatz von Zink als HDAC1-Inhibitor bei unterschiedlichen Erkrankungen eine Rolle spielen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. L. Rink, A. Kruse, H. Haase, *Immunologie für Einsteiger*. (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2012).
2. A. H. Sawalha, Epigenetics and T-cell immunity. *Autoimmunity* **41**, 245-252 (2008).
3. K. M. Murphy, *Janeway's Immunobiology*. (Garland Science, Taylor & Francis Group, London und New York, ed. 8th, 2012).
4. R. Medzhitov, Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **449**, 819-826 (2007).
5. K. H. Mair, C. Sedlak, T. Kaser, A. Pasternak, B. Levast, W. Gerner, A. Saalmuller, A. Summerfield, V. Gerdtz, H. L. Wilson, F. Meurens, The porcine innate immune system: an update. *Developmental and comparative immunology* **45**, 321-343 (2014).
6. M. Sinkora, J. E. Butler, The ontogeny of the porcine immune system. *Developmental and comparative immunology* **33**, 273-283 (2009).
7. H. D. Dawson, *A Comparative Assessment of the Pig, Mouse and Human Genomes; Structural and Functional Analysis of Genes Involved in Immunity and Inflammation in The Minipig in Biomedical Research*, P. A. McAnulty, A. D. Dayan, N.-C. Ganderup, K. L. Hastings, Eds. (CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, 2012), pp. 323-342.
8. J. Parkin, B. Cohen, An overview of the immune system. *Lancet (London, England)* **357**, 1777-1789 (2001).
9. W. Liao, J. X. Lin, W. J. Leonard, Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity* **38**, 13-25 (2013).
10. B. E. Russ, J. E. Prier, S. Rao, S. J. Turner, T cell immunity as a tool for studying epigenetic regulation of cellular differentiation. *Frontiers in genetics* **4**, 218 (2013).
11. M. N. Pham, M. G. von Herrath, J. L. Vela, Antigen-Specific Regulatory T Cells and Low Dose of IL-2 in Treatment of Type 1 Diabetes. *Frontiers in immunology* **6**, 651 (2015).
12. D. A. Morgan, F. W. Ruscetti, R. Gallo, Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science (New York, N.Y.)* **193**, 1007-1008 (1976).

13. H. P. Kim, J. Imbert, W. J. Leonard, Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine & growth factor reviews* **17**, 349-366 (2006).
14. A. L. Bayer, A. Pugliese, T. R. Malek, The IL-2/IL-2R system: from basic science to therapeutic applications to enhance immune regulation. *Immunologic research* **57**, 197-209 (2013).
15. E. M. Shevach, Regulatory T cells in autoimmunity\*. *Annual review of immunology* **18**, 423-449 (2000).
16. J. P. Siegel, M. Sharon, P. L. Smith, W. J. Leonard, The IL-2 receptor beta chain (p70): role in mediating signals for LAK, NK, and proliferative activities. *Science (New York, N.Y.)* **238**, 75-78 (1987).
17. M. C. Mingari, F. Gerosa, G. Carra, R. S. Accolla, A. Moretta, R. H. Zubler, T. A. Waldmann, L. Moretta, Human interleukin-2 promotes proliferation of activated B cells via surface receptors similar to those of activated T cells. *Nature* **312**, 641-643 (1984).
18. W. Liao, J. X. Lin, W. J. Leonard, IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Current opinion in immunology* **23**, 598-604 (2011).
19. D. Chen, E. V. Rothenberg, Molecular basis for developmental changes in interleukin-2 gene inducibility. *Molecular and cellular biology* **13**, 228-237 (1993).
20. S. B. Ward, G. Hernandez-Hoyos, F. Chen, M. Waterman, R. Reeves, E. V. Rothenberg, Chromatin remodeling of the interleukin-2 gene: distinct alterations in the proximal versus distal enhancer regions. *Nucleic acids research* **26**, 2923-2934 (1998).
21. P. A. Garrity, D. Chen, E. V. Rothenberg, B. J. Wold, Interleukin-2 transcription is regulated in vivo at the level of coordinated binding of both constitutive and regulated factors. *Molecular and cellular biology* **14**, 2159-2169 (1994).
22. K. Tenbrock, G. C. Tsokos, Transcriptional regulation of interleukin 2 in SLE T cells. *International reviews of immunology* **23**, 333-345 (2004).
23. J. Jansen, W. Karges, L. Rink, Zinc and diabetes--clinical links and molecular mechanisms. *The Journal of nutritional biochemistry* **20**, 399-417 (2009).
24. B. L. Vallee, K. H. Falchuk, The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological reviews* **73**, 79-118 (1993).

25. N. Wellinghausen, H. Kirchner, L. Rink, The immunobiology of zinc. *Immunology today* **18**, 519-521 (1997).
26. J. M. Berg, Y. Shi, The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science (New York, N.Y.)* **271**, 1081-1085 (1996).
27. L. Rink, P. Gabriel, Zinc and the immune system. *The Proceedings of the Nutrition Society* **59**, 541-552 (2000).
28. N. Z. Gammoh, L. Rink, Zinc in Infection and Inflammation. *Nutrients* **9**, E624 (2017).
29. J. E. Hardyman, J. Tyson, K. A. Jackson, C. Aldridge, S. J. Cockell, L. A. Wakeling, R. A. Valentine, D. Ford, Zinc sensing by metal-responsive transcription factor 1 (MTF1) controls metallothionein and ZnT1 expression to buffer the sensitivity of the transcriptome response to zinc. *Metallomics : integrated biometal science* **8**, 337-343 (2016).
30. S. Choi, A. J. Bird, Zinc'ing sensibly: controlling zinc homeostasis at the transcriptional level. *Metallomics : integrated biometal science* **6**, 1198-1215 (2014).
31. L. S. Valberg, P. R. Flanagan, M. J. Chamberlain, Effects of iron, tin, and copper on zinc absorption in humans. *The American journal of clinical nutrition* **40**, 536-541 (1984).
32. M. Hambidge, Human zinc deficiency. *The Journal of nutrition* **130**, 1344S-1349S (2000).
33. H. Haase, L. Rink, Zinc signals and immune function. *BioFactors (Oxford, England)* **40**, 27-40 (2014).
34. A. S. Prasad, S. Meftah, J. Abdallah, J. Kaplan, G. J. Brewer, J. F. Bach, M. Dardenne, Serum thymulin in human zinc deficiency. *The Journal of clinical investigation* **82**, 1202-1210 (1988).
35. H. Haase, L. Rink, Functional significance of zinc-related signaling pathways in immune cells. *Annual review of nutrition* **29**, 133-152 (2009).
36. F. W. Beck, A. S. Prasad, J. Kaplan, J. T. Fitzgerald, G. J. Brewer, Changes in cytokine production and T cell subpopulations in experimentally induced zinc-deficient humans. *The American journal of physiology* **272**, E1002-1007 (1997).

37. D. Daaboul, E. Rosenkranz, P. Uciechowski, L. Rink, Repletion of zinc in zinc-deficient cells strongly up-regulates IL-1beta-induced IL-2 production in T-cells. *Metallomics : integrated biometal science* **4**, 1088-1097 (2012).
38. A. S. Prasad, F. W. Beck, B. Bao, J. T. Fitzgerald, D. C. Snell, J. D. Steinberg, L. J. Cardozo, Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. *The American journal of clinical nutrition* **85**, 837-844 (2007).
39. A. S. Prasad, F. W. Beck, J. Kaplan, P. H. Chandrasekar, J. Ortega, J. T. Fitzgerald, P. Swerdlow, Effect of zinc supplementation on incidence of infections and hospital admissions in sickle cell disease (SCD). *American journal of hematology* **61**, 194-202 (1999).
40. M. Sahebari, M. Abrishami-Moghaddam, A. Moezzi, M. Ghayour-Mobarhan, Z. Mirfeizi, H. Esmaily, G. Ferns, Association between serum trace element concentrations and the disease activity of systemic lupus erythematosus. *Lupus* **23**, 793-801 (2014).
41. A. Yilmaz, R. A. Sari, M. Gundogdu, N. Kose, E. Dag, Trace elements and some extracellular antioxidant proteins levels in serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical rheumatology* **24**, 331-335 (2005).
42. C. N. Toth, E. Baranyai, I. Csipo, T. Tarr, M. Zeher, J. Posta, I. Fabian, Elemental Analysis of Whole and Protein Separated Blood Serum of Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Sjogren's Syndrome. *Biological trace element research* **179**, 14-22 (2017).
43. G. Egger, G. Liang, A. Aparicio, P. A. Jones, Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* **429**, 457-463 (2004).
44. G. Romano, D. Veneziano, M. Acunzo, C. M. Croce, Small non-coding RNA and cancer. *Carcinogenesis* **38**, 485-491 (2017).
45. C. Tam, J. H. Wong, R. C. F. Cheung, T. Zuo, T. B. Ng, Therapeutic potentials of short interfering RNAs. *Applied microbiology and biotechnology* **101**, 7091-7111 (2017).
46. B. D. Alberts B., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. (Wiley-VCH, Weinheim, ed. 3rd, 2005).
47. T. Jenuwein, C. D. Allis, Translating the histone code. *Science (New York, N.Y.)* **293**, 1074-1080 (2001).

48. C. L. Peterson, M. A. Laniel, Histones and histone modifications. *Current biology : CB* **14**, R546-551 (2004).
49. D. Sutter, W. Doerfler, Methylation of integrated adenovirus type 12 DNA sequences in transformed cells is inversely correlated with viral gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 253-256 (1980).
50. B. Barneda-Zahonero, M. Parra, Histone deacetylases and cancer. *Molecular oncology* **6**, 579-589 (2012).
51. M. Garcia-Ramirez, C. Rocchini, J. Ausio, Modulation of chromatin folding by histone acetylation. *The Journal of biological chemistry* **270**, 17923-17928 (1995).
52. S. Parbin, S. Kar, A. Shilpi, D. Sengupta, M. Deb, S. K. Rath, S. K. Patra, Histone deacetylases: a saga of perturbed acetylation homeostasis in cancer. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **62**, 11-33 (2014).
53. D. Willis-Martinez, H. W. Richards, N. A. Timchenko, E. E. Medrano, Role of HDAC1 in senescence, aging, and cancer. *Experimental gerontology* **45**, 279-285 (2010).
54. N. S. Foulkes, E. Borrelli, P. Sassone-Corsi, CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell* **64**, 739-749 (1991).
55. V. Delmas, B. M. Laoide, D. Masquillier, R. P. de Groot, N. S. Foulkes, P. Sassone-Corsi, Alternative usage of initiation codons in mRNA encoding the cAMP-responsive-element modulator generates regulators with opposite functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 4226-4230 (1992).
56. T. Rauen, C. M. Hedrich, K. Tenbrock, G. C. Tsokos, cAMP responsive element modulator: a critical regulator of cytokine production. *Trends in molecular medicine* **19**, 262-269 (2013).
57. K. Tenbrock, Y. T. Juang, M. F. Gourley, M. P. Nambiar, G. C. Tsokos, Antisense cyclic adenosine 5'-monophosphate response element modulator up-regulates IL-2 in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **169**, 4147-4152 (2002).

58. K. Tenbrock, Y. T. Juang, M. Tolnay, G. C. Tsokos, The cyclic adenosine 5'-monophosphate response element modulator suppresses IL-2 production in stimulated T cells by a chromatin-dependent mechanism. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **170**, 2971-2976 (2003).
59. S. Yui, Y. Nakatani, M. J. Hunter, W. J. Chazin, M. Yamazaki, Implication of extracellular zinc exclusion by recombinant human calprotectin (MRP8 and MRP14) from target cells in its apoptosis-inducing activity. *Mediators of inflammation* **11**, 165-172 (2002).
60. L. S. Mayer, P. Uciechowski, S. Meyer, T. Schwerdtle, L. Rink, H. Haase, Differential impact of zinc deficiency on phagocytosis, oxidative burst, and production of pro-inflammatory cytokines by human monocytes. *Metallomics : integrated biometal science* **6**, 1288-1295 (2014).
61. P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* **162**, 156-159 (1987).
62. B. M. Vonakis, R. Sora, J. M. Langdon, V. Casolaro, S. M. MacDonald, Inhibition of cytokine gene transcription by the human recombinant histamine-releasing factor in human T lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **171**, 3742-3750 (2003).
63. M. Tsuchida, E. R. Manthei, T. Alam, S. J. Knechtle, M. M. Hamawy, T cell activation up-regulates the expression of the focal adhesion kinase Pyk2: opposing roles for the activation of protein kinase C and the increase in intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **163**, 6640-6650 (1999).
64. C. Castellanos Mdel, S. Lopez-Giral, M. Lopez-Cabrera, M. O. de Landazuri, Multiple cis-acting elements regulate the expression of the early T cell activation antigen CD69. *European journal of immunology* **32**, 3108-3117 (2002).
65. Y. T. Juang, T. Rauen, Y. Wang, K. Ichinose, K. Bedyk, K. Tenbrock, G. C. Tsokos, Transcriptional activation of the cAMP-responsive modulator promoter in human T cells is regulated by protein phosphatase 2A-mediated dephosphorylation of SP-1 and reflects disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of biological chemistry* **286**, 1795-1801 (2011).

66. R. P. de Groot, J. den Hertog, J. R. Vandenheede, J. Goris, P. Sassone-Corsi, Multiple and cooperative phosphorylation events regulate the CREM activator function. *The EMBO journal* **12**, 3903-3911 (1993).
67. V. C. Kytтары, Y. T. Juang, K. Tenbrock, A. Weinstein, G. C. Tsokos, Cyclic adenosine 5'-monophosphate response element modulator is responsible for the decreased expression of c-fos and activator protein-1 binding in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **173**, 3557-3563 (2004).
68. D. Flierman, C. S. Coleman, C. M. Pickart, T. A. Rapoport, V. Chau, E2-25K mediates US11-triggered retro-translocation of MHC class I heavy chains in a permeabilized cell system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 11589-11594 (2006).
69. M. J. Uddin, M. U. Cinar, D. Tesfaye, C. Looft, E. Tholen, K. Schellander, Age-related changes in relative expression stability of commonly used housekeeping genes in selected porcine tissues. *BMC research notes* **4**, 441 (2011).
70. V. Kloubert, L. Rink, Zinc as a micronutrient and its preventive role of oxidative damage in cells. *Food & function* **6**, 3195-3204 (2015).
71. V. Kloubert, L. Rink, *Zinc Regulation of the Immune Response in Nutrition, Immunity, and Infection*, P. C. Calder, A. D. Kulkarni, Eds. (CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Ration, Florida, 2017), chap. 15.
72. S. Overbeck, P. Uciechowski, M. L. Ackland, D. Ford, L. Rink, Intracellular zinc homeostasis in leukocyte subsets is regulated by different expression of zinc exporters ZnT-1 to ZnT-9. *Journal of leukocyte biology* **83**, 368-380 (2008).
73. L. Huang, S. Tapaamorndech, The SLC30 family of zinc transporters - a review of current understanding of their biological and pathophysiological roles. *Molecular aspects of medicine* **34**, 548-560 (2013).
74. M. Yu, W. W. Lee, D. Tomar, S. Pryshchep, M. Czesnikiewicz-Guzik, D. L. Lamar, G. Li, K. Singh, L. Tian, C. M. Weyand, J. J. Goronzy, Regulation of T cell receptor signaling by activation-induced zinc influx. *The Journal of experimental medicine* **208**, 775-785 (2011).

75. S. Hojyo, T. Miyai, H. Fujishiro, M. Kawamura, T. Yasuda, A. Hijikata, B. H. Bin, T. Irie, J. Tanaka, T. Atsumi, M. Murakami, M. Nakayama, O. Ohara, S. Himeno, H. Yoshida, H. Koseki, T. Ikawa, K. Mishima, T. Fukada, Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 controls humoral immunity by modulating B-cell receptor signal strength. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 11786-11791 (2014).
76. A. Honscheid, S. Dubben, L. Rink, H. Haase, Zinc differentially regulates mitogen-activated protein kinases in human T cells. *The Journal of nutritional biochemistry* **23**, 18-26 (2012).
77. A. Hashimoto-Tane, M. Sakuma, H. Ike, T. Yokosuka, Y. Kimura, O. Ohara, T. Saito, Micro-adhesion rings surrounding TCR microclusters are essential for T cell activation. *The Journal of experimental medicine* **213**, 1609-1625 (2016).
78. A. S. Prasad, B. Bao, F. W. Beck, F. H. Sarkar, Zinc activates NF-kappaB in HUT-78 cells. *The Journal of laboratory and clinical medicine* **138**, 250-256 (2001).
79. R. Dai, S. A. Ahmed, MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* **157**, 163-179 (2011).
80. G. Curtale, F. Citarella, C. Carissimi, M. Goldoni, N. Carucci, V. Fulci, D. Franceschini, F. Meloni, V. Barnaba, G. Macino, An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes. *Blood* **115**, 265-273 (2010).
81. M. Maywald, L. Rink, Zinc supplementation induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) antigen-specific regulatory T cells and suppresses IFN-gamma production by upregulation of Foxp3 and KLF-10 and downregulation of IRF-1. *European journal of nutrition* **56**, 1859-1869 (2017).
82. E. Rosenkranz, R. D. Hilgers, P. Uciechowski, A. Petersen, B. Plumakers, L. Rink, Zinc enhances the number of regulatory T cells in allergen-stimulated cells from atopic subjects. *European journal of nutrition* **56**, 557-567 (2017).
83. E. Rosenkranz, M. Maywald, R. D. Hilgers, A. Brieger, T. Clarner, M. Kipp, B. Plumakers, S. Meyer, T. Schwerdtle, L. Rink, Induction of regulatory T cells in Th1-/Th17-driven experimental autoimmune encephalomyelitis by zinc administration. *The Journal of nutritional biochemistry* **29**, 116-123 (2016).

84. E. Rosenkranz, C. H. Metz, M. Maywald, R. D. Hilgers, I. Wessels, T. Senff, H. Haase, M. Jager, M. Ott, R. Aspinall, B. Plumakers, L. Rink, Zinc supplementation induces regulatory T cells by inhibition of Sirt-1 deacetylase in mixed lymphocyte cultures. *Molecular nutrition & food research* **60**, 661-671 (2016).
85. L. F. Lu, M. P. Boldin, A. Chaudhry, L. L. Lin, K. D. Taganov, T. Hanada, A. Yoshimura, D. Baltimore, A. Y. Rudensky, Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell* **142**, 914-929 (2010).
86. B. Bao, A. S. Prasad, F. W. Beck, M. Godmere, Zinc modulates mRNA levels of cytokines. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **285**, E1095-1102 (2003).
87. V. C. Kytтарыs, Y. Wang, Y. T. Juang, A. Weinstein, G. C. Tsokos, CAMP response element modulator a expression in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* **15**, 840-844 (2006).
88. E. E. Solomou, Y. T. Juang, M. F. Gourley, G. M. Kammer, G. C. Tsokos, Molecular basis of deficient IL-2 production in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **166**, 4216-4222 (2001).
89. W. J. Chen, C. Y. Zhao, T. L. Zheng, Comparison of zinc contents in human serum and plasma. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **155**, 185-187 (1986).
90. D. J. Kosman, R. I. Henkin, Plasma and serum zinc concentrations. *Lancet (London, England)* **1**, 1410 (1979).
91. M. Folin, E. Contiero, G. M. Vaselli, Zinc content of normal human serum and its correlation with some hematic parameters. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* **7**, 75-79 (1994).
92. A. Murayama, K. Sakura, M. Nakama, K. Yasuzawa-Tanaka, E. Fujita, Y. Tateishi, Y. Wang, T. Ushijima, T. Baba, K. Shibuya, A. Shibuya, Y. Kawabe, J. Yanagisawa, A specific CpG site demethylation in the human interleukin 2 gene promoter is an epigenetic memory. *The EMBO journal* **25**, 1081-1092 (2006).

93. S. Rao, E. Procko, M. F. Shannon, Chromatin remodeling, measured by a novel real-time polymerase chain reaction assay, across the proximal promoter region of the IL-2 gene. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **167**, 4494-4503 (2001).
94. A. Vicart, T. Lefebvre, J. Imbert, A. Fernandez, B. Kahn-Perles, Increased chromatin association of Sp1 in interphase cells by PP2A-mediated dephosphorylations. *Journal of molecular biology* **364**, 897-908 (2006).
95. Y. Ho, R. Samarasinghe, M. E. Knoch, M. Lewis, E. Aizenman, D. B. DeFranco, Selective inhibition of mitogen-activated protein kinase phosphatases by zinc accounts for extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent oxidative neuronal cell death. *Molecular pharmacology* **74**, 1141-1151 (2008).
96. Y. Xiong, D. J. Luo, X. L. Wang, M. Qiu, Y. Yang, X. Yan, J. Z. Wang, Q. F. Ye, R. Liu, Zinc binds to and directly inhibits protein phosphatase 2A in vitro. *Neuroscience bulletin* **31**, 331-337 (2015).
97. J. R. Nuttall, S. Supasai, J. Kha, B. M. Vaeth, G. G. Mackenzie, A. M. Adamo, P. I. Oteiza, Gestational marginal zinc deficiency impaired fetal neural progenitor cell proliferation by disrupting the ERK1/2 signaling pathway. *The Journal of nutritional biochemistry* **26**, 1116-1123 (2015).
98. S. Chen, B. Li, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, I1PP2A affects tau phosphorylation via association with the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *The Journal of biological chemistry* **283**, 10513-10521 (2008).
99. T. D. Prickett, D. L. Brautigam, The alpha4 regulatory subunit exerts opposing allosteric effects on protein phosphatases PP6 and PP2A. *The Journal of biological chemistry* **281**, 30503-30511 (2006).
100. A. Takai, Y. Ohno, T. Yasumoto, G. Mieskes, Estimation of the rate constants associated with the inhibitory effect of okadaic acid on type 2A protein phosphatase by time-course analysis. *Biochemical Journal* **287**, 101-106 (1992).
101. V. Janssens, K. Zwaenepoel, C. Rosse, M. M. Petit, J. Goris, P. J. Parker, PP2A binds to the LIM domains of lipoma-preferred partner through its PR130/B" subunit to regulate cell adhesion and migration. *Journal of cell science* **129**, 1605-1618 (2016).

102. K. Tenbrock, Y. T. Juang, N. Leukert, J. Roth, G. C. Tsokos, The transcriptional repressor cAMP response element modulator alpha interacts with histone deacetylase 1 to repress promoter activity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **177**, 6159-6164 (2006).
103. C. M. Hedrich, T. Rauen, G. C. Tsokos, cAMP-responsive element modulator (CREM)alpha protein signaling mediates epigenetic remodeling of the human interleukin-2 gene: implications in systemic lupus erythematosus. *The Journal of biological chemistry* **286**, 43429-43436 (2011).
104. C. Choudhary, B. T. Weinert, Y. Nishida, E. Verdin, M. Mann, The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* **15**, 536-550 (2014).
105. R. Tschisnarov, S. Firner, C. Gil-Cruz, L. Goschl, N. Boucheron, G. Steiner, P. Matthias, C. Seiser, B. Ludewig, W. Ellmeier, HDAC1 controls CD8+ T cell homeostasis and antiviral response. *PloS one* **9**, e110576 (2014).
106. L. Goschl, T. Preglej, P. Hamminger, M. Bonelli, L. Andersen, N. Boucheron, A. F. Gulich, L. Muller, V. Saferding, I. A. Mufazalov, K. Hirahara, C. Seiser, P. Matthias, T. Penz, M. Schuster, C. Bock, A. Waisman, G. Steiner, W. Ellmeier, A T cell-specific deletion of HDAC1 protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of autoimmunity* **86**, 51-61 (2018).
107. J. Wang, L. Wen, Y. Wang, F. Chen, Therapeutic Effect of Histone Deacetylase Inhibitor, Sodium Butyrate, on Allergic Rhinitis In Vivo. *DNA and cell biology* **35**, 203-208 (2016).
108. R. K. Chandra, Nutritional regulation of immunity and risk of infection in old age. *Immunology* **67**, 141-147 (1989).
109. R. R. Briefel, K. Bialostosky, J. Kennedy-Stephenson, M. A. McDowell, R. B. Ervin, J. D. Wright, Zinc intake of the U.S. population: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *The Journal of nutrition* **130**, 1367s-1373s (2000).
110. I. Cakman, J. Rohwer, R. M. Schutz, H. Kirchner, L. Rink, Dysregulation between TH1 and TH2 T cell subpopulations in the elderly. *Mechanisms of ageing and development* **87**, 197-209 (1996).
111. A. S. Prasad, Zinc in growth and development and spectrum of human zinc deficiency. *Journal of the American College of Nutrition* **7**, 377-384 (1988).

112. K. Kawakami, A. Nakamura, A. Ishigami, S. Goto, R. Takahashi, Age-related difference of site-specific histone modifications in rat liver. *Biogerontology* **10**, 415-421 (2009).
113. G. L. Wang, E. Salisbury, X. Shi, L. Timchenko, E. E. Medrano, N. A. Timchenko, HDAC1 cooperates with C/EBPalpha in the inhibition of liver proliferation in old mice. *The Journal of biological chemistry* **283**, 26169-26178 (2008).
114. L. Kahmann, P. Uciechowski, S. Warmuth, B. Plumakers, A. M. Gressner, M. Malavolta, E. Mocchegiani, L. Rink, Zinc supplementation in the elderly reduces spontaneous inflammatory cytokine release and restores T cell functions. *Rejuvenation research* **11**, 227-237 (2008).
115. C. A. Krusche, A. J. Vloet, I. Classen-Linke, U. von Rango, H. M. Beier, J. Alfer, Class I histone deacetylase expression in the human cyclic endometrium and endometrial adenocarcinomas. *Human reproduction (Oxford, England)* **22**, 2956-2966 (2007).
116. I. F. Faneyte, P. M. Kristel, M. J. van de Vijver, Determining MDR1/P-glycoprotein expression in breast cancer. *International journal of cancer* **93**, 114-122 (2001).
117. K.-H. Ibs, Die Bedeutung von Zinkionen für mononucleäre Leukocyten. Dissertation, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, (2005).
118. K. W. Leung, M. Liu, X. Xu, M. J. Seiler, C. J. Barnstable, J. Tombran-Tink, Expression of ZnT and ZIP zinc transporters in the human RPE and their regulation by neurotrophic factors. *Investigative ophthalmology & visual science* **49**, 1221-1231 (2008).

## Anhang

Liste der verwendeten Primer.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Quelle
IL-2 (human) 161 bp T <sub>A</sub> = 58°C	Sense-Primer: TCC TGT CTT GCA TTG CAC TAA G	Hönscheid <i>et al.</i> , 2010 (76)
	Antisense-Primer: CAT CCT GGT GAG TTT GGG ATT C	
β-Aktin (murin) 185 bp T <sub>A</sub> = 60°C	Sense-Primer: CGT GCG TGA CAT CAA AGA GA	Daaboul <i>et al.</i> , 2012 (37)
	Antisense-Primer: CCA TAC CCA AGA AGG AAG GC	
CREMα (human) 217 bp T <sub>A</sub> = 60°C	Sense-Primer: TCG CGA ACT TGG GAC GA	Juang <i>et al.</i> , 2011 (65)
	Antisense-Primer: CTG AGC TAA AGC AGG GAT TG	
CREMα (murin) 102 bp T <sub>A</sub> = 60°C	Sense-Primer: CCT TGC CCC AAG TCA CAT G	Die Sequenz wurde mit dem „Primer <i>designing tool</i> “ (NCBI) erstellt.
	Antisense-Primer: GAG GCA GCC ATC ACC ACA C	
HDAC1 (human) 228 bp T <sub>A</sub> = 60°C	Sense-Primer: GAT CTG CTC CTC TGA CAA ACG	Krusche <i>et al.</i> , 2007 (115)
	Antisense-Primer: GCC AAC TTG ACC TCC TCC TT	
IL-2 (murin) 430 bp T <sub>A</sub> = 60°C	Sense-Primer: ACT TGT GCT CCT TGT CAA CAG C	Daaboul <i>et al.</i> , 2012 (37)
	Antisense-Primer: CCA TCT CCT CAG AAA GTC CAC C	
MTF-1 (human) 180 bp TA = 60°C	Sense-Primer: AAT GTC CCA GGG TTA TGT G	Hardyman <i>et al.</i> , 2016 (29)
	Antisense-Primer: GGA CAG CCC TCA AAG GTA C	
PBGD (human) 87 bp T <sub>A</sub> = 60°C	Sense-Primer: ACG ATC CCG AGA CTC TGC TTC	Faneyte <i>et al.</i> , 2001 (116)
	Antisense-Primer: GCA CGG CTA CTG GCA CAC T	

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Quelle
Zip1 (human) 143 bp $T_A = 60^\circ\text{C}$	Sense-Primer: GCC TGA CTA CCT GGC TGC CAT AGA	lbs, 2005 (117)
	Antisense-Primer: CGG CCC TGA CTG CTC GTA A	
Zip2 (human) 132 bp $T_A = 60^\circ\text{C}$	Sense-Primer: GTG CAG AAC AGA TCA GCA AGT GA	lbs, 2005 (117)
	Antisense-Primer: CAA TGC CAG CGA CTC CAA A	
Zip3 (human) 143 bp $T_A = 60^\circ\text{C}$	Sense-Primer: GGA CTC TGA TGC ATT TTC AAC ACT	lbs, 2005 (117)
	Antisense-Primer: CCC TTG TTT GGC CGG TAG A	
Zip4 (human) 352 bp $T_A = 60^\circ\text{C}$	Sense-Primer: AGA CTG AGC CCA GAG TTG AGG CTA	Leung <i>et al.</i> , 2008 (118)
	Antisense-Primer: TGT CGC AGA GTG CTA CGT AGA GGA	
Zip5 (human) 354 bp $T_A = 60^\circ\text{C}$	Sense-Primer: GAG CAG GAG CAG AAC CAT TAC CTG	Leung <i>et al.</i> , 2008 (118)
	Antisense-Primer: CAA TGA GTG GTC CAG CAA CAG AAG	
Zip6 (human) 355 bp $T_A = 60^\circ\text{C}$	Sense-Primer: CAT AGC CAT GAA GAA CCA GCA ATG	Leung <i>et al.</i> , 2008 (118)
	Antisense-Primer: GAG AAT CAA AGT GGG AGG GCT CTT	
Zip7 (human) 353 bp $T_A = 60^\circ\text{C}$	Sense-Primer: ACT GAA GGA GGA GCA GTG GAC AGT	Leung <i>et al.</i> , 2008 (118)
	Antisense-Primer: AGG CCC TAA TGC CAA AGT AAC CAT	
Zip8 (human) 352 bp $T_A = 60^\circ\text{C}$	Sense-Primer: CCT CGG ATT GAT TTT GAC TCC ACT	Leung <i>et al.</i> , 2008 (118)
	Antisense-Primer: AGC AGG ATT TGC ATA GCA TGT CAC	

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Quelle
Zip9 (human) 354 bp $T_A = 60^\circ\text{C}$	Sense-Primer: GCC TAA AGA ACT GGA AAG CCC ACT	Leung <i>et al.</i> , 2008 (118)
	Antisense-Primer: GTG TTT CAC TTG CTT GGT GGT GTT	
Zip10 (human) 355 bp $T_A = 60^\circ\text{C}$	Sense-Primer: TAG CCG TCT TCT GTC ATG AAC TGC	Leung <i>et al.</i> , 2008 (118)
	Antisense-Primer: TCA TAG AGG GCA ATC ACC AGC ATA	
Zip11 (human) 351 bp $T_A = 60^\circ\text{C}$	Sense-Primer: TCT CCT AAG CAT TTT GGT GGC CTA	Leung <i>et al.</i> , 2008 (118)
	Antisense-Primer: TCT CTT CTT TCC ACA GGG CTC ACT	
Zip12 (human) 351 bp $T_A = 60^\circ\text{C}$	Sense-Primer: CAA CCA CTC AAG AAG CCT CAT CAA	Leung <i>et al.</i> , 2008 (118)
	Antisense-Primer: AAG TAC TGC CTG GTG AAA GCC AAG	
Zip13 (human) 350 bp $T_A = 62^\circ\text{C}$	Sense-Primer: AAG AAG ATC GGG CTC CTG ACA AC	Leung <i>et al.</i> , 2008 (118)
	Antisense-Primer: GAG AAC AGC ACC ATT ACC ACG ATG	
Zip14 (human) 350 bp $T_A = 60^\circ\text{C}$	Sense-Primer: CAT TTG GTT TCA ACC CTC TGG AAG	Leung <i>et al.</i> , 2008 (118)
	Antisense-Primer: TTT CAG CCA GTA GCA AGC ACT CTG	
ZnT1 (human) 174 bp $T_A = 60^\circ\text{C}$	Sense-Primer: GGC CAA TAC CAG CAA CTC CAA	Overbeck <i>et al.</i> , 2008 (72)
	Antisense-Primer: TGC AGA AAA ACT CCA CGC ATG T	
ZnT2 (human) 129 bp $T_A = 60^\circ\text{C}$	Sense-Primer: CTG CAC CTT CGT CTT CTC CAT	Overbeck <i>et al.</i> , 2008 (72)
	Antisense-Primer: GAC AGC AGC AGA TCA CGA ACA G	

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Quelle
ZnT3 (human) 151 bp T <sub>A</sub> = 60°C	Sense-Primer: CAC CCT CCG AGA CGT TCT TC	Overbeck <i>et al.</i> , 2008 (72)
	Antisense-Primer: GGC AAC ATG GTA AGT GAG CGT AA	
ZnT4 (human) 180 bp T <sub>A</sub> = 60°C	Sense-Primer: GGC TAT CAT CAA AAT CAC CAA CCA	Overbeck <i>et al.</i> , 2008 (72)
	Antisense-Primer: CGG TGA TGA GCA TTA TAT CTC CAT T	
ZnT5 (human) 118 bp T <sub>A</sub> = 60°C	Sense-Primer: AAG GAC ATC ATG ACA GTG CTC TAA CTC	Overbeck <i>et al.</i> , 2008 (72)
	Antisense-Primer: CCA ACT TTA CAA CAC AAA GCC AGT AC	
ZnT6 (human) 103 bp T <sub>A</sub> = 60°C	Sense-Primer: GGC AAG TTG TTA CGG GAA TTT AGA	Overbeck <i>et al.</i> , 2008 (72)
	Antisense-Primer: TAA GCA GGA AGC CAG TAC ATA TCA A	
ZnT7 (human) 184 bp T <sub>A</sub> = 60°C	Sense-Primer: CAC GGA CAC AGT CAT TCC CTC TT	Overbeck <i>et al.</i> , 2008 (72)
	Antisense-Primer: TCT GTC TGC TGG GTC CTG TTG	
ZnT8 (human) 151 bp T <sub>A</sub> = 60°C	Sense-Primer: TCC CTC TAA GCG GCT GAC AT	Overbeck <i>et al.</i> , 2008 (72)
	Antisense-Primer: CAC AGT CGC CTG GAT CTG GTA	
ZnT9 (human) 105 bp T <sub>A</sub> = 60°C	Sense-Primer: CAG AAA GAA GGA CAG GGA TCA CA	Overbeck <i>et al.</i> , 2008 (72)
	Antisense-Primer: TTC TTG CTT AAG TGG AGC TTT GAG T	
ZnT10 (human) 244 bp T <sub>A</sub> = 65°C	Sense-Primer: CAC CCA GAA TGA GCC AGA AGA C	Die Sequenz wurde mit dem „Primer <i>designing tool</i> “ (NCBI) erstellt.
	Antisense-Primer: GAT AAG CGG GAA GGC AGA TGA C	

---

## Publikationsliste

### Aus dieser Dissertation hervorgegangene Veröffentlichungen:

- (1) **Veronika Kloubert**, Karoline Blaabjerg, Tina Sørensen Dalgaard, Hanne Damgaard Poulsen, Lothar Rink and Inga Wessels. Influence of zinc supplementation on immune parameters in weaned pigs. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2018; doi: 10.1016/j.jtemb.2018.01.006.
- (2) **Veronika Kloubert**, Inga Wessels, Karoline Blaabjerg, Veerle Janssens, Jan Hapala, Wolfgang Wagner and Lothar Rink. Increased CREM $\alpha$  expression leads to decreased interleukin-2 production via enhanced HDAC1 activity in T cells during zinc deficiency. (eingereicht)
- (3) Leonie Kulik, Martina Maywald, **Veronika Kloubert**, Inga Wessels and Lothar Rink. Zinc deficiency drives Th17 polarization and promotes loss of Treg cell-function. (eingereicht)

### Weitere Veröffentlichungen:

- (4) **Veronika Kloubert** and Lothar Rink. Chapter 15: Zinc regulation of the immune response. NUTRITION, IMMUNITY & INFECTION [Editors: Philip C. Calder (University of Southampton, Southampton, UK) and Anil Kulkarni (University of Texas Medical Centre, Houston, USA)] 2018.
- (5) Laura Dierichs, **Veronika Kloubert** and Lothar Rink. Cellular Zinc Homeostasis Modulates Polarization of THP-1-derived Macrophages. *European Journal of Nutrition* 2017; doi: 10.1007/s00394-017-1491-2.
- (6) Johanna Ollig, **Veronika Kloubert**, Inga Weßels, Hajo Haase and Lothar Rink. Parameters Influencing Zinc in Experimental Systems in Vivo and in Vitro. *Metals* 2016; 6(3): 71.
- (7) **Veronika Kloubert** and Lothar Rink. Zinc as a Micronutrient and its Preventive Role of Oxidative Damage in Cells. *Food & function* 2015; 6(10): 3195.

- (8) Laura Huth, Michael Rose, **Veronika Kloubert**, Wiebke Winkens, Martin Schlenzog, Arndt Hartmann, Ruth Knüchel and Edgar Dahl. BDNF is Associated with SFRP1 Expression in Luminal and Basal-Like Breast Cancer Cell Lines and Primary Breast Cancer Tissues: A Novel Role in Tumor Suppression? *PLoS One* 2014; 9(7): e102558.

**Weitere Veröffentlichungen in Bearbeitung:**

- (9) Johanna Ollig, **Veronika Kloubert**, Kathryn M. Taylor and Lothar Rink. B cell activation and proliferation increases intracellular zinc levels.

**Kongressbeiträge:**

- German Society for Minerals and Trace Elements, Aachen 09/2017  
Posterbeitrag: Immunological changes during zinc supplementation in pigs
- International Society for Zinc Biology, Pyla/Zypern 06/2017  
Posterbeiträge: Influence of zinc on *interleukin-2* expression & Immunological changes during zinc supplementation in pigs
- Short Term Scientific Mission (STSM)-Treffen/Zinc-UK, Antalya/Türkei 11/2015  
Vortrag: Immunological changes during zinc supplementation in pigs
- Zinc-UK Konferenz, London/Großbritannien 11/2014  
Posterbeitrag: The influence of zinc on the IL-6 induced *CRP* expression

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Lothar Rink für die herzliche Aufnahme an seinem Institut und die Möglichkeit, meine Promotion am Institut für Immunologie durchführen zu können. Ich möchte mich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe ebenso wie für die vielfältige Unterstützung während der Promotionszeit bedanken.

Herrn Prof. Ph.D. Alan Slusarenko danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes möchte ich für die ideelle sowie finanzielle Unterstützung meines Dissertationsvorhabens danken.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Immunologie möchte ich für die gute und motivierende Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft danken. Ich möchte mich dabei vor allem bei Gabi Engelhardt, Silke Hebel, Dagmar Marx sowie Birgit Plümäkers für ihre tatkräftige Unterstützung, motivierenden Worte und der guten Stimmung im Labor bedanken.

Ein großer Dank gilt außerdem meiner Familie und Freunden, die während meiner gesamten Promotionszeit immer mit motivierenden Worten hinter mir und meiner Arbeit standen und auf deren Unterstützung ich jederzeit zählen konnte.

Ich möchte mich ebenso bei Prof. Hanne Damgaard Poulsen und Prof. Karoline Blaabjerg von der Aarhus University/Dänemark für die gute Zusammenarbeit bedanken, wodurch es möglich war, Blutmaterial von zinksupplementierten Schweinen zu erhalten. In diesem Zusammenhang möchte ich mich außerdem bei Tina Sørensen Dalgaard (Ph.D.) für die gute Zusammenarbeit und die Möglichkeit bedanken, die aus den Schweinen gewonnenen Proben in ihrem Labor an der Aarhus University/Dänemark untersuchen zu können. Außerdem möchte ich mich bei Prof. Karoline Blaabjerg für die Bereitstellung der ICP-MS-Daten, bei Prof. Veerle Janssens (KU Leuven/Belgien) für die Herstellung des PP2A-Enzyms sowie die Durchführung des PP2A-Enzymtests zur Untersuchung eines möglichen Zinkeinflusses, bei Dr. Inga Weißels für die Durchführung der AAS-Messung und bei Jan Hapala (Ph.D.) sowie Prof. Wolfgang Wagner (RWTH Aachen) für die bioinformatische Unterstützung bedanken. Die Firma „Life & Brain Center“ (Bonn) wurde mit der Durchführung des EPIC Methylscreen Arrays beauftragt.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich die vorliegende Dissertation eigenhändig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Hilfestellung angefertigt zu haben. Alle öffentlichen und nicht öffentlichen Quellen sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit ist in dieser oder anderer Form zuvor nicht als Prüfungsarbeit zur Begutachtung vorgelegt worden.

Aachen, den 30.05.2018

.....

(Veronika Kloubert)