

# **Die Rolle von Zinkionen in der Signaltransduktion von Monozyten**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin  
Verena von Bülow  
geb. Preuß  
aus Goch

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Lothar Rink  
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Klaus Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 18.09.2006

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online  
verfügbar.

Diese Arbeit sei Gabriele Kivelitz, Franz, Christian und Helene Preuß gewidmet.

## Eigene Veröffentlichungen

- von Bülow V, Rink L, Haase H. 2005. Zinc-mediated inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity and expression suppresses TNF- $\alpha$  and IL- $\beta$  production in human monocytes by elevation of guanosin 3', 5'-cyclic monophosphate. *Journal of Immunology* 175: 4697-4705.
- von Bülow V, Rink L, Haase H. Zinc-dependent suppression of TNF- $\alpha$  production is mediated by protein kinase A-induced Raf-1 inhibition; zur Publikation eingereicht.
- Wöltje M, Tschöke B, von Bülow V, Westenfeld R, Denecke B. 2006. Journal of Endocrinology. CCAAT enhancer binding protein beta and hepatocyte nuclear factor 3beta are necessary and sufficient to mediate dexamethasone-induced up-regulation of alpha2HS-glycoprotein/fetuin-A gene expression. *Journal of Molecular Endocrinology* 36: 261-277.

## Kongressbeiträge

- Preuss V, Rink L, Haase H. 2005. Zinc-mediated inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity and expression suppresses TNF- and IL- production in human monocytes by elevation of guanosin 3', 5'-cyclic monophosphate. *Immunobiology* 210: 494.
- Preuß V, Rink L, Haase H. 2004. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity is controlled by zinc ions in human monocytes. *Immunobiology* 209: 425-426.

# Inhaltsverzeichnis

|                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Einleitung</b>                                          | <b>1</b>  |
| 1.1. Das Immunsystem des Menschen                             | 1         |
| 1.2. Zinkstoffwechsel des Menschen                            | 1         |
| 1.3. Der Einfluss von Zink auf das Immunsystem                | 4         |
| 1.3.1. Wechselwirkungen zwischen Zink und LPS                 | 6         |
| 1.3.2. Beeinflussung der Signaltransduktion durch Zink        | 8         |
| <b>Zielsetzung</b>                                            | <b>12</b> |
| <b>2. Material und Methoden</b>                               | <b>13</b> |
| 2.1. Material                                                 | 13        |
| 2.2. Methoden                                                 | 20        |
| 2.2.1. Isolierung von mononukleären Zellen                    | 20        |
| 2.2.2. Zellkulturen                                           | 22        |
| 2.2.3. Präparation von Zellkulturzusätzen                     | 22        |
| 2.2.4. RNA-Isolierung                                         | 23        |
| 2.2.5. Reverse Transkription                                  | 24        |
| 2.2.6. Hot-Start-PCR                                          | 25        |
| 2.2.7. Agarose-Gelelektrophorese                              | 27        |
| 2.2.8. Durchflusszytometrie                                   | 28        |
| 2.2.9. ELISA                                                  | 29        |
| 2.2.10. NFκB/p50-Transkriptionsfaktorassay                    | 30        |
| 2.2.11. Messung der zellulären cAMP-Konzentration             | 30        |
| 2.2.12. Messung der zellulären cGMP-Konzentration             | 32        |
| 2.2.13. Spezifischer Nachweis der PKA- und PKG-Aktivität      | 32        |
| 2.2.14. Messung der Phosphodiesterase-Aktivität               | 34        |
| 2.2.15. Proteingehaltsbestimmung                              | 36        |
| 2.2.16. Probenaufbereitung für Westernblot-Untersuchungen     | 36        |
| 2.2.17. Westernblotting                                       | 37        |
| 2.2.17.1. Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese            | 37        |
| 2.2.17.2. Wet-Blot-Verfahren                                  | 38        |
| 2.2.17.3. Färbung der transferierten Proteine                 | 39        |
| 2.2.17.4. Spezifischer Nachweis der Proteine durch Antikörper | 39        |

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.18. Identifizierung und Charakterisierung von DNA-Bindeproteinen                                       | 40 |
| 2.2.18.1. Präparation von Zellkernextrakten                                                                | 40 |
| 2.2.18.2. Radioaktive Markierung der DNA-Oligonukleotide                                                   | 42 |
| 2.2.18.3. Bandshiftreaktion                                                                                | 43 |
| 2.2.18.4. Nachweis der DNA-Bindeproteine mittels nativer<br>Polyacrylamid-Gelelektrophorese                | 44 |
| 2.2.19. Auswertung                                                                                         | 45 |
| <b>3. Ergebnisse</b>                                                                                       | 46 |
| 3.1. Analyse der Phosphodiesterase-Expression in Monozyten                                                 | 46 |
| 3.2. Der Einfluss von Zinkionen auf die LPS-induzierte Sekretion von TNF- $\alpha$                         | 47 |
| 3.3. Inhibition der Phosphodiesterasen durch Zink                                                          | 49 |
| 3.4. Die Aktivierung der PKA durch Zinkionen                                                               | 55 |
| 3.5. Die Zink-vermittelte Suppression der LPS-induzierten<br>TNF- $\alpha$ - und IL-1- $\beta$ -Expression | 60 |
| 3.6. Die Zink-abhängige Suppression von Raf-1 und NF $\kappa$ B                                            | 66 |
| <b>4. Diskussion</b>                                                                                       | 70 |
| <b>5. Zusammenfassung</b>                                                                                  | 80 |
| <b>6. Literatur</b>                                                                                        | 81 |
| <b>7. Abkürzungsverzeichnis</b>                                                                            | 89 |
| Lebenslauf                                                                                                 | 92 |
| Danksagung                                                                                                 | 93 |

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Immunsystem des Menschen

Das humane Immunsystem besteht aus zellulären und löslichen Komponenten, die eng verknüpft miteinander arbeiten. Die zellulären Bestandteile können in angeborene (unspezifische) Immunität und in erworbene (spezifische) Immunität unterteilt werden. Diese beiden Systeme kooperieren miteinander, indem sie über ein komplexes Netzwerk von chemischen Botenstoffen, den Zytokinen, miteinander kommunizieren. Im Gegensatz zu den in speziellen Drüsen produzierten endokrinen Hormonen werden Zytokine von einzelnen Zellen des Immunsystems sezerniert und wirken autokrin und parakrin. Immunkompetente Zellen sind in der Lage ein charakteristisches Zytokinspektrum zu sezernieren, das sowohl synergistische als auch antagonistische Wechselwirkungen zwischen dem unspezifischen und dem spezifischen Immunsystem ermöglicht. Aufgrund ihrer verschiedenen Funktionen unterteilt man die Gruppe der Zytokine in Interleukine (IL), Interferone (IFN), Tumornekrosefaktoren (TNF), Koloniestimulierende Faktoren (CSF, colony stimulating factor) sowie Wachstumsfaktoren (GF, growth factors). So beinhaltet das von Monozyten und Makrophagen produzierte Monokinspektrum die proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  (Kirchner et al., 1993).

## 1.2. Zinkstoffwechsel des Menschen

Der Gesamtzinkgehalt des Körpers beträgt 2-4 g (Rink und Gabriel, 2000). Zink kommt in allen Körpergeweben vor. 85% des Gesamtzinkgehaltes im Körper befinden sich in Knochen und Muskulatur, 11% in Haut und Leber und die übrigen 2-3% verteilen sich auf alle anderen Gewebe (Jackson, 1989).

Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung erstellte 2004 Richtlinien für die täglich empfohlene Zufuhr von Zink. Diese beträgt für Männer 10 mg und für Frauen 7 mg und kann in den Industriestaaten durch die übliche

tägliche Nahrungsaufnahme gedeckt werden. Für Kinder (1–9 Jahre) wird eine tägliche Zufuhr von 3-7 mg, für schwangere und stillende Frauen werden 10 bzw. 11 mg/d empfohlen (Deutsche Gesellschaft für Ernährung, 2004).

Die Leber ist das Hauptorgan des Zinkmetabolismus, der hauptsächlich hormonell über Glukagon, Insulin und Glukokortikoide reguliert wird (Cousins et al., 1985). Die Resorption von Zink erfolgt vornehmlich im Jejunum (Lee et al., 1989). Die Zinkresorption wird durch Glukose und einige Aminosäuren, wie z.B. Cystein und Lysin, verstärkt (Lee et al., 1989; Cousins, 1985). Ausgeschieden wird Zink hauptsächlich über die Fäces und geht zu einem geringen Teil über Haare, Schweiß, Schuppenbildung und mit dem Harn verloren (van Wouwe und Uijlenbroek, 1994).

Zinkmangelerkrankungen können durch eine verminderte Zinkzufuhr, Arzneimittelinteraktionen (orale Contraceptiva), erhöhten Zinkbedarf (Laktation) oder durch Zinkverluste, die z.B. bei pathologisch erhöhter Diurese eintreten, bedingt sein (Halsted und Smith, 1970; Grüngreiff, 1993). Eine Zinkmangelernährung tritt bei phytatreicher Kost auf, da durch Bildung schwerlöslicher Komplexe im Jejunum die Resorption vermindert wird (Tapiero und Tew, 2003). Die schnelle Entstehung von Zinkmangelerkrankungen ist darauf zurückzuführen, dass Zink keine Speicherform existiert.

Zinkintoxikationen treten wesentlich seltener auf als Zinkmangelerkrankungen, da Aufnahme und Ausscheidung sehr genau reguliert sind. Die wichtigste Zinkvergiftung ist wohl das „Zinkdampffieber“, welches durch die Inhalation von Dämpfen bei industriellen Prozessen hervorgerufen wird. Allerdings handelt es sich hier um eine Inhalation von elementaren Zinkdämpfen und nicht um die Inkorporation von Zinkionen (Blanc et al., 1993).

Die Aufrechterhaltung konstanter Zinkkonzentrationen im Plasma ist für den Ablauf der physiologischen Stoffwechselvorgänge in den Geweben essentiell, weshalb sich die Zinkkonzentration im Plasma verzögert an

veränderte Mengen der Zinkzufuhr angleicht. Eine orale Zinkaufnahme von 80 mg/d und mehr beeinflusst immunologische Funktionen nachteilig (Faber et al., 2004). Ein erhöhter Zinkspiegel führt zur Senkung des Kupferserumspiegels, der Stoffwechselstörungen verursacht (Fosmire et al., 1990). Studien zeigen, dass ein hoher Zinkgehalt im Darmlumen zu einer verminderten Aufnahme von Kupfer aus dem Lumen in die Epithelzellen der Darmmucosa führt. Hohe Zinkkonzentrationen in Darmepithelzellen induzieren verstärkt die Synthese von Thioneinpolypeptiden, die eine höhere Bindungsaffinität zu Kupfer als zu Zink haben. Dadurch wird der Transport von Kupfer aus den Darmepithelzellen ins Plasma verhindert (Cousins, 1985).

Die physiologische Zinkkonzentration im Plasma ist 12-16  $\mu\text{M}$ . Der im Plasma enthaltene Zinkpool beträgt lediglich 0,1% der gesamten Zinkmenge im Körper (Crea et al., 1990). Dennoch ist das im Plasma enthaltene Zink von besonderer Bedeutung, da es in dieser Form zu den Geweben transportiert wird. Auch für immunologische Funktionen ist der Plasmazinkpool von entscheidender Bedeutung. Im Plasma ist Zink hauptsächlich an Albumin (60%, niedrigaffin),  $\alpha_2$ -Macroglobulin (30%, hochaffin) und Transferrin (10%) gebunden (Rink und Gabriel, 2000). 30-40% des intrazellulären Zinkgehalts sind im Nukleus lokalisiert, während 50% sich auf Zytoplasma, Organellen und spezialisierte Vesikel aufteilen. Der verbleibende Anteil ist an die Zellmembran gebunden (Tapiero and Tew, 2003).

Als Cofaktor von mehr als 300 Metalloproteinen ist Zink an der Regulation zellulärer Prozesse wie Signaltransduktion, Transkription und DNA-Replikation beteiligt (Vallee und Falchuk, 1993). Der Zinkmetabolismus unterliegt einer komplexen Steuerung, die eine kontrollierte Aufnahme und Abgabe von Zinkionen in der Zelle reguliert. Der metallresponsive Transkriptionsfaktor MTF-1 (metal-response element-binding transcription factor-1) aktiviert Zink-abhängig die Expression von regulatorischen Zinkhomöostasegenen sowie von Genen, die gegen Metalltoxizität und oxidativen Streß schützen (Andrews, 2001). Das wohl wichtigste Metalloprotein für die intrazelluläre Verteilung von Zink ist das



Metallothionein, welches über 20 konservierte Cysteinreste Zinkionen binden kann. Unter physiologischen Bedingungen sind gut 5-20% des zellulären Zinks an Metallothionein gebunden (Andrews, 2001). In einer Vielzahl von Zellen findet man vesikuläre Strukturen mit hoch angereichertem Zinkgehalt. Über die Funktion dieser so genannten „Zinkosomen“ ist bisher noch wenig bekannt. Vermutlich spielen sie eine Rolle bei der Zellproliferation (Haase und Maret, 2005). Zinktransporter steuern den Zinkmetabolismus der Zelle, indem sie das Durchqueren von Zink durch die Plasmamembran ermöglichen. So transportieren ZnT Zink-Transporter Zinkionen aus der Zelle heraus oder aus dem Zytoplasma in das Lumen von intrazellulären Organellen. ZIP (Zrt-, Irt-like protein) Zink-Transporter dagegen transportieren Zinkionen aus dem extrazellulären Raum oder aus dem Lumen von Organellen in das Zytoplasma (Eide, 2006).

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

Zink ist nicht nur als funktioneller Bestandteil von über 300 Metalloproteinen essentiell bedeutsam. Es nimmt auch eine wichtige Rolle in der zellulären und humoralen Immunität ein, indem es die Enzymaktivität zahlreicher intrazellulärer Kinasen und Phosphatasen moduliert. So ist die Ausdifferenzierung und Balance des Immunsystems und seiner spezifischen Zellen nur dann gewährleistet, wenn das Milieu der Umgebung die physiologischen Bedingungen erfüllt. Dabei übernimmt Zink bei der Antigen-spezifischen T-Zell-abhängigen zellulären Immunität, der B-Zell-vermittelten Antikörperantwort ebenso wie bei der unspezifischen Immunität durch Komplement und Phagozyten spezifische Aufgaben, die von keinem anderen Spurenelement erfüllt werden können (Kruse-Jarres, 1989). Die folgenden Abschnitte werden verdeutlichen, dass für die optimale Zusammensetzung des Milieus eine intakte Zinkhomöostase unerlässlich ist.

Die Bedeutung von Zink für das Immunsystem und das Ausmaß seines immunologischen Einflusses tritt insbesondere bei Zinkmangel-

erkrankungen zutage. Die verheerenden immunologischen Konsequenzen lassen sich am Beispiel der Zinkmangelerkrankung *Acrodermatitis enteropathica*, einer autosomal-rezessiv vererbten Zinkabsorptionsstörung, studieren. Die Erkrankung manifestiert sich in frühester Kindheit und führt neben einem extrem niedrigen Zinkspiegel zu Hautverletzungen, Diarrhoen, Anämie, geistiger Retardation, Wachstumsstörungen und einem schweren Immundefekt (Neldner et al., 1978; Myonahan, 1981). Sekundärinfektionen mit Bakterien, Pilzen oder Viren, die in Verbindung mit einer Thymusatrophie stehen, führen unbehandelt noch in der Kindheit zum Tod. Durch vermehrte orale Zinkzufuhr (30-150 mg/d) jedoch kann eine Vollremission aller Symptome bei den Patienten erzielt werden (Neldner und Hambridge, 1975; Good et al., 1982). Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass ein Defekt des humanen Zinkaufnahme-transporters hZIP4 verantwortlich ist, da Mutationen im Gen *SLC39A4*, welches für hZIP4 codiert, mit der Erkrankung assoziiert sind (Wang et al., 2002; Kury et al., 2002).

Zinkmangel tritt auch als Nebenerscheinung von anderen Krankheiten auf. Bei vielen chronischen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis (Zoli et al., 1998), Asthma (Truong-Tran et al., 2001), COPD (chronic obstructive pulmonary disease) (Karadag et al., 2004) und Diabetes mellitus (Chausmer 1998) ist der erniedrigte Zinkserumspiegel mit einer erhöhten Zytokinproduktion assoziiert. Die bei alten Menschen auftretende Einschränkung immunologischer Funktionen korreliert ebenfalls mit einem erniedrigten Zinkserumspiegel (Rink und Kirchner, 2000). Bisher ist der pathogenetische Zusammenhang zwischen dem erniedrigten Zinkspiegel und den immunologischen Konsequenzen dieser Krankheiten weitgehend ungeklärt.

Schon in der frühen Phase der Immunreaktion wird deutlich, dass Zink eine wichtige Rolle für die reibungslose Abfolge der eng miteinander koordinierten Abläufe der zellulären Immunität spielt. Zinkmangelbedingungen vermindern die Zahl der neutrophilen Granulozyten und ihre Fähigkeit zur Chemotaxis (Ho et al., 2004). So sind wichtige Auslöser bei der Rekrutierung der Leukozyten aus dem Blutstrom zum Infektionsort gestört. Auch die Fähigkeit zur Phagozytose und zum

oxidativen Burst in Neutrophilen und Makrophagen ist gestört. So ist die Abtötung der Pathogene durch Zinkmangel vermindert (Rank und Gabriel, 2001). Auch die natürlichen Killerzellen verlieren die Fähigkeit, ihre Zielzellen abzutöten (Ferencik et al., 2003).

Zinkmangel wirkt sich nicht nur nachteilig auf die unspezifische Immunität aus, sondern beeinträchtigt auch die Funktionen der spezifischen Immunität. Der Zinkmangelstatus vermindert die Zahl der unreifen B-Zellen. Aufgrund der stark reduzierten B-Zell-Population sprechen Patienten mit Zinkmangelstatus erheblich schlechter auf Impfungen an (Rank und Gabriel, 2001). Zinkmangel korreliert vor allen Dingen mit einer Thymusatrophie, die für eine erhebliche Abnahme der T-Zellen verantwortlich ist (Mocchegiani et al., 1995). Thymulin, ein Thymushormon, welches für die Reifung der T-Zellen essentiell ist, wird durch die Bindung von Zink aktiviert. Nicht nur die Reifung der T-Zellen ist dadurch gestört, sondern auch die Proliferation der zytotoxischen T-Zellen (Ibs und Rank, 2003).

### **1.3.1. Wechselwirkung zwischen Zink und LPS**

Die Sepsis ist eine systemische Entzündungsreaktion und wird durch eine permanente und unkontrollierte Sekretion inflammatorischer Zytokine verursacht, die letztendlich zu Multiorganversagen und damit zum Tode führen kann. Dabei ist es nicht die Infektion selbst, die die verheerenden Folgen der Sepsis verursacht, sondern vielmehr die Immunantwort auf die Infektion. Bakterielle Komponenten, wie das Lipopolysaccharid (LPS) der bakteriellen gramnegativen Zellwand, lösen die Entzündungsantwort aus (Liu und Malik, 2006). Mit dem Toll-like Rezeptor-4 (TLR-4) verfügen Monozyten und Makrophagen über einen Rezeptor, mit dessen Hilfe sie die Invasion von pathogenen Mikroorganismen detektieren können.

LPS wird im Plasma zunächst vom LPS-bindenden Protein (LBP) gebunden. Der LPS/LBP-Komplex bindet zusammen mit dem Rezeptorprotein CD (cluster of differentiation) 14 auf der Monozytenoberfläche an TLR-4, wodurch dieser aktiviert wird und über eine Signalkaskade von Kinasen das Signal weiter an den Zellkern leitet. Dort wird die Expression von Genen der Immunabwehr induziert (Akira

und Takeda, 2004). Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B) als Antwort auf LPS ist ein zentrales Ereignis, da NF $\kappa$ B eine Vielzahl inflammatorischer Mediatoren induziert. Die Stimulation von humanen Monozyten mit LPS führt zur Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 (Müller-Alouf et al., 1994).

Trotz intensiver Bemühungen, neue Therapieansätze zu entwickeln, ist Sepsis die Haupttodesursache unter den Intensivpatienten (Liu und Malik, 2006). Daher erscheint es vielversprechend, therapeutische Substanzen zu finden, die in der Lage sind, die LPS-induzierte NF $\kappa$ B-Aktivierung in Monozyten/Makrophagen zu inhibieren. Über die Wechselwirkungen zwischen Zink und LPS in Monozyten existieren zahlreiche Studien, die aufzeigen, dass eine Zinkstimulation oder Supplementation die LPS-induzierte Immunantwort der Monozyten supprimieren kann.

In mehreren Tier-Sepsismodellen wurde gezeigt, dass Zinkionen einen protektiven Effekt gegenüber der Monokinsekretion haben, wenn Zink zeitlich vor dem Endotoxin injiziert wird. Die Konzentration von TNF- $\alpha$  in der Leber und im Plasma wird unter diesen Bedingungen deutlich gesenkt (Snyder und Walker, 1976; Klosterhalfen et al., 1996; Zhou et al., 2004). Der protektive Effekt macht sich im Experiment auch in der erniedrigten Mortalitätsrate der Tiere bemerkbar (Snyder und Walker, 1976). In einer *in vitro* Studie konnte nachgewiesen werden, dass eine Zinksupplementation auch eine deutliche Reduzierung von Monokinen auf Ebene der mRNA-Expression nach Stimulation mit PHA (Phytohaemagglutinin) und PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) bewirkt. Diese Substanzen induzieren die Monokinsekretion (Bao et al., 2003).

Auf welche Weise eine Zinksupplementation ihren protektiven Einfluss auf die Monokinproduktion ausübt, ist bisher nicht bekannt. Die Aufklärung des zugrunde liegenden Mechanismus ist Gegenstand dieser Arbeit. Bei der Untersuchung des zuvor beschriebenen inhibitorischen Effektes von Zink muss zunächst die geeignete Zinkkonzentration gefunden werden. In niedrigen Konzentrationen kann Zink auch synergistisch mit LPS interagieren. Bei solchen substimulatorischen Konzentrationen von Zink hat die gleichzeitige Stimulation mit LPS und Zink eine deutlich erhöhte IL-

1 $\beta$ -Sekretion in PBMC (peripheral blood mononuclear cells, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) zur Folge (Driessen et al., 1995). Diesen Effekt erklärt man sich durch eine Interaktion von Zinkionen mit LPS, die zu einer veränderten Konformationsänderung des LPS führt. Vermutlich wird dadurch die Bindung von LPS an LBP verstärkt (Wellinghausen et al., 1996a). Auch können Zinkionen PBMC ohne LPS direkt zur Produktion von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 anregen (Driessen et al., 1994), wobei Zink die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression induziert (Wellinghausen et al., 1996b).

### **1.3.2. Beeinflussung der Signaltransduktion durch Zink**

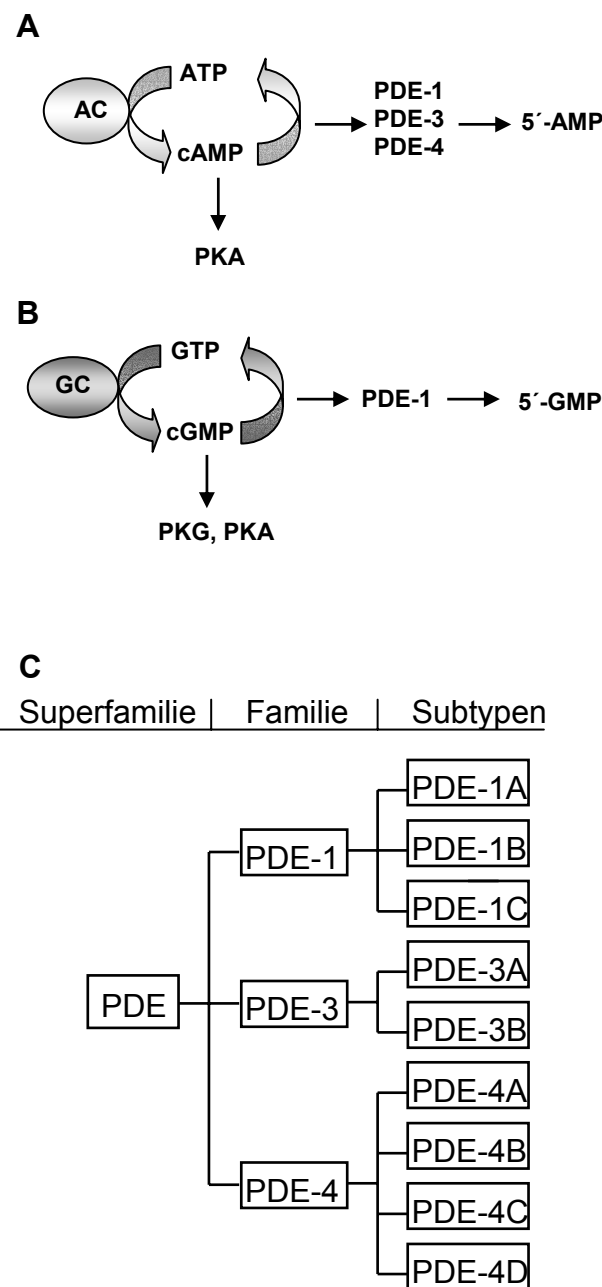
In welcher Weise kann Zink die Zytokinproduktion in Monozyten modulieren? Zinkionen beeinflussen die Phosphorylierung einer Vielzahl von Kinasen (Beyersmann und Haase, 2001). In T-Zellen zum Beispiel inhibiert Zink die IL-1-abhängige Aktivierung der Kinase IRAK (IL-1 receptor-associated kinase) (Wellinghausen et al., 1997). In Endothelzellen des Rindergehirns supprimieren Zink und Pyrithion (ein Ionophor, welcher eine schnelle Aufnahme von Zink in die Zelle ermöglicht) die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B (Kim et al., 1999), der als Aktivator der Expression inflammatorischer Gene eine zentrale Rolle spielt. Neben IRAK ist auch NF $\kappa$ B Bestandteil des TLR-4 Signalweges, der nach LPS-Stimulation in Monozyten und Makrophagen aktiviert wird (Akira und Takeda, 2004).

Für die vorliegende Arbeit ist insbesondere von Interesse, dass Zink die Aktivität von zyklischen Nukleotid-Phosphodiesterasen (PDE) beeinflusst. Zink inhibiert die Aktivität der rekombinanten PDE-4A und PDE-3 (Percival et al., 1997; Pillai et al., 1994). Als Folge der Zink-vermittelten Phosphodiesterase-Inhibition steigt die intrazelluläre Konzentration des Cyclonukleotids cGMP (zyklisches Guanosin-3', 5'-monophosphat) in PC12 Pheochromocytom-Zellen (Wätjen et al., 2001). Die Cyclonukleotide cAMP (zyklisches Adenosin-3', 5'-monophosphat) und cGMP sind ubiquitäre Second Messenger und vermitteln als solche biologische Antworten von verschiedenen Hormonen, Neurotransmittern und Arzneimitteln (Torphy, 1998). Die Synthese von cAMP wird durch die plasmamembranständige Adenylat-Cyclase (AC) aus ATP katalysiert,

während cGMP sowohl durch die plasmamembranständige als auch durch die zytoplasmatische Guanylat-Cyclase (soluble guanylate cyclase, sGC) aus GTP synthetisiert wird (Abb. 1). Die plasmamembranständige Adenylat- und Guanylat-Cyclase werden über G-gekoppelte Rezeptoren aktiviert. Anders verhält es sich mit der zytoplasmatischen Guanylat-Cyclase. Diese wird durch NO aktiviert. In Monozyten ist hauptsächlich die zytoplasmatische Guanylat-Cyclase aktiv (O'Dorisio et al., 1984).

cAMP und cGMP aktivieren Protein Kinase A (PKA) bzw. Protein Kinase G (PKG), wobei erhöhte cGMP-Konzentrationen auch die PKA aktivieren können. Eine Aktivierung der PKA durch cGMP und das cGMP-Analogon 8-Br-cGMP wurde in humanen Thrombozyten und in glatter Muskulatur der Meerschweinchen Trachea beobachtet (Li et al., 2003; Cornwell et al., 1994). Phosphodiesterasen sind für die Inaktivierung der Cyclonukleotide verantwortlich, indem sie cAMP und cGMP zu ihren korrespondierenden biologisch inaktiven Formen 5'-Nukleotidmonophosphat (5'-AMP oder 5'-GMP) hydrolysieren.

Monozyten exprimieren die Phosphodiesterase-Familien 1, 3 und 4 (Gantner et al., 1997; Essayan, 2001) (Abb. 1). Die Inhibition von Phosphodiesterasen führt zur Akkumulation von cAMP und/oder cGMP. Als biologische Konsequenz ist die inflammatorische Aktivität von Zellen des Immunsystems herabgesetzt (Dyke und Montana, 2002). Zahlreiche Studien in primären humanen Monozyten und PBMC haben gezeigt, dass spezifische PDE-4-Inhibitoren wie z.B. Rolipram und Ro-20-1724 die Sekretion von TNF- $\alpha$  durch eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration reduzieren können (Yoshimura et al., 1997; Seldon et al., 1995; Verghese et al., 1995; Greten et al., 1995; Barnette et al., 1998). Auch die cGMP-Analoga DB-cGMP (Dibutyryl-cGMP) und 8-Br-cGMP (8-Brom-cGMP) schwächen die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Sekretion in primären humanen Monozyten und murinen Makrophagen (Seldon et al., 1995; Kierner et al., 2000) ab.



**Abb. 1. Synthese und Hydrolyse von Cyclonukleotiden der Phosphodiesterase-Familie 1, 3 und 4**

A, Die plasmamembranständige Adenylat-Cyclase (AC) wird über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor aktiviert und katalysiert die Synthese von cAMP. cAMP aktiviert die Protein Kinase A (PKA). Die Phosphodiesterasen (PDE)-1, 3 und 4 hydrolysieren in Monozyten cAMP zu 5'-AMP. B, Die plasmamembranständige und zytoplasmatische Guanylat-Cyclase (GC) katalysieren die Synthese von cGMP, das sowohl die Protein Kinase G (PKG) als auch die Protein Kinase A (PKA) aktivieren kann. PDE-1 hydrolysiert in Monozyten cGMP zu 5'-GMP. C, Dargestellt sind für die Phosphodiesterase-Familien 1, 3 und 4 alle bisher in Vertebraten bekannten Phosphodiesterase-Subtypen (Dousa, 1999).

Die Inhibition der PDE-4 mit Rolipram aktiviert die PKA in Monozyten (Seldon et al., 2005). Humane Monozyten exprimieren PKA Typ I und Typ II. Die PKA besteht aus einem Tetramer, welcher sich aus zwei regulatorischen Untereinheiten zusammensetzt, die an zwei katalytische Untereinheiten gebunden sind. Nach der kooperativen Bindung von vier Molekülen cAMP dissoziieren die regulatorischen Untereinheiten von den katalytischen Untereinheiten ab (Essayan, 2001).

PKA reguliert eine Vielzahl physiologischer Funktionen in der Zelle, indem sie ihre Zielsubstrate phosphoryliert, darunter auch die Kinase Raf-1. PKA inaktiviert die Kinaseaktivität von Raf-1 durch Phosphorylierung an Position Serin 259 in der regulatorischen CR (conserved region) 2 Domäne (Dhillon et al., 2002a). Die Raf-Proteinkinasefamilie der Säugetiere umfasst Raf-1, A-Raf und B-Raf. Raf-Proteinkinasen weisen eine dreigeteilte Domänenstruktur auf, die CR1, CR 2 und CR 3 (Chang et al., 2003). Die inaktive Konformation von Raf-1 wird auf molekularer Ebene durch das Chaperonin 14-3-3 stabilisiert. Nach Dephosphorylierung von Serin 259 durch die Phosphatase PP2A dissoziiert 14-3-3 ab und ermöglicht die Aktivierung von Raf-1 durch Phosphorylierung an Serin 338 in der Kinase Domäne CR 3 (Dhillon et al., 2002b; Kolch et al., 2000).

Der Raf-1/MEK-1-MEK-2 (mitogen-activated protein/extracellular-signal-regulated kinase kinase kinase)/ERK-1-ERK-2 (extracellular-signal-regulated kinase)-Signalweg wird durch LPS aktiviert und ist an der Aktivierung der TNF- $\alpha$ -Produktion in Monozyten und Makrophagen beteiligt (van der Brüggen et al., 1999; Hambleton et al., 1995). Aktiviertes Raf-1 phosphoryliert und aktiviert MEK, diese aktiviert wiederum ERK (Kolch et al., 2000). Raf-1-Aktivierung führt ebenfalls zur Aktivierung von Genen mit NF $\kappa$ B-Promotor (Chang et al., 2003).



## Zielsetzung

Die exzessive und permanente Monokinproduktion als Antwort auf LPS bei Sepsis und septischem Schock, ebenso wie bei chronischen Entzündungen haben verheerende Konsequenzen zur Folge. Sie machen es notwendig, Substanzen und Mechanismen zu identifizieren, die in der Lage sind die proinflammatorische Monokinsekretion zu supprimieren. Obwohl der Einfluss einer Zinkstimulation auf die LPS-induzierte Monokinsekretion in zahlreichen Studien untersucht wurde, ist unser Verständnis über die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen bisher nur unzureichend. Die Aufklärung dieser Mechanismen ist das Ziel dieser Arbeit. Im Rahmen der Arbeit wird der inhibitorische Effekt von Zinkionen auf die LPS-induzierte Monokinsekretion am Beispiel der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in Monozyten untersucht. Da bisher nicht klar ist, wie Zinkionen ihren antiinflammatorischen Effekt in Monozyten vermitteln, wird untersucht, auf welche Weise Zinkionen in die intrazelluläre Signaltransduktion in Monozyten eingreifen können, um die LPS-induzierte Monokinsekretion zu antagonisieren. Zunächst wird die LPS-induzierte Sekretion von TNF- $\alpha$  in Gegenwart verschiedener Zinkkonzentrationen untersucht, um eine optimale Ausgangskonzentration zur Untersuchung des inhibitorischen Zinkeffekts wählen zu können. Da Cyclonukleotide die LPS-stimulierte Sekretion von Monokinen supprimieren können, wird untersucht, ob Zinkionen über die Beeinflussung der Aktivität von Phosphodiesterasen den Cyclonukleotidmetabolismus in Monozyten modulieren können und dadurch in der Lage sind, die LPS-induzierte Monokinsekretion zu supprimieren. Es wird weiterhin untersucht, in welcher Weise Cyclonukleotide Zink-abhängig in LPS-induzierte Signaltransduktionswege eingreifen können, um die TNF- $\alpha$ -Produktion in Monozyten zu inhibieren. Die Studie soll zum Verständnis der antiinflammatorischen Effekte einer Zinksupplementation auf molekularer Ebene beitragen und Grundlagen für einen möglichen Einsatz einer Zinksupplementation in der Therapie schaffen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

- Analysenwaage, 770/GS/GJ (Kern und Sohn, Balingen-Fommern)
- PCR-Geräte, Gene Amp PCR Systems 2400 und 2700 (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- Belichtungskassette für Röntgenfilme, 20x25cm (BioRad Laboratories, München)
- Blot-Transfer-Kammer, Mini-Trans (BioRad Laboratories, München)
- Brutschrank, 5042E (Heraeus, Osterode)
- Bürkerkammer mit Deckgläschen (Brand, Wertheim)
- CO<sub>2</sub>-Inkubator, Cytoperm (Heraeus, Osterode)
- CO<sub>2</sub>-Inkubator, MCO-17 AIC (Sanyo Fischer, München)
- Durchflusszytometer, FACS-Calibur (Becton-Dickinson, Heidelberg)
- Elektrophoresekammer, Mini-Protean 3 (BioRad Laboratories, München)
- Elektrophoresenetzgerät, Power-Pack 300 System (BioRad Laboratories, München)
- Elektrophoresekammer, Mini-Sub Cell GT (BioRad Laboratories, München)
- ELISA-Reader, Magellan (Tecan, Crailsheim)
- ELISA-Washer, Atlantis (Asys Hitech, Eugendorf)
- Entwickler, Agfa Cruix HT350 (Agfa, Köln)
- Folienschweißgerät, Polystar 100 (Rische und Herfurth, Hamburg)
- Gefrierschrank, -20°C (Bosch, München)
- Gefrierschrank, -80°C, MDF-U71VS (Sanyo, Gunma, Japan)
- Kühlschranks, +4 - +8°C (Bosch, München)
- Laborwaage, 1265MP (Sartorius AG, Göttingen)
- Magnetrührer, MR3001 (Heidolph, Schwabach)
- Mikrowellenherd, NN-A850W (Panasonic Deutschland, Hamburg)
- Mikroskop, Dialux 22ED (Leitz, Wetzlar)

- Multipipette, Multipipette plus (Eppendorf, Hamburg)
- pH-Meter, HI9321 (Hanna Instruments, Kehl am Rhein)
- Photometer, BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg)
- Pipetten, 0,5-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl, Research (Eppendorf, Hamburg)
- Pipettierhilfe, Pipettus akku (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt)
- Schüttler HS 250 basic (IKA-Werke, Staufen)
- Szintillationszähler Packard Tricarb 2100TR (Packard Bioscience, Groningen, Niederlande)
- Sony Video Graphic Printer UP-895CE (Sony, Tokyo, Japan)
- Standzentrifuge, Varifuge 3.0RS (Heraeus, Osterode)
- Standzentrifuge, Z 400 K (Hermle, Wehingen)
- Sterile Werkbank, KR130 und KR-210 (Kojar, Vilppula, Finnland)
- Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg)
- Tischzentrifuge, 5417 R (Eppendorf, Hamburg)
- Tischzentrifuge, Biofuge A (Heraeus, Osterode)
- UV-Cleaner Box, UVC/T (Lab4You, Berlin)
- UV-Dokumentationskammer, Universal Hood (BioRad Laboratories, München)
- Vortex, Reax (Heidolph, Schwabach)
- Zellzählgerät, Casy 1 TT (Schärfe System, Reutlingen)

### **2.1.2. Laborbedarf**

- Bakterienfilter, 0,2 µm Porenweite (Pall, Dreiech)
- Casy cups (Schärfe-System, Reutlingen)
- Cellscraper, 25cm (Sarstedt, Nümbrecht)
- Einmalküvetten, 10x4x45mm (Sarstedt, Nümbrecht)
- Erlenmeyerkolben, 250ml (Schott, Mainz)
- FACS-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht)
- Fotopapier URP-110HG (Sony, Tokyo, Japan)
- Frischhaltefolie (RUF, Bremen)
- Gel Blotting Papier GB003 (Schleicher und Schuell, Dassel)
- Glasfaserzuschnitte, GF8 38x242mm (Dunn Labortechnik, Asbach)

- Glasplatten, Outer Glass PLT W/1.5mm, M-P 3 (BioRad Laboratories, München)
- Glasplatten, Short Plates, M-P 3 (BioRad Laboratories, München)
- Klebefolien, Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- Kunststoffröhrchen, steril, mit Schraubverschluß, 15ml und 50ml (Greiner, Nürtingen)
- Latex Einmalhandschuhe (Kimberley-Clark, Zaventem, Belgien)
- Liquid Scintillation Cocktail Pico-Fluor 40 (PerkinElmer, Wellesley, USA)
- Mikrotiterplatte, Rundboden (Greiner Bio One, Frickenhausen)
- PCR-Reaktionsgefäß, 0,2ml (Eppendorf, Hamburg)
- Phosphozellulose Papier P81 (Whatman, Maidstone, England)
- Pipettenspitzen Combitips, 1ml, 2,5ml, 5ml und 10ml (Eppendorf, Hamburg)
- Pipettenspitzen, 100-1000µl (Eppendorf, Hamburg)
- Pipettenspitzen, 1-10µl und 10-100µl (Sarstedt, Nümbrecht)
- Pipettenspitzen, gestopft, 1-10µl, 10-100µl und 100-1000µl (Biozym, Hessisch-Oldendorf)
- Polyethylen-Röhrchen, 6ml (Packard Bioscience, Groningen, Niederlande)
- PPN-Röhrchen mit Verschlußkappe, steril, 5ml (Sarstedt, Nümbrecht)
- Reaktionsgefäße, 1,5ml (Sarstedt, Nümbrecht)
- Reaktionsplatten, MicroAmp Optical 96-Loch (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- Röntgenfilm, X-OMAT UV Film(Kodak Deutschland, Stuttgart)
- Schlauchfolie, PE, 0,2 mm (VWR International, Darmstadt)
- UV-Einmalküvetten, UVette 220-1600nm (Eppendorf, Hamburg)
- Zellkulturflaschen, Nunclon Surface, 25cm<sup>2</sup> (Nunc, Roskilde, Dänemark)
- Zellkulturflaschen, Polystyrene, 25cm<sup>2</sup> (Sarstedt, Nümbrecht)
- Zellkulturplatte, 24-Loch (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Zellkulturplatte, 6-Loch (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Zellkulturplatte, 12-Loch (Becton Dickinson, Heidelberg)

- Zellkulturplatte, 96-Loch, Flachboden (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Zellkulturplatte, 96-Loch, Rundboden (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Zellkulturschale, 100 mm (Sarstedt, Nümbrecht)

### **2.1.3. Zellkulturmedien und Mediumzusätze**

- $\beta$ -Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)
- FCS, Fötale Kälberserum (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
- Ficoll-Trennlösung 1,077g/ml (Biochrom, Berlin)
- Kulturmedium DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Cambrex, Verviers, Belgien)
- Kulturmedium RPMI 1640 (Cambrex, Verviers, Belgien)
- L-Glutamin, 200 mM (Cambrex, Verviers, Belgien)
- Natrium-Pyruvat, 100 mM (Cambrex, Verviers, Belgien)
- NEAA, Nicht-essentielle Aminosäuren, 100x (Cambrex, Verviers, Belgien)
- PBS, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , 1x (Cambrex, Verviers, Belgien)
- Penicillin 10000 U/ml + Streptomycin 10000  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Cambrex, Verviers, Belgien)

### **2.1.4. Immunologische Reagenzien**

- Kaninchen-anti-human-c-Raf (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Kaninchen-anti-human-phospho-c-Raf (338) (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Kaninchen-anti-human-phospho-c-Raf (259) (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Maus-anti-human-PKA<sub>c</sub> (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg)
- Maus-anti-human-CD14-FITC konjugiert (monoklonal) (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg)
- Maus-IgG<sub>2b,k</sub>-Isotypkontrolle-FITC konjugiert (monoklonal) (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg)
- LPS, Lipopolysaccharid aus *Escherichia coli* Serotyp 0111:B4 (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)

- Pferd-anti-Maus-Sekundärantikörper-HRP konjugiert (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Ziege-anti-Biotin-Sekundärantikörper-HRP konjugiert (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Ziege-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper-HRP konjugiert (Cell Signaling, Beverly, USA)

#### **2.1.5. Molekularbiologische Reagenzien**

- 1 kb Leiter (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- Biotinylierte Proteinleiter (Cell Signaling, Beverly, USA)
- dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10mM (Applied Biosystems, Warrington, Großbritannien)
- dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 100 mM (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- Gel-Ladepuffer 6x (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- HotStar-Taq, 5U/µl (Qiagen, Hilden)
- Klenowfragment 10 U/µl (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- Klenowpuffer, 10x (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- PCR-Puffer, 10x (Qiagen, Hilden)
- Poly(dI-dC) 1 µg/µl (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- humane adulte Colon-RNA 1 µg/ml (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)
- humane Prostata-cDNA (zur Verfügung gestellt von Dr. M. V. Cronauer, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf)
- NFκB-Oligonukleotide (zur Verfügung gestellt von Dr. M. Wöltje, IZKF BIOMAT, Universitätsklinikum Aachen)
- SeeBlue Plus2 Pre-stained Standard, Molekulargewichtsgrößenstandard (Invitrogen, Carlsbad, USA)

#### **2.1.6. Sonstige Reagenzien**

- Acrylamid/bis-Acrylamid, 30%ige Lösung, 37:5:1 (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- Agarose (Gibco, Karlsruhe)
- Ameisensäure (Merck, Darmstadt)
- APS, Ammoniumpersulfat (BioRad Laboratories, München)

- Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen)
- ATP, Adenosin-5'-triphosphat (Sigma -Aldrich Chemie, Steinheim)
- Borsäure (Merck, Darmstadt)
- BPDEtide (Calbiochem, Darmstadt)
- 8-Br-cGMP, 8-Bromguanosin-3', 5'-zyklisches Monophosphothioat (Biolog LSI, Bremen)
- Bromphenolblau (Merck, Darmstadt)
- BSA, Albumin aus Rinderserum 1 mg/ml Stocklösung (Fluka, Buchs, Schweiz)
- cAMP, zyklisches Adenosin-3', 5'-monophosphat (Biolog LSI, Bremen)
- Calciumchlorid (Merck, Darmstadt)
- cGMP, zyklisches Guanosin-3', 5'-monophosphat (Biolog LSI, Bremen)
- Chlorpromazin (Calbiochem, Darmstadt)
- DB-cGMP, N<sup>2</sup>, 2'-O-Dibutyrylguanosin-3', 5'-zyklisches Monophosphat (Biolog LSI, Bremen)
- DMSO, Dimethyl-Sulfoxid (Merck, Darmstadt)
- DTT, Dithiothreitol (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz, Dihydrat (Merck, Darmstadt)
- Ethanol, absolut (J.T. Baker, Deventer, Niederlande)
- Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- Forskolin (Sigma -Aldrich Chemie, Steinheim)
- Glucose (Merck, Darmstadt)
- Glycerol, reinst (Merck, Darmstadt)
- Glycin (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- HEPES, 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (Merck, Darmstadt)
- IBMX, Isobutyl-1-methylxanthin (Sigma -Aldrich Chemie, Steinheim)
- Kemptide (Calbiochem, Darmstadt)
- L-Cystein-Hydrochlorid (Sigma -Aldrich Chemie, Steinheim)
- LumiGLO, Luminol Chemilumineszenz Substrat (Cell Signaling, Beverly, USA)
- LY83583, 6-(Phenylamino)-5, 8-quinolindion (Sigma -Aldrich Chemie, Steinheim)

- Magermilchpulver (Trade Service International, Zeven)
- Magnesiumchlorid (Qiagen, Hilden)
- Methanol (Universitätsklinikum, Aachen)
- Natriumazid (Merck, Darmstadt)
- Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)
- Natriumfluorid (Merck, Darmstadt)
- Natrium-Heparin, Liquemin N 5000 (Roche, Mannheim)
- Natriumnitrit (Sigma -Aldrich Chemie, Steinheim)
- Natrium-ortho-Vanadat (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- Pefabloc SC (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Ponceau-S-Lösung (Fluka, Buchs, CH)
- Propidiumiodid (Sigma -Aldrich Chemie, Steinheim)
- Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- Protein Assay Farbstoff-Konzentrat (BioRad Laboratories, München)
- Protein-Leiter, biotinyliert (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Natrium-Pyrithion (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- Quazinon (Calbiochem, Darmstadt)
- Raf-1 kinase Inhibitor I (Calbiochem, Darmstadt)
- Ro-20-1724, 4-(3-Butoxy-4-methoxybenzyl)-imidazolidin-2-on  
(Calbiochem, Darmstadt)
- Rp-8-CPT-cAMPS, 8-(4-Chlorophenylthio) Adenosin-3', 5'-zyklisches  
Monophosphothioat (Biolog LSI, Bremen)
- Rp-8-pCPT-cGMPS, 8-(4-Chlorophenylthio) Guanosin-3', 5'-zyklisches  
Monophosphothioat (Biolog LSI, Bremen)
- SDS, Natriumdodecylsulfat (Merck, Darmstadt)
- Sp-8-CPT-cAMPS, 8-(4Chlorophenylthio) Adenosin-3', 5'-zyklisches  
Monophosphothioat (Biolog LSI, Bremen)
- TEMED, N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (Sigma-Aldrich  
Chemie, Steinheim)
- TPEN, N, N, N', N'-Tetrakis-(2-pyridylmethyl)-ethylendiamin (Sigma-  
Aldrich Chemie, Steinheim)
- TrisBase, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck, Darmstadt)
- Triethylamin (Merck, Darmstadt)



- TrisHCl, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (Merck, Darmstadt)
- Triton X-100 (Merck, Darmstadt)
- Tween 20 (Merck, Darmstadt)
- Zinksulfat, Heptahydrat (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)

#### **2.1.7. Kommerziell erhältliche Kits**

- cGMP-Enzymimmunoassay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA)
- Delfia cAMP Kit (PerkinElmer, Wellesley, USA)
- Komponentenset zur Herstellung eines TNF- $\alpha$ -ELISAs, human (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg)
- Komponenten-Set zur Herstellung eines IL-1 $\beta$ -ELISAs, human (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg)
- QiaQuick Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden)
- Reverse Transcription System (Promega, Heidelberg)
- RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden)
- Transcription Factor Assay Kit TransAM<sup>TM</sup> NF $\kappa$ B p50 (Active Motif, Rixenart, Belgien)

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Isolierung von mononukleären Zellen**

Die mononukleären Blutzellen (PBMC, umfassen Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten) wurden aus Vollblut isoliert, welches den Probanden in Röhrchen mit Natrium-Heparin (50 I.E./ml Blut) abgenommen wurde. Nach der Dichtegradientenzentrifugation des Vollblutes befinden sich die gewünschten PBMC in einer Interphase unterhalb des Plasmas, während sich die Granulozyten und Erythrozyten im Pellet befinden. Nach dem Waschen werden die isolierten Zellen in Medium suspendiert und auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Monozyten können durch Adhärenz auf der Oberfläche der Zellkulturschale aus PBMC angereichert werden.

**Lösungen:**

|                         |                                                                                                                            |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Waschlösung (pH 7,4)    | PBS                                                                                                                        |
| Dichtegradientenlösung  | Ficoll: 1,077 g/ml                                                                                                         |
| Kulturmedium: RPMI 1640 | zusetzen:<br>10% FCS (30 min. bei 56°C<br>inaktiviert)<br>2 mM L-Glutamin<br>100 U/ml Penicillin<br>100 µg/ml Streptomycin |

**Protokoll:**

- venöses Blut mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnen
- in einem 50 ml Röhrchen 25 ml Dichtegradienten-Lösung vorlegen und mit 25 ml der verdünnten Blutlösung überschichten
- 20 min. bei 600 g und 20°C zentrifugieren (dabei möglichst langsam beschleunigen und abbremsen)
- den hellen Ring der Interphaseschicht mit den mononukleären Zellen abnehmen
- die gewonnenen Zellen 3x mit PBS waschen (10 min. bei 300 g, RmT)
- die Zellen in RPMI 1640 Kulturmedium aufnehmen und die Zellzahl im Casy Zellzähler bestimmen

Die PBMCs werden nach der Isolierung für folgende Versuchsansätze verwendet:

- Messung der TNF- $\alpha$ -Sekretion ( $5 \times 10^5$  Zellen/ml in 24-Loch-Platten)
- Messung der IL-1 $\beta$ -Sekretion ( $5 \times 10^5$  Zellen/ml in 24-Loch-Platten)
- Bestimmung des Anteils lebender CD 14 positiver Zellen
- Analyse des Phosphodiesterase-Expressionsprofils

**Anreicherung von Monozyten:**

- zur Isolierung von Monozyten  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in runde Zellkulturschalen (für RT-PCR) oder  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in 24-Lochplatten (für TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -ELISA) aussäen
- Inkubation der Zellen für 1 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> zur Adhärenz der Monozyten
- die Zellen 3x mit warmem Medium waschen, um die nicht adhärennten Zellen zu entfernen

- Zellen in 10 ml Medium (runde Zellkulturschalen) bzw. in 1 ml Medium (24-Lochplatten) aufnehmen und für eine weitere Stunde im Brutschrank inkubieren

### 2.2.2. Zellkulturen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien werden stets bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen werden zweimal wöchentlich nach mikroskopischer Kontrolle in frisches Medium umgesetzt (1/10 Splitten). FCS wird stets für 30 min. bei 56°C inaktiviert. In der folgenden Übersicht sind sowohl die Kulturmedien als auch die Kulturzusätze den einzelnen Zelllinien zugeordnet:

| Zelllinie/primäre Zellen              | Kulturmedium | Zusätze                                                                                                   |
|---------------------------------------|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| THP-1                                 | RPMI 1640    | 10% FCS<br>2 mM L-Glutamin<br>100 U/ml Penicillin<br>100 µg/ml Streptomycin<br>5 µl/l β-Mercaptoethanol   |
| Mono-Mac1                             | RPMI 1640    | 10% FCS<br>2 mM L-Glutamin<br>100 U/ml Penicillin<br>100 µg/ml Streptomycin<br>1 mM Na-Pyruvat<br>1x NEAA |
| HEK293T                               | DMEM         | 10% FCS<br>100 U/ml Penicillin<br>100 µg/ml Streptomycin                                                  |
| RAW264.7<br>U937<br>Monozyten<br>PBMC | RPMI 1640    | 10% FCS<br>2 mM L-Glutamin<br>100 U/ml Penicillin<br>100 µg/ml Streptomycin                               |

### 2.2.3. Präparation der Zellkulturzusätze

ZnSO<sub>4</sub> wird zu einer 10 mM Stammlösung in Aqua ad iniectabilia gelöst. Die Lösung wird mittels eines Bakterienfilters (Porengröße 0,2 µm) steril filtriert und, wenn nötig, auf niedrigere Konzentrationen eingestellt. Für die Herstellung von S-Nitrosocystein (SNOC) wird je eine 200 mM Stammlösung Cystein und NaNO<sub>2</sub> vor Versuchsbeginn frisch hergestellt, da beide Substanzen empfindlich sind gegen Oxidation. Cystein und NaNO<sub>2</sub> werden im Verhältnis 1:1 vereinigt, vermischt und für 5 min. bei RmT inkubiert.

#### 2.2.4. RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wird mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen durchgeführt.

##### **Protokoll:**

- Für die Untersuchung der mRNA-Expression von Phosphodiesterase-Subtypen routinemäßige Kultivierung von Mono-Mac1, U937 und THP-1 Zellen für 3 Tage in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen
- Lyse der Monozyten und PBMC 1 h nach ihrer Isolierung für die Gewinnung von RNA
- für alle anderen Versuche  $3 \times 10^5$  Mono-Mac1-Zellen/ml in Zellkulturplatten (6-Loch) 24 h vor der Stimulation aussäen
- Lyse der Zellen und Isolierung der RNA erfolgt gemäß dem Protokoll des Herstellers

##### **Bestimmung des RNA-Gehaltes:**

Durch spektralphotometrische Messung der optischen Dichte läßt sich sowohl die Menge als auch die Reinheit der zuvor isolierten RNA quantifizieren. Während Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm ein Maximum ihrer Lichtabsorption aufweisen, befindet sich das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die absolute Extinktion der Lösung gegen Wasser bei 260 nm ist nach dem Lambert-Beer-Gesetz linear vom RNA-Gehalt abhängig, wohingegen der Quotient beider Extinktionswerte ein Maß für die Kontamination der Probe mit Proteinen darstellt (260 nm/280 nm, sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen). In eine Küvette mit 98 µl Aqua ad iniectionem werden 2 µl RNA-Probe gegeben und mittels eines Photometers der RNA-Gehalt unter Berücksichtigung der Verdünnung gemessen.

Gehaltsberechnung:

$\text{RNA } [\mu\text{g/ml}] = \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \times \text{Extinktion bei 260 nm}$

### 2.2.5. Reverse Transkription

Mit Hilfe der RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion) lassen sich spezifisch cDNA-Sequenzen amplifizieren. Da die RNA nicht direkt als Template in einer PCR eingesetzt werden kann, muß sie zunächst in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben werden. Hier wird zur cDNA-Gewinnung das Reverse Transkription-System der Firma Promega verwendet. Das Protokoll wird etwas modifiziert.

#### **Lösungen:**

| Reagenz:                               | Volumen: | Endkonzentration: |
|----------------------------------------|----------|-------------------|
| MgCl <sub>2</sub> , 25 mM              | 4 µl     | 5 mM              |
| Reverse Transkriptionspuffer, 10x      | 2 µl     | 1x                |
| dNTP Mix, 10 mM                        | 2 µl     | 1 mM              |
| RNasin Ribonuklease Inhibitor, 40 U/µl | 0,5 µl   | 1 U/µl            |
| AMV Reverse Transkriptase, 25 U/µl     | 0,6 µl   | 0,75 U/µl         |
| Random-Primer, 0,5 mg/ml               | 1 µl     | 25 ng/µl          |
| RNA-Probe (1 µg)                       | x µl     | 0,05µg/µl         |
| Aqua ad iniectionabilia                | 20-x µl  | --                |

#### **Protokoll:**

- die RNA-Probe mit Aqua ad iniectionabilia in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß geben und für 10 min. auf 70°C erhitzen
- die Proben auf Eis abkühlen und die übrigen Komponenten auf Eis in das Reaktionsgefäß pipettieren
- den Ansatz für 1 h bei 42°C inkubieren und anschließend für 5 min. auf 95°C erhitzen
- bei -20°C einfrieren oder weiterverwenden

### 2.2.6. Hot-Start-PCR

Die RT-PCR ist eine molekularbiologische Methode zum qualitativen Nachweis der Expression von mRNA. Bei der PCR werden Primer verwendet, die an die Template-DNA hybridisieren. Von deren 3'-Ende aus synthetisiert die DNA-Polymerase den neuen DNA-Doppelstrang. Die hier verwendete Hot-Start-Taq-DNA-Polymerase von Qiagen wird erst in der initialen Aufheizphase aktiviert.

Folgende Primer werden verwendet:

| Name:                                                          | Sequenzen:                                                                                                                       |
|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>PDE-1A*</b><br>645bp                                        | <b>Sense-Primer:</b><br>5'-AGCAAGTGGAGAGCATAGTCTG-3'<br><b>Antisense-Primer:</b><br>5'-TAGGGCCATGGTCCACCGATAATG-3'               |
| <b>PDE-1B*</b><br>420 bp                                       | <b>Sense-Primer:</b><br>5'-ATGGTGCACTGCCTGTCTGGAGAT-3'<br><b>Antisense-Primer:</b><br>5'-TTGGTTGGGTGGCTGATGTCAGC-3'              |
| <b>PDE-1C*</b><br>539 bp                                       | <b>Sense-Primer:</b><br>5'-TGGAGGCCCTGGAAGTGGGATAC-3'<br><b>Antisense-Primer:</b><br>5'-ACATTGTCCAGCGATGATGGAGG-3'               |
| <b>PDE-3A</b><br>(Accession Nr. M91667)<br>1582 bp             | <b>Sense-Primer:</b><br>5'-TTCAACCAGTGATTGAGATTCTGACAGTGG-3'<br><b>Antisense-Primer:</b><br>5'-CAGTACTAAGAGCAAAAGCTGCTTAGTTGG-3' |
| <b>PDE-3B</b><br>(Accession Nr. NM000922.2)<br>482 bp          | <b>Sense-Primer:</b><br>5'-TATCACAATCGTATACATGCCACAGA-3'<br><b>Antisense-Primer:</b><br>5'-TTTAAGATCCGTAGCAAGGTTGC-3'            |
| <b>PDE-4A*</b><br>725 bp                                       | <b>Sense-Primer:</b><br>5'-TGCACTAGATGCAGTGTTACGGA-3'<br><b>Antisense-Primer:</b><br>5'-CAGAGCTTCCTCGACTCCTGACA-3'               |
| <b>PDE4B*</b><br>406 bp                                        | <b>Sense-Primer:</b><br>5'-CAGGTCCTTCGCAACATGGTACA-3'<br><b>Antisense-Primer:</b><br>5'-GAATCTTCCTCATCGAGAGTCAGT-3'              |
| <b>β-Actin</b><br>(Lagoo-Deenadayalan et al., 1993)<br>1200 bp | <b>Sense-Primer:</b><br>5'-ATGGATGATGATATCGCCGCG-3'<br><b>Antisense-Primer:</b><br>5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGGGCC-3'       |
| <b>TNF-α</b><br>(Pennica et al., 1984)<br>700 bp               | <b>Sense-Primer:</b><br>5'-ATGAGCACTGAAAGCATGATCCGG-3'<br><b>Antisense-Primer:</b><br>5'-GCAATGATCCCAAAGTAGACCTGCCC-3'           |
| <b>IL-1β</b><br>(Auron et al., 1984)<br>810 bp                 | <b>Sense-Primer:</b><br>5'-ATGGCAGAAGTACCTGAGCTCGC-3'<br><b>Antisense-Primer :</b><br>5'-TTAGGAAGACACAAATTGCATGGTGAAGTCACTAGT-3' |

\*Primer Sequenzen entnommen aus Ückert et al., 2001

**Lösungen:**

| Reagenz:                            | Volumen: | Endkonzentration: |
|-------------------------------------|----------|-------------------|
| Aqua ad iniectabilia                | 31,5 µl  | --                |
| 10x PCR-Puffer                      | 5,0 µl   | 1x                |
| dNTP, 10 mM                         | 3,0 µl   | 0,2 mM            |
| β-Actin Sense-Primer,<br>20 µM      | 0,25 µl  | 0,1 µM            |
| β-Actin Antisense-<br>Primer, 20 µM | 0,25 µl  | 0,1 µM            |
| PDE Sense-Primer,<br>100 µM         | 1,0 µl   | 2 µM              |
| PDE Antisense-Primer,<br>100 µM     | 1,0 µl   | 2 µM              |
| cDNA                                | 2 µl     | 100 ng            |
| HotStar-Taq-Polymerase<br>(5 U/µl)  | 0,5 µl   | 0,05 U/µl         |

weitere Primerkonzentrationen:

| Reagenz:                                     | Volumen: | Endkonzentration: |
|----------------------------------------------|----------|-------------------|
| TNF-α Sense- und<br>Antisense-Primer, 20 µM  | 2,0 µl   | 0,8 µM            |
| IL-1β Sense- und Antisense-<br>Primer, 10 µM | 0,75 µl  | 0,15 µM           |

**Protokoll:**

- Die β-Actin-mRNA in jeder Probe untersuchen
- Mastermix auf Eis in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß vermischen
- 48 µl Mastermix und 2 µl cDNA in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße pipettieren (50 µl Gesamtansatz je Gefäß)

Die Proben werden unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

|                          |              |
|--------------------------|--------------|
| 1 Initiale Denaturierung | 95°C 15 min. |
| 2 Denaturierung          | 95°C 40 s    |
| 3 Primer-Hybridisierung  | 60°C 1 min.  |
| 4 Polymerisation         | 72°C 3 min.  |
| 5 Finale Elongation      | 72°C 5 min.  |

- Für die Amplifizierung aller Genprodukte die Schritte 2-4 35 mal wiederholen (35 Zyklen) mit Ausnahme von PDE-1B, -3B und -4B (31 Zyklen) und TNF- $\alpha$  (28 Zyklen)
- Die Proben entweder direkt elektrophoretisch auftrennen (2.2.7.) oder bei 4°C aufbewahren

### 2.2.7. Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Reaktionsprodukte werden mittels Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Da das Gel bereits Ethidiumbromid enthält, lagert sich das Ethidiumbromid in die Nukleinsäure-Doppelstränge ein, so dass die aufgetrennten DNA-Banden im UV-Licht sichtbar gemacht und anhand eines Längenstandards identifiziert werden können.

#### **Lösungen:**

|                                                   |                                                                           |
|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| <b>TBE-Puffer (pH 7,5):<br/>(Tris-Borat-EDTA)</b> | 10,8 g TrisBase<br>5,5 g Borsäure<br>0,74 g EDTA<br>ad 1000 ml Aqua dest. |
| <b>6x Ladepuffer</b>                              | 3 $\mu$ l/10 $\mu$ l Probe                                                |
| <b>1 kb Leiter</b>                                | 6 $\mu$ l                                                                 |

#### **Protokoll:**

- Gelschlitten in Gießhalterung einspannen und austarieren
- 1% oder 1,5% (PDE-1C, -3B, -4A) Agarose mit TBE-Puffer (1x) in der Mikrowelle aufkochen bis Agarose schlierenfrei gelöst ist
- evtl. Verdunstungen mit Aqua dest. ausgleichen
- 4  $\mu$ l auf 100 ml Gel der Ethidiumbromidstocklösung (10 mg/ml) dazugeben
- in den Gelschlitten luftblasenfrei eingießen (Höhe ca. 0,5 cm) und 20-30 min. erstarren lassen
- Gelschlitten mit Gel in die Elektrophoresekammer einsetzen
- Kammer mit TBE-Puffer (1x) auffüllen bis das Gel vollständig bedeckt ist
- je 10  $\mu$ l der PCR-Amplifikate mit 3  $\mu$ l 6x Gel-Ladepuffer in einer Mikrotiterplatte mischen und davon 10  $\mu$ l in eine Geltasche pipettieren
- 6  $\mu$ l DNA-Längenstandard (1kb Leiter) in die beiden äußeren Geltaschen geben



- elektrische Spannung anlegen und ca. 1 h bei 90 V auftrennen
- Auswertung und Dokumentation mit Hilfe der BioRad Universal Hood

### 2.2.8. Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann spezifisch und sensitiv die Expression zellulärer Oberflächenproteine untersucht werden. Im Folgenden wird das Durchführungsprotokoll für die Bestimmung der CD14-Expression beschrieben. Der verwendete CD14-Antikörper ist mit dem Farbstoff FITC (Fluoresceinisothiocyanat) konjugiert. Anhand des ausgesendeten Fluoreszenzlichts des Farbstoffes FITC kann im Durchflusszytometer der Anteil CD 14 positiver Zellen (Monozyten/Makrophagen) in der Kultur ermittelt werden. Als Kontrolle dienen Ansätze, die nur mit der Isotypkontrolle inkubiert werden. Gleichzeitig erfolgte die Bestimmung vitaler Zellen mit Propidiumiodid.

#### **Lösungen:**

|                        |                                |
|------------------------|--------------------------------|
| <b>Antikörper</b>      | Maus-anti-human-CD14-FITC      |
| <b>Isotypkontrolle</b> | Maus-IgG <sub>2b,k</sub> -FITC |
| <b>Toxizitätstest</b>  | Propidiumiodidlösung           |

#### **Protokoll:**

- $1 \times 10^6$  Zellen in FACS-Röhrchen geben und zentrifugieren (5 min., 300 g)
- Überstand verwerfen und Pellet in 1 ml PBS waschen
- Zellen in 1 ml PBS resuspendieren
- Zellsuspension mit 0,5 µg Maus-anti-human-CD14-FITC oder Maus-IgG<sub>2b,k</sub>-FITC für 20 min. bei RmT inkubieren
- 1 ml PBS hinzufügen, mischen und zentrifugieren (5 min., 300 g)
- Zellen in 1 ml PBS resuspendieren
- Zellsuspension mit 10 µg Propidiumiodid für 20 min. im Kühlschrank inkubieren
- Im Durchflusszytometer den Anteil vitaler CD14<sup>+</sup>-Zellen bestimmen

### 2.2.9. ELISA (Enzyme linked immuno sorbent assay)

Die ELISA-Technik ist ein sensitives Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Proteinen. Das Zytokin bindet an einen unkonjugierten Primärantikörper, der an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte gekoppelt ist. Im nächsten Schritt erfolgt die Zugabe des Biotin-konjugierten Sekundärantikörpers und des Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugats. Streptavidin bindet Biotin mit einer hohen Affinität. Nach Inkubation und mehrmaligem Waschen wird das zugegebene Substrat durch die Peroxidase in einen Farbstoff umgesetzt. Die Extinktion wird photometrisch gegen einen Leerwert bestimmt und ist der Zytokinkonzentration direkt proportional. Für die Bestimmung der TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Sekretion wurden ELISA-Komponentensets der Firma BD Biosciences/Pharmingen verwendet. Für die Bestimmung der Zytokinsekretion wurde der Zellkulturüberstand verwendet. Für die Bestimmung der Zytokinkonzentration im Zelllysats wurden die Monozyten lysiert. Werte, die unter dem niedrigsten Standard von TNF- $\alpha$  (7,8 pg/ml) oder IL-1 $\beta$  (15,8 pg/ml) lagen werden als nicht detektierbar angesehen (n.d.).

#### **Lösungen:**

| <b>Lysepuffer</b>                  |               |
|------------------------------------|---------------|
| TrisHCl, pH 7,4                    | 50 mM         |
| Triton X-100                       | 1% (v/v)      |
| NaCl                               | 300 mM        |
| EDTA                               | 5 mM          |
| Natriumazid                        | 0,02% (w/v)   |
| <b>Pefabloc</b>                    | <b>0,5 mM</b> |
| <b>Protease Inhibitor Cocktail</b> | <b>0,5 mM</b> |

Fettgedrucktes frisch dazugeben

#### **Protokoll:**

- für die Gewinnung von Zelllysats Monozyten 2x mit eiskaltem PBS waschen, bei 300 g für 5 min. zentrifugieren
- Zellen in 100  $\mu$ l Lysepuffer aufnehmen
- Inkubation auf Eis für 15 min., Zellsuspension kurz mit Ultraschall beschallen und 1:4 mit Assay Diluent verdünnen

- für die Bestimmung der TNF- $\alpha$ -Konzentration aus dem Zellkulturüberstand von Mono-Mac1  $5 \times 10^5$  Zellen/ml 24 h vor der Stimulation aussäen
- Proben (Überstand und Lysat) bei  $-80^\circ\text{C}$  lagern
- Beschichtung der Mikrotiterplatten und Durchführung des ELISAs nach Anleitung des Herstellers
- Für die Messung der Zytokinkonzentration aus Zelllysate Assay Diluent 1:4 mit Lysepuffer verdünnen und Zytokine für die Standardreihe gemäß der Vorschrift darin verdünnen

#### **2.2.10. NF $\kappa$ B/p50-Transkriptionsfaktorassay**

Das Prinzip des NF $\kappa$ B-Transkriptionsfaktorassays (Active Motif) zur Bestimmung des DNA-gebundenen p50-Anteils in Mono-Mac1-Zellen beruht darauf, dass NF $\kappa$ B spezifisch an Oligonukleotidsequenzen auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte bindet. Es wird ein Primärantikörper hinzugegeben, der p50 erkennt. Durch Zugabe des Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpers wird mit Zugabe des Substrates ein Farbumschlag erzielt. Die Extinktion wird photometrisch gegen einen Leerwert bestimmt und ist dem gebundenen p50 direkt proportional.

#### ***Lösungen und Protokoll:***

- $3 \times 10^6$  Mono-Mac1-Zellen/ml 24 h vor Beginn der Stimulation in 24-Lochplatten aussäen und bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubieren
- Durchführung des Assays nach Anleitung des Herstellers

#### **2.2.11. Messung der zellulären cAMP-Konzentration**

Die zelluläre cAMP-Konzentration wird mit einem zeitauflösenden Fluoroimmunoassay der Firma PerkinElmer quantifiziert. Das Prinzip des Assays basiert darauf, dass das cAMP der Probe und Europium markiertes cAMP um eine limitierte Anzahl von Bindungsstellen an einen cAMP-spezifischen Antikörper konkurrieren. Eine Verstärkerlösung führt zur Dissoziation gebundenen Europiums und zur Bildung von stark

fluoreszierenden Europium-Chelaten. Das bedeutet, die Fluoreszenz der Probe ist umgekehrt proportional zur cAMP-Konzentration.

### **Lösungen und Protokoll:**

Die Durchführung erfolgt gemäß der Anleitung mit einigen Modifikationen:

- $4 \times 10^6$  Mono-Mac1-Zellen/ml in PPN-Röhrchen aussäen
- Nach der Stimulation erfolgt die Zentrifugation bei 300 g für 5 min., Überstand abnehmen, mit 1 ml PBS waschen und erneut zentrifugieren
- Überstand abnehmen, Probe in 100 µl Probenpuffer (siehe Probenpuffer in Abschnitt 2.2.14.) aufnehmen, 4 mM IBMX hinzufügen
- Lyse der Zellen durch Zugabe von 25 µl DELFIA-Lysepuffer
- Inkubation für 10 min. bei RmT
- Inkubation der DELFIA cAMP-Mikrotiterplatte mit anti-cAMP Serum für 30 min.
- Platte 3x Waschen
- 50 µl Standard und Probe auf die Platte pipettieren und für 30 min. inkubieren
- Zugabe der Europium-Tracerlösung und Inkubation für 30 min.
- Platte 4x Waschen
- Zugabe der Verstärkerlösung und Messung nach 5 min. Inkubation
- die in Abschnitt 3.2.1. untersuchten cAMP-Konzentrationen werden nach dem Protokoll Abschnitt 2.2.12. aufgereinigt.

| <b>Messparameter zur Detektion der Fluoreszenz</b> |                 |
|----------------------------------------------------|-----------------|
| Fluorometer                                        | Tecan Ultra 384 |
| Messmodus                                          | Fluoreszenz     |
| Anregungswellenlänge                               | 340 nm          |
| Emissionswellenlänge                               | 612 nm          |
| Anzahl der Blitze/s                                | 10              |
| Integrationszeit                                   | 400 µs          |
| Verzögerungszeit                                   | 400 µs          |
| Spiegelauswahl                                     | Dichroic 2      |
| Mehrere Messungen/Kavität                          | Quadratisch 3x3 |

### 2.2.12. Messung der zellulären cGMP-Konzentration

Die cGMP-Konzentration wird mit einem Enzymimmunoassay der Firma Cayman Chemical quantifiziert. Der Assay basiert auf der konkurrierenden Bindung zwischen freiem cGMP der Probe und Acetylcholinesterase-konjugiertem cGMP an anti-cGMP-Antikörper auf der Plattenoberfläche. Ellman's Reagenz wird in einer enzymatischen Reaktion der Acetylcholinesterase und einer darauf folgenden chemischen Reaktion zu einem gelben Farbstoff umgesetzt. Dieser absorbiert bei 412 nm. Die Aufreinigung der Proben erfolgt nach Endres et al., 1991.

#### **Lösungen:**

|                |         |
|----------------|---------|
| <b>EDTA</b>    | 30 mM   |
| <b>Ethanol</b> | absolut |

#### **Protokoll:**

- $2,5 \times 10^6$  Mono-Mac1-Zellen/ml in PPN-Röhrchen aussäen
- Zellen nach der Stimulation in 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- Zentrifugation der Zellen bei 3000 g und 4°C für 5 min.
- Zelllyse durch Zugabe von 200 µl 30 mM EDTA, Vermischen und Erhitzen der Proben für 5 min. bei 95°C
- Zugabe von 800 µl Ethanol abs. und homogenisieren für 1 min.
- Inkubation auf Eis für 30 min.
- Zentrifugation für 10 min. bei 3000 g bei 4°C
- Überstand abnehmen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführen
- bei 56°C in einem Thermomixer die Probe mit Stickstoff begasen
- nach der Evaporation die Probe in 90 µl Probenpuffer des Herstellers resuspendieren und bei -20°C lagern
- Durchführung des cGMP-Assays nach Anleitung des Herstellers

### 2.2.13. Spezifischer Nachweis der PKA- und PKG-Aktivität

Die PKA- und PKG-Aktivität im Zelllysats wird durch  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  vermittelte Phosphorylierung der spezifischen Substrate Kemptide (PKA, Kemp et al., 1977) und BPDEtide (PKG, Colbran et al., 1992) ermittelt.

**Lösungen:**

| <b>Lysepuffer</b>      |          |
|------------------------|----------|
| HEPES                  | 50 mM    |
| NaVO <sub>3</sub>      | 1 mM     |
| Triton X-100           | 1% (v/v) |
| IBMX                   | 0,1 mM   |
| Protease Inh. Cocktail | 5 mM     |
| NaF                    | 50 mM    |
| β-Glycerophosphat      | 5 mM     |
| EDTA                   | 2 mM     |

| <b>5x Kinasepuffer</b> |        |
|------------------------|--------|
| TrisHCl, pH 7,5        | 250 mM |
| MgCl <sub>2</sub>      | 25 mM  |

**Protokoll:**

- 5x10<sup>6</sup> Mono-Mac1-Zellen/ml in PPN-Röhrchen aussäen
- nach der Stimulation Zellen 2x mit eiskaltem PBS waschen und bei 4°C für 10 min. bei 300 g zentrifugieren
- Überstand abnehmen, Zugabe von 375 µl Lysepuffer, Inkubation auf Eis für 10 min.
- Zentrifugation bei 13000 g für 10 min.
- Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen und Proteinkonzentration der Probe bestimmen (2.2.15.)
- folgende Komponenten auf Eis zügig zusammen pipettieren:

| <b>5x Kinasepuffer</b>                         | <b>1x</b> |
|------------------------------------------------|-----------|
| <b>ATP (kalt)</b>                              | 0,1 mM    |
| <b>[γ-<sup>32</sup>P]-ATP (110 TBq/mmol)</b>   | 185 kBq   |
| <b>Kemptide oder BDEtide</b>                   | 300 µM    |
| <b>Rp-8-pCPT-cGMPS oder<br/>Rp-8-CPT-cAMPS</b> | 100 µM    |
| <b>Protein</b>                                 | 50 µg     |
| <b>H<sub>2</sub>O ad 50 µl</b>                 | x µl      |

- Probe homogenisieren, kurz herunterzentrifugieren und für 30 min. bei 30°C auf einem Thermomixer inkubieren
- die gesamten 50 µl der Probe auf P81-Phosphozellulose Filterpapier pipettieren
- Filterpapier 3x mit 75 mM ortho-Phosphorsäure in einem Becherglas waschen
- Filterpapiere in einem Becherglas mit Aceton waschen und in einem Plexiglasgefäß trocknen

- Filterpapiere in ein 6 ml Gefäß mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit geben
- im Szintillationszähler Packard Tricarb 2100TR die Menge eingebauter Radioaktivität in *disintegrations per minute* (dpm, radioaktive Zerfälle/Minute) messen

#### 2.2.14. Messung der Phosphodiesterase-Aktivität

Die Phosphodiesterase-Aktivität wird mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gemessen. Das Prinzip der Messung im vorliegenden Experiment beruht auf dem Transport einer mobilen Phase (polares Laufmittel) über eine Säule, die aus hydrophoben Alkylgruppen besteht. Erreicht die Probe die Säule tritt sie je nach Grad der Hydrophobizität unterschiedlich lang mit den Alkylgruppen in Wechselwirkung bis sie von der Säule eluiert wird. Die eluierte Probe wird photometrisch von einem Detektor erfaßt.

| Probenpuffer, pH 7,35            |        |
|----------------------------------|--------|
| HEPES                            | 25 mM  |
| Glukose                          | 5 mM   |
| NaCl                             | 120 mM |
| KCl                              | 5,4 mM |
| CaCl <sub>2</sub>                | 1,3 mM |
| MgCl <sub>2</sub>                | 1 mM   |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 1 mM   |

- Experimentelle Bedingungen für die Detektion von cAMP und cGMP mittels HPLC:

| Stationäre Phase | Eurosil Bioselect 300-C <sub>18</sub> -Säule                                                  |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Mobile Phase     | 8% Methanol (v/v), 25 mM TEAF pH 6,5 (cAMP)<br>4,5% Methanol (v/v), 25 mM TEAF, pH 6,5 (cGMP) |
| Flussrate        | 1 ml/min.                                                                                     |
| Probenvolumen    | 40 µl                                                                                         |
| Druck            | 20 MPa                                                                                        |
| Integrator       | Eurochrom 2000, Chromatography Software                                                       |
| Detektor         | A0293 variabler Wellenlängen Detektor, cAMP<br>258 nm, cGMP 252 nm                            |

**Protokoll:**

- je  $1 \times 10^6$  Mono-Mac1-Zellen in 250  $\mu$ l Probenpuffer aufnehmen und für 10 s (Intervalleinstellung) in einem Volumen von 5 ml unter Kühlung mit Ultraschall lysieren
- pro Versuchsansatz sechs 1,5 ml Reaktionsgefäße mit je 250  $\mu$ l Lysat ( $1 \times 10^6$  Zellen) befüllen ( $3 \times t_0$ ,  $3 \times t_{60}$ )
- Zugabe der Stimulantien und Inhibitoren
- Starten der Reaktion durch Zugabe von 50  $\mu$ M cAMP oder cGMP
- Inkubation der  $t_{60}$ -Proben bei 37°C in einem Thermomixer unter Schütteln (450 rpm) für 1 h, direktes Abstoppen der  $t_0$ -Proben durch Erhitzen bei 95°C für 5 min. unter Schütteln
- Abstoppen der  $t_{60}$ -Proben durch Erhitzen bei 95°C für 5 min. ebenfalls unter Schütteln, Proben auf Eis abkühlen
- Zentrifugation bei 7000 g für 5 min.
- 100  $\mu$ l Überstand in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführen und 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O dazugeben, vermischen und bei -20°C lagern
- Detektion von cGMP und cAMP und ihrer Hydrolyseprodukte mittels HPLC
- Auswertung durch Bildung der Differenz zwischen detektierbarem Cyclonukleotid bei  $t_0$  und  $t_{60}$

**Bestimmung der Aktivität von PDE-1, -3 und -4:**

- Das Lysat vor Zugabe der Substrate für 30 min. mit den entsprechenden Phosphodiesterase-Inhibitoren (Chlorpromazin für PDE-1, Quazinon für PDE-3 und Ro-20-1724 für PDE-4) in An- oder Abwesenheit von 50  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> inkubieren:

| PDE-Inhibitoren              | Einzel-PDE-Aktivität |       |       |    |
|------------------------------|----------------------|-------|-------|----|
|                              | PDE-1                | PDE-3 | PDE-4 |    |
| 170 $\mu$ M Chlorpromazin    | --                   | +     | +     | +  |
| 6 $\mu$ M Quazinon           | +                    | --    | +     | +  |
| 20 $\mu$ M Ro-20-1724        | +                    | +     | --    | +  |
| 50 $\mu$ M ZnSO <sub>4</sub> | +/-                  | +/-   | +/-   | -- |



**Reversibilität der Phosphodiesterase-Aktivität:**

- Das Lysat vor Zugabe der Substrate mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  für 30 min. inkubieren und anschließend mit 250  $\mu\text{M}$  TPEN für eine weitere Stunde inkubieren
- Mono-Mac1-Zellen nach 2 Tagen routinemäßiger Kultivierung für 24 h mit 25  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  und 50  $\mu\text{M}$  Pyrithion inkubieren und lysieren
- Lysat für 1 h mit 250  $\mu\text{M}$  TPEN inkubieren

**2.2.15. Proteingehaltsbestimmung**

Die Proteingehaltsbestimmung wird nach der Methode von Bradford durchgeführt und erfolgt mit Hilfe des BioRad-Reagenz. Dabei werden 2  $\mu\text{l}$  Probe in 798  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt, mit 200  $\mu\text{l}$  BioRad-Reagenz versetzt und 5 min. inkubiert, bevor die Messung der Extinktion bei 595 nm im Vergleich zum Blindwert (Lysepuffer mit  $\text{H}_2\text{O}$  und Bradford-Reagenz) erfolgt. Die Werte werden mit Hilfe einer Eichgeraden ausgewertet. Diese wird mittels einer BSA-Verdünnungsreihe (1  $\mu\text{g/ml}$  bis 25  $\mu\text{g/ml}$ ) erstellt.

**2.2.16. Probenaufbereitung für Westernblot-Untersuchungen**

Für die Westernblot-Untersuchungen werden Mono-Mac1-Zellen verwendet.

**Lösung:**

| <b>4x Probenpuffer:</b>       |
|-------------------------------|
| 3,55 ml $\text{H}_2\text{O}$  |
| 1,25 ml 0,5 mM TrisHCL, pH6,8 |
| 2,5 ml Glycerin               |
| 2 ml 10% SDS                  |
| 0,2 ml 0,5% Bromphenolblau    |

**Protokoll:**

- die Zellkonzentration auf  $3 \times 10^6$  Zellen/ml einstellen und je 2 ml in jedes PPN-Röhrchen pipettieren
- Nach Inkubation mit den Stimulantien die Zellsuspension für 10 min. bei 300 g zentrifugieren
- Zellpellet in 100  $\mu\text{l}$  Lysepuffer pro  $3 \times 10^6$  Zellen aufnehmen, vermischen
- zusätzlich durch Beschallung für 3 s (Intervalleinstellung) mit einer Ultraschall-Sonotrode lysieren

- Zugabe von 5 µl β-Mercaptoethanol/100 µl Probenpuffer
- 5 min. bei 95°C aufkochen, auf Eis abkühlen lassen und bei -20°C lagern

### 2.2.17. Westernblotting

Beim Westernblotting handelt es sich um ein sehr empfindliches und spezifisches Verfahren zum Nachweis von Proteinen. Die Proteine werden in der Gelelektrophorese scharf aufgetrennt, mit Hilfe der Spezifität eines Antikörpers erkannt und mit der Empfindlichkeit eines Enzymassays sichtbar gemacht.

#### 2.2.17.1. Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese

Bei der eindimensionalen Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen werden die Proteine in Gegenwart von SDS aufgrund ihres Molekulargewichtes in Richtung Anode aufgetrennt. SDS ist ein anionisches Detergenz, das sich an die Proteine anlagert. Da sich die negativen Ladungen der SDS-Moleküle gegenseitig abstoßen, dissoziieren alle Proteine in ihre Untereinheiten, so dass die einzelnen Polypeptidketten alle ähnliche Ladung/Masse-Verhältnisse aufweisen. Der Zusatz von β-Mercaptoethanol bewirkt eine Reduktion von Disulfidbrücken der Polypeptidketten.

#### **Lösungen:**

|                                  |                                                                                       |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>APS (10%):</b>                | 0,1 g APS<br>ad 1 ml Aqua dest.                                                       |
| <b>SDS (20%):</b>                | 200 g SDS<br>ad 1000 ml Aqua dest.<br>bei 70-80°C lösen                               |
| <b>Elektrodenpuffer:</b>         | 3,03 g TrisBase<br>14,4 g Glycin<br>5 ml SDS (20%ige Lösung)<br>ad 1000 ml Aqua dest. |
| <b>Sammelgelpuffer (pH 6,8):</b> | 6,05 g TrisHCl<br>2 ml SDS (20%ige Lösung)<br>ad 100 ml Aqua dest.                    |
| <b>Trenngelpuffer (pH 8,8):</b>  | 18,15 g TrisHCl<br>2 ml SDS (20%ige Lösung)<br>ad 100 ml Aqua dest.                   |
| <b>Biotinylierte Leiter</b>      | 1:4 mit 1x Probenpuffer<br>verdünnen                                                  |

| <b>Sammelgel, 5%, 1 Gel (1,5 mm), 6 ml</b> |         |
|--------------------------------------------|---------|
| <b>Aqua dest.</b>                          | 1,83 ml |
| <b>Sammelgelpuffer</b>                     | 708 µl  |
| <b>Acrylamidlösung</b>                     | 390 µl  |
| <b>APS (10%)</b>                           | 30 µl   |
| <b>TEMED</b>                               | 3 µl    |

| <b>Trenngel, 7,5%, 1 Gel (1,5 mm), 9 ml</b> |         |
|---------------------------------------------|---------|
| <b>Aqua dest.</b>                           | 4,41 ml |
| <b>Trenngelpuffer</b>                       | 2,34 ml |
| <b>Acrylamidlösung</b>                      | 2,25 ml |
| <b>APS (10%)</b>                            | 90 µl   |
| <b>TEMED</b>                                | 9 µl    |

**Protokoll:**

- Glasplatten in die Gießhalterung einbauen
- Komponenten für das Trenngel (7,5%) mischen, luftblasenfrei zwischen die Glasplatten pipettieren, mit Aqua dest. überschichten und ca. 20 min. polymerisieren lassen
- Wasser abgießen, die Bestandteile für das Sammelgel (5%) mischen, luftblasenfrei auf das Trenngel pipettieren, Gelkamm einsetzen und ca. 20 min. polymerisieren lassen
- Glasplatten mit dem Gel in der Halterung befestigen und diese in die Elektrophoresekammer stellen
- Elektrodenpuffer in die Kammer füllen und den Gelkamm entfernen
- Geltaschen mit Hilfe einer Spritze und Kanüle spülen
- Proben vor dem Auftragen für 5 min. bei 95°C erhitzen und 20 µl Probe/Tasche ( $6 \times 10^5$  Zellen/Tasche) pipettieren
- Biotinylierte Proteinleiter 1:4 mit Probenpuffer verdünnen, für 5 min. bei 95°C erhitzen und 15 µl/Tasche auftragen
- leere Geltaschen mit Probenpuffer beladen, um einen gleichmäßigen Gellauf zu gewährleisten.
- Proteine bei 150-200 V für ca. 1-1,5 h auftrennen

**2.2.17.2. Wet-Blot-Verfahren**

Nach Abschluß der Gelelektrophorese erfolgt der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine proteinbindende Nitrozellulose-Membran. Bei diesem Verfahren kommt ein Blotsandwich zum Einsatz, bestehend

aus Schwammkissen, Filterpapier, Nitocellulosemembran, Gel, Filterpapier und Schwammkissen.

**Protokoll:**

- Membran, Filterpapier, Schwammkissen und Gel kurz in Transferpuffer equilibrieren
- Blotsandwich zusammenbauen und in Blotmodul einsetzen
- Kühleinheit hinzufügen und Transferpuffer einfüllen
- bei 100 V und 350 mA für ca. 1 h blotten

**2.2.17.3. Färbung der transferierten Proteine**

Um den Erfolg des Blottingvorgangs kontrollieren zu können, werden die transferierten Proteine unspezifisch mit Ponceau-S-Färbelösung sichtbar gemacht. Hierfür wird die Membran für ein bis zwei Minuten in die Färbelösung gelegt. Die rot gefärbten Banden erfolgreich transferierter Proteine werden durch Waschen mit Wasser sichtbar. Um die Membran wieder zu entfärben, wird sie für ca. 10 min. mit TBS/T-Puffer gewaschen.

**Lösungen:**

|                          |                                                       |
|--------------------------|-------------------------------------------------------|
| <b>TBS (1x) (pH 7,5)</b> | 2,5 g TrisBase<br>8,8 g NaCl<br>ad 1000 ml Aqua dest. |
| <b>TBS/T (pH 7,5):</b>   | 1 ml Tween 20<br>ad 1000 ml TBS(1x)                   |
| <b>Proteinfärbung</b>    | 20 ml Ponceau                                         |

**2.2.17.4. Spezifische Nachweisreaktion der Proteine durch Antikörper**

Vor Beginn der Nachweisreaktion muß die geblottete Membran mit einer Proteinlösung abgesättigt werden, um ein unspezifisches Binden von Antikörpern zu vermeiden. Anschließend erfolgt die Zugabe der Antikörper zur Detektion der Proteinmenge oder des Proteinphosphorylierungsgrades.

**Lösungen:**

|                                      |                                                                                                                                                                              |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>5%iger Blockingpuffer:</b>        | 2,5 g Magermilchpulver<br>ad 50 ml TBS/T                                                                                                                                     |
| <b>Primärantikörper<br/>1:1000</b>   | Kaninchen-anti-human-c-Raf<br>Kaninchen-anti-human-phospho-c-Raf (338)<br>Kaninchen-anti-human-phospho-c-Raf (259)<br>Maus-anti-human-PKAc                                   |
| <b>Sekundärantikörper<br/>1:1000</b> | Pferd-anti-Maus-Sekundärantikörper-HRP<br>konjugiert<br>Ziege-anti-Biotin-Sekundärantikörper-HRP<br>konjugiert<br>Ziege-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper-<br>HRP konjugiert |
| <b>Detektionslösung</b>              | 0,5 ml LumiGLO (20x)<br>0,5 ml Peroxid (20x)<br>ad 10 ml Aqua dest.                                                                                                          |

**Protokoll:**

- Membran über Nacht bei 4°C mit Blockingpuffer inkubieren
- Membran mit TBS/T waschen und für 2 h mit dem Primärantikörper inkubieren und anschließend 3x mit TBS/T waschen
- die Membran mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei RmT inkubieren und 3x mit TBS/T waschen
- zur Detektion die Membran für 1 min. in die Detektionslösung legen
- Membran in eine Belichtungskassette überführen
- Röntgenfilm belichten und entwickeln

### 3.2.18. Identifizierung und Charakterisierung von DNA-Bindeproteinen

Zur Identifizierung von Transkriptionsfaktoren und der von ihnen gebundenen DNA-Elemente, werden Zellkernextrakte aus Zellen benötigt, die die nachzuweisenden Proteine synthetisieren. Ebenso müssen die sequenzspezifischen Elemente des Promotors im Genom bekannt sein.

#### 3.2.18.1. Präparation von Zellkernextrakten

Es wurden Zellkernextrakte aus Mono-Mac1-Zellen gewonnen, um eine funktionelle Bindung der im Extrakt enthaltenen Transkriptionsfaktoren

p50 und p65 an eine bestimmte Sequenz (NFκB-Konsensussequenz) des TNF-α-Promotors zu untersuchen.

**Lösungen:**

| <b>PBS-Vanadat-Puffer</b> |       |
|---------------------------|-------|
| PBS                       | 10 ml |
| 100 mM Na-Vanadat         | 10 µl |

| <b>Puffer A</b>               |               |
|-------------------------------|---------------|
| HEPES-KOH, pH 7,6             | 10 mM         |
| KCl                           | 15 mM         |
| MgCl <sub>2</sub>             | 1 mM          |
| <b>DTT</b>                    | <b>0,1 mM</b> |
| <b>Protease Inh. Cocktail</b> | <b>0,5 mM</b> |
| <b>Pefablock</b>              | <b>0,5 mM</b> |
| <b>Na-Vanadat</b>             | <b>100 µM</b> |

| <b>Puffer C</b>               |               |
|-------------------------------|---------------|
| HEPES-KOH, pH 7,6             | 20 mM         |
| NaCl                          | 420 mM        |
| EDTA                          | 0,2 mM        |
| Glycerin                      | 25% (v/v)     |
| <b>Protease Inh. Cocktail</b> | <b>0,5 mM</b> |
| <b>Pefablock</b>              | <b>0,5 mM</b> |
| <b>Na-Vanadat</b>             | <b>100 µM</b> |

Fettgedruckte Komponenten werden erst kurz vor Gebrauch der Lösungen hinzugefügt.

**Protokoll:**

- Mono-Mac1-Zellen ( $2 \times 10^7$  Zellen) 24 h vor Beginn des Versuches in Zellkulturflaschen aussäen
- Zellen nach der Stimulation in 15 ml Röhrchen überführen und bei 300 g bei 4°C für 10 min. zentrifugieren
- 2x mit 5 ml eiskaltem PBS-Vanadatpuffer waschen und bei 300 g bei 4°C für 10 min. zentrifugieren
- nach Entfernen des Puffers Zellen mit 1 ml Puffer A pro Röhrchen lysieren
- Überführung des Zelllysates in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß und für 10 min. auf Eis stellen, um die Zellen Anschwellen zu lassen
- die Zelllösung nach der Inkubation 5 min. bei 700 g und 4°C zentrifugieren
- Überstand abnehmen und verwerfen.

- das Pellet durch vorsichtiges Invertieren mit 80 µl Puffer C resuspendieren
- Zellkernmembranaufschluss durch eine zwanzigminütige Inkubation der Lösung auf Eis
- Zentrifugation der Lösung bei 15000 g bei 4°C für 10 min.
- Überstand abnehmen und in kleinen Aliquots nach Schockfrost in flüssigem Stickstoff bei -80°C einfrieren
- Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 3.2.11.)

### 2.2.18.2. Radioaktive Markierung der DNA-Oligonukleotide

#### Hybridisierung

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

| NFκB-Konsensussequenz |                             |
|-----------------------|-----------------------------|
| Sense                 | 5'-TGCCTGGGAAAGTCCCCTCA-3'  |
| Antisense             | 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGG-3' |

#### Protokoll:

- In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß je 10 µl des Sense-Oligonukleotids (10 pmol/µl) und Antisense-Oligonukleotids zusammen pipettieren und vermischen
- für 5 min. bei 95°C erhitzen, Probe so lange stehen lassen, bis sie auf RmT heruntergekühlt ist

#### Radioaktive Markierung und Reinigung der Sonde

Zur Herstellung einer Sonde werden die Oligonukleotide radioaktiv durch eine Endmarkierung mit  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  markiert. Die Oligonukleotide besitzen 5'-Überhänge, so dass in einer Auffüllreaktion mit Klenowfragment das  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  eingebaut werden kann.

**Lösungen:**

|                                         |               |
|-----------------------------------------|---------------|
| (-ATP)-Nukleotidmix (10 mM/dNTP)        | 2,5 µl (5mM)  |
| 10x Klenowpuffer                        | 2 µl (1x)     |
| Oligonukleotid 1 pmol/µl                | 1 µl (1 pmol) |
| H <sub>2</sub> O                        | 8,5 µl        |
| Klenowfragment (300 U)                  | 1 µl          |
| [α- <sup>32</sup> P]-ATP (110 TBq/mmol) | 5 µl (2 MBq)  |

**Protokoll:**

- die in der Tabelle aufgeführten Komponenten zusammen pipettieren, vermischen und kurz herunterzentrifugieren
- für 30 min. bei 30°C in einem Thermomixer inkubieren
- Nach der Einbaureaktion Abtrennung nicht eingebauten [α-<sup>32</sup>P]-ATP mittels QiaQuick Nucleotid Removal Kit
- Zugabe von 200 µl Puffer PN zum Sondenmix und vermischen
- den gesamten Mix auf die Säule geben und 1 min. bei 2000 g zentrifugieren
- 2x mit 500 µl Puffer PE (mit Ethanol) waschen und ebenfalls bei 2000 g für 1 min. zentrifugieren
- bei 10000 g noch mal ohne Puffer für 1 min. zentrifugieren
- die Sonde durch Zugabe von 100 µl Wasser eluieren, 1 min. bei RmT inkubieren, die Säule auf ein beschriftetes 1,5 ml Reaktionsgefäß setzen
- bei 12000 g für 1 min. zentrifugieren
- 1 µl in ein 6 ml Gefäß pipettieren und im Szintillationszähler Packard Tricarb 2100TR die Menge eingebaute Radioaktivität in *counts per minute* (cpm) nach Cherenkov messen

**2.2.18.3. Bandshiftreaktion**

Zur Charakterisierung der Protein-DNA-Komplexe werden die Kernextrakte mit radioaktiv markiertem Oligonukleotid inkubiert.

**Lösungen:**

| 10x Bandshiftpuffer |           |
|---------------------|-----------|
| Tris-HCl, pH 7,4    | 100 mM    |
| MgCl <sub>2</sub>   | 50 mM     |
| KCl                 | 1 M       |
| Glycerin            | 50% (v/v) |
| DTT                 | 100 mM    |



**Protokoll:**

- Für die Bandshiftreaktion folgende Reagenzien zusammenpipettieren:

|                                |                 |
|--------------------------------|-----------------|
| <b>10x Bandshiftpuffer</b>     | 2 µl            |
| <b>dIdC (1µg/µl)</b>           | 1 µl            |
| <b>Kernextrakt</b>             | 20 µg           |
| <b>NFκB-Sonde</b>              | 30000-40000 cpm |
| <b>H<sub>2</sub>O ad 20 µl</b> | x µl            |

- Inkubation des Ansatzes für 30 min. bei RmT, anschließend auf Eis stellen

#### 2.2.18.4. Nachweis der DNA-Bindeproteine mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Protein-DNA-Komplexe werden mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Angaben für 1 Gel:

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| <b>10x TBE-Puffer</b> | 900 µl |
| <b>Glycerin</b>       | 2,7 ml |
| <b>Acrylamid</b>      | 6 ml   |
| <b>Aqua dest</b>      | 53 ml  |
| <b>TEMED</b>          | 58 µl  |
| <b>APS (10%)</b>      | 288 µl |

**Protokoll:**

- Zusammenbau der Gelgießapparatur
- Lösungen für 1 Gel zusammenpipettieren
- Kamm einsetzen, Gel 1 h lang auspolymerisieren lassen
- Gelkammer in Gelelektrophoreseapparatur einspannen
- Pufferkammern mit 0,25x TBE (siehe 3.2.7.) befüllen, Kamm herausziehen, Taschen gut mit Puffer durchspülen
- Vorelektrophorese für 20-30 min. bei 200 V
- Bandshiftproben mit 6 µl Ladepuffer (siehe 3.2.7.) versetzen, Proben in Taschen mit 200 µl Gel Tip Spitzen pipettieren
- 6 µl des Molekulargewichtsgrößenstandard auftragen, um die Laufweite der Proben zu kontrollieren
- Gelelektrophorese bei 200 V für ca. 3 h durchführen

**Geltrocknung und Entwicklung**

- Gelkammer aus der Apparatur herausnehmen, obere Glasplatte und Abstandshalter entfernen
- Filterpapier auf das Gel auflegen, Gel mit Filterpapier von der Glasplatte ablösen und mit Haushaltsfolie auf der Gelseite luftblasenfrei abdecken
- Gel in die Trocknungsapparatur einlegen, Temperatur auf 70°C einstellen, Pumpe anstellen und Gel für ca. 2 h unter Vakuum trocknen lassen
- Gel auf Raster der Filmkassette mit Klebeband fixieren
- Phosphorscreen mit der weißen Seite zum Licht auf dem Leuchttisch 5 min. lang löschen
- Phosphorscreen mit der weißen Seite auf das Gel legen
- Gelkassette schließen und über Nacht belichten lassen
- Phosphorscreen zügig mit der weißen Seite nach oben in den Phosphoimager einlegen
- Auswertung des Phosphoscreens erfolgt mit der Software Quantity one/Personal FX

**2.2.19. Auswertung**

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse basieren auf der Auswertung einer Reihe von Einzelexperimenten. Die Ergebnisse sind dabei als Mittelwerte aus mehreren Einzelresultaten (Anzahl der Einzelexperimente  $n = x$ ) dargestellt und der Standardfehler der Mittelwerte ( $\pm$  S.E.M.) ist angegeben. Sind repräsentative Experimente gezeigt, so ist dies gesondert erwähnt. Die statistische Auswertung der Experimente erfolgt mit dem Student t-test und wird wie folgt dargestellt: \*  $p < 0,05$ . Wenn höhere Signifikanzen vorliegen, wird aus Gründen der Übersichtlichkeit auf eine genauere Darstellung verzichtet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Analyse der Phosphodiesterase-Expression in Monozyten

Für die Untersuchung des Einflusses von Zinkionen auf die Phosphodiesterase-Aktivität wurde zunächst die Phosphodiesterase-Expression in humanen Monozyten, PBMC und verschiedenen monozytären Zelllinien untersucht. Die Tabelle 3.1. zeigt das Ergebnis der Analyse des Phosphodiesterase-Expressionsprofils mittels RT-PCR. Monozyten exprimieren PDE-1, PDE-3 und PDE-4 (Gantner et al., 1997; Essayan, 2001). Daher wurden alle bekannten Subtypen der Phosphodiesterase-Familie 1, 3 und 4 in Monozyten und PBMC

| Subtyp | PBMC | Monozyten | U937 | THP-1 | Mono-Mac1 |
|--------|------|-----------|------|-------|-----------|
| PDE-1A | -    | -         | -    | -     | -         |
| PDE-1B | +    | +         | +    | +     | +         |
| PDE-1C | (+)  | (+)       | +    | -     | +         |
| PDE-3A | -    | -         | -    | -     | -         |
| PDE-3B | +    | +         | -    | +     | +         |
| PDE-4A | +    | +         | -    | +     | +         |
| PDE-4B | +    | +         | +    | +     | +         |
| PDE-4C | -    | -         | -    | -     | -         |
| PDE-4D | +    | +         | +    | +     | +         |

**Tab. 3.1.: mRNA-Expression von Phosphodiesterase-Subtypen in Monozyten, PBMC und monozytären Zelllinien**

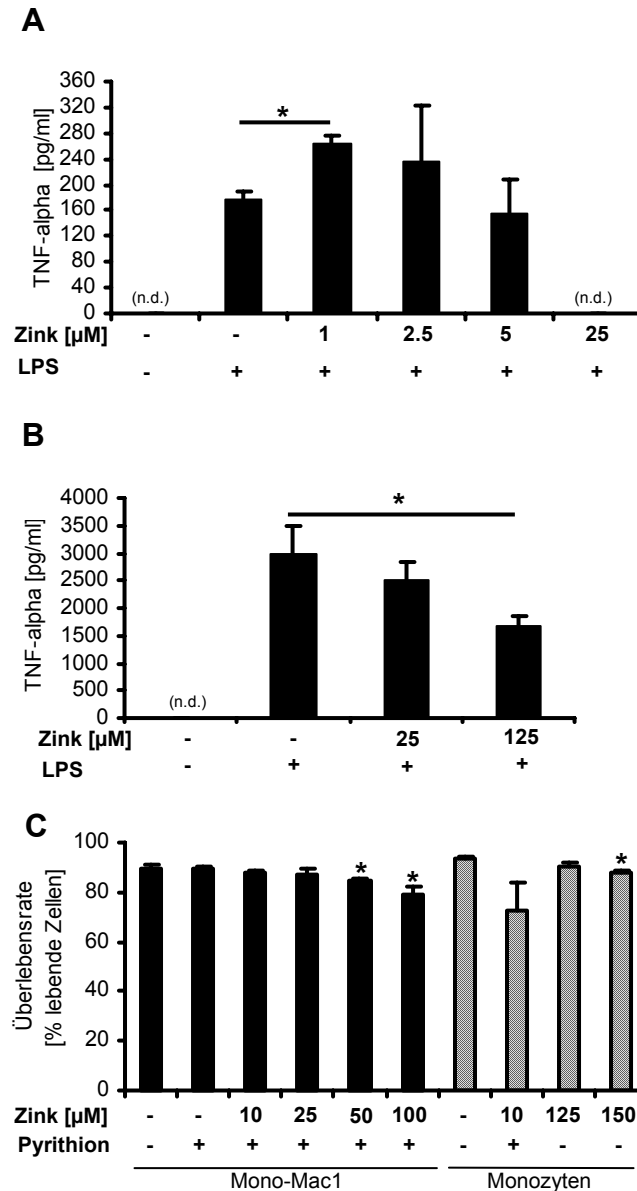
+, die mRNA des Phosphodiesterase-Subtyps wurde detektiert, -, die mRNA des Phosphodiesterase-Subtyps wurde nicht detektiert, (+), eine schwache mRNA-Expression des Phosphodiesterase-Subtyps wurde detektiert. Die mRNAs der Phosphodiesterase-Subtypen 1, 3 und 4 wurde mittels RT-PCR detektiert. Humane Prostata-cDNA diente als Positivkontrolle für alle Subtypen der PDE-1 und PDE-4. Humane Colon-cDNA diente als Positivkontrolle für PDE-3A. Zusammenfassung aus n=3 unabhängigen Experimenten.

untersucht und den Zelllinien U937, THP-1 und Mono-Mac1 vergleichend gegenüber gestellt. Ziel dieses Vergleiches war es eine geeignete monozytäre Zelllinie zu finden, die als Modellsystem für die Studie der Phosphodiesterase-Aktivität in Monozyten dienen könnte.

Die Phosphodiesterasen der Subtypen PDE-1A, -3A und -4C wurden weder in einer der Zelllinien noch in Monozyten oder PBMC exprimiert. Ein übereinstimmendes Phosphodiesterase-Expressionsmuster wurde in PBMC und Monozyten sowie in der Zelllinie Mono-Mac1 detektiert. Sie alle exprimieren PDE-1C, -3B, -4A, -4B und -4D mRNA. Ein ähnliches Expressionsmuster wurde zwar in den Zelllinien THP-1 und U937 detektiert, die Subtypen PDE-3B und PDE-4A wurden jedoch nicht in U937 Zellen und PDE-1C nicht in THP-1 Zellen exprimiert. Die monozytäre Zelllinie Mono-Mac1 wurde daher als Zellkultur-Modellsystem gewählt, um den Einfluss von Zinkionen, auf die Phosphodiesterase-Aktivität in Monozyten studieren zu können.

### **3.2. Der Einfluss von Zinkionen auf die LPS-induzierte Sekretion von TNF- $\alpha$**

In dieser Studie sollte der Mechanismus des inhibitorischen Einflusses der Zinksupplementation auf die LPS-induzierte Produktion proinflammatorischer Monokine untersucht werden. Daher wurde die LPS-induzierte Sekretion von TNF- $\alpha$  in Gegenwart verschiedener Zinkkonzentrationen und Pyrithion untersucht. Hierzu wurden Mono-Mac1-Zellen für 4 Stunden mit 250 ng/ml LPS in Gegenwart von 1  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M oder 25  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> zusammen mit dem Ionophor Pyrithion (50  $\mu$ M) inkubiert (Abb. 3.1. A). Die TNF- $\alpha$ -Sekretion in den Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA quantifiziert. Die Stimulation von Mono-Mac1-Zellen mit Zink wirkte sich in Abhängigkeit der verwendeten Konzentration sehr unterschiedlich auf die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Sekretion in Mono-Mac1-Zellen aus. Während 1  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> mit Pyrithion synergistisch mit LPS wirkte und die TNF- $\alpha$ -Sekretion signifikant erhöhte, bewirkte 25  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> mit Pyrithion eine Suppression der TNF- $\alpha$ -Sekretion.



**Abb. 3.1: Der Einfluss von Zinkionen auf die LPS-induzierte Sekretion von TNF- $\alpha$ .**

**A**, Mono-Mac1-Zellen wurden für 4 Stunden mit LPS (250 ng/ml) und  $\text{ZnSO}_4$  in Gegenwart von Pyrithion (50  $\mu\text{M}$ ) stimuliert. TNF- $\alpha$  wurde mittels ELISA detektiert. Dargestellt ist der Mittelwert von  $n=3$  unabhängigen Experimenten, die in Doppelansätzen gemessen wurden. **B**, Primäre Monozyten wurden mit  $\text{ZnSO}_4$  für 1 Stunde vorinkubiert und für weitere 24 Stunden mit LPS (250 ng/ml) inkubiert. Abgebildet ist der Mittelwert von  $n=4$  verschiedenen Spendern, die in Doppelansätzen gemessen wurden. **C**, Die Zellen wurden mit  $\text{ZnSO}_4$  und Pyrithion (50  $\mu\text{M}$ ) für 24 Stunden inkubiert. Die Toxizität der verschiedenen Zinkkonzentrationen wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Abgebildet ist der Mittelwert von  $n=4$  verschiedenen Spendern (Student t-test \*  $p < 0,05$ ).

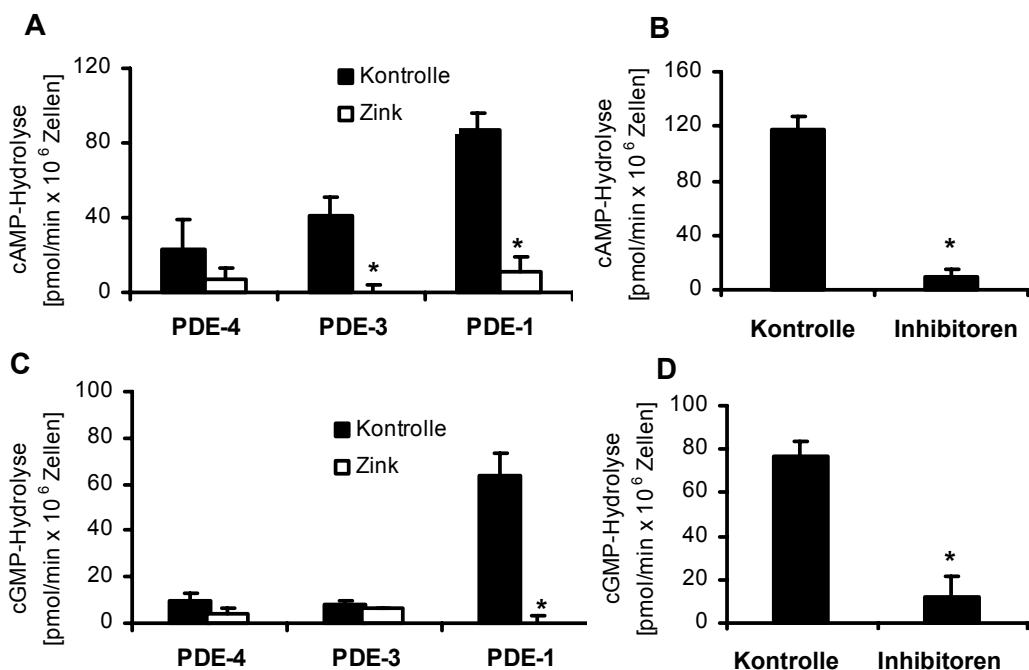
Ein möglicher inhibitorischer Effekt von Zinkionen auf die TNF- $\alpha$ -Sekretion in primären Monozyten ohne Pyrithion wurde in Abb. 3.1. B untersucht. Monozyten wurden für 1 Stunde mit 25 oder 125  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> inkubiert und für weitere 24 Stunden mit 250 ng/ml LPS stimuliert. Eine Zinksupplementation ohne Pyrithion suppressierte erst bei 125  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Sekretion in Monozyten signifikant. Verzichtet man also auf das Pyrithion so werden höhere Zinkkonzentrationen benötigt, um einen inhibitorischen Effekt von Zink auf die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Sekretion zu erzielen. Um sicherzustellen, dass die verminderte TNF- $\alpha$ -Sekretion nicht das Ergebnis eines zytotoxischen Effekts von Zink ist, wurde die Integrität der Membran in der Durchflusszytometrie von Mono-Mac1-Zellen und primären Monozyten nach Propidiumiodidfärbung überprüft. Wie in Abb. 3.1. C dargestellt, war keine der in dieser Arbeit verwendeten Zinkkonzentrationen zelltoxisch, weder für die Zelllinie Mono-Mac1 noch für primäre Monozyten.

### 3.3. Inhibition der Phosphodiesterasen durch Zink

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass Cyclonukleotide die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Sekretion in Monozyten antagonisieren können. Phosphodiesterase-4-Inhibitoren verhindern die cAMP-Hydrolyse und führen zu einem intrazellulären Anstieg der cAMP-Konzentration, die wiederum die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Sekretion in humanen Monozyten und PBMC suppressiert (Yoshimura et al., 1997; Seldon et al., 1995; Verghese et al., 1995; Greten et al., 1995; Barnette et al., 1998). Dieser antiinflammatorische Effekt ist auch für cGMP mittels cGMP-Analoga in primären humanen Monozyten und murinen Makrophagen gezeigt worden (Seldon et al., 1995; Kiemer et al., 2000). Zinkionen beeinflussen die intrazelluläre cGMP-Konzentration durch Inhibition der Phosphodiesterase in PC-12 Pheochromocytom Zellen (Wätjen et al., 2001).

Zunächst wurde untersucht, ob Zink im Zelllysate von Monozyten die Aktivität der Phosphodiesterasen inhibieren kann. Da Monozyten PDE-1, -3 und -4 exprimieren, wurde die Aktivität jeder einzelnen Phosphodiesterase-Familie untersucht. Hierzu wurde Zelllysate von Mono-

Mac1-Zellen mit spezifischen Inhibitoren für PDE-1 (Chlorpromazin), PDE-3 (Quazinon) oder PDE-4 (Ro-20-1724) inkubiert, so dass jeweils die Aktivität von zwei Phosphodiesterase-Familien inhibiert wurde. Mittels HPLC wurde dann der Abbau der Substrate cAMP oder cGMP (50  $\mu$ M) in ihre 5'-Monophosphate analysiert. In Mono-Mac1-Zellen wurde sowohl die cAMP- als auch die cGMP-Hydrolyse hauptsächlich durch PDE-1 katalysiert (Abb. 3.2. A und C). PDE-3 und PDE-4, die ausschließlich cAMP hydrolysieren, zeigten dagegen nur eine geringe Aktivität (Abb. 3.2. A).



**Abb. 3.2.: Inhibition der cAMP- und cGMP-Hydrolyse durch Zink in Mono-Mac1-Lysat**

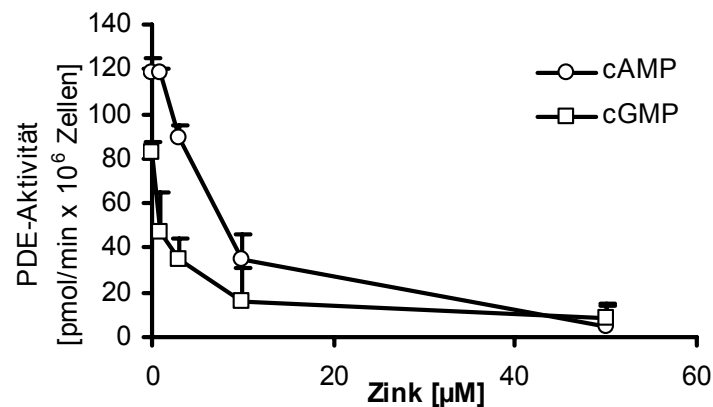
Die Aktivitäten der einzelnen Phosphodiesterase-Familien wurden nach Substratzugabe von 50  $\mu$ M cAMP oder cGMP mittels HPLC gemessen. Es ist der Mittelwert von mindestens n=3 unabhängigen Experimenten dargestellt (Student t-test \*  $p < 0,05$ ). **A** und **C**, Das Lysat wurde mit 50  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> zusammen mit den Phosphodiesterase-Inhibitoren 30 Minuten vor Substratzugabe von cAMP (**A**) und cGMP (**C**) vorinkubiert. **B** und **D**, Hydrolyse von cAMP (**B**) und cGMP (**D**) in unbehandelten Kontrolllysaten im Vergleich zur Phosphodiesterase-Aktivität in Gegenwart von Inhibitoren für alle 3 Phosphodiesterase-Familien.

Für den cGMP-Abbau in Mono-Mac1-Zellen ist allein die PDE-1 verantwortlich, da PDE-3 und PDE-4 cGMP nicht hydrolysieren können (Abb. 3.2. C). Durch die Zugabe von allen drei Phosphodiesterase-Inhibitoren in Abb. 3.2. B und D wurde sichergestellt, dass keine weitere Phosphodiesterase-Familie am Cyclonukleotidabbau beteiligt war. Sowohl die cAMP- (Abb. 3.2. B) als auch die cGMP-Hydrolyse (Abb. 3.2. D) wurde vollständig inhibiert. Um zu untersuchen, ob Zinkionen die Aktivität der Phosphodiesterasen in Monozyten hemmen können, wurde Mono-Mac1-Zelllysate mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  für 30 Minuten vor Zugabe der Substrate inkubiert. Die cAMP-Hydrolyseaktivität von PDE-1, -3 und -4 (Abb. 3.2. A) und die cGMP-Hydrolyseaktivität von PDE-1 (Abb. 3.2. C) wurde durch Zink im Lysat vollständig inhibiert. Zink beeinflusst also sowohl die cAMP-abbauenden Phosphodiesterasen PDE-1, -3 und -4, als auch die cGMP-Hydrolyseaktivität der PDE-1. Zink stellt damit einen unspezifischen Phosphodiesterase-Inhibitor dar, der in Monozyten die Enzymaktivität aller vorhandenen Phosphodiesterase-Familien inhibieren kann.

Die Untersuchung der cAMP- und cGMP-Hydrolyse in Gegenwart verschiedener Zinkkonzentrationen zeigte, in welchem Konzentrationsbereich Zink die Phosphodiesterase-Aktivität in Mono-Mac1-Zellen inhibierte. Die cAMP- und cGMP-Hydrolyse in Mono-Mac1-Zellen wurde konzentrationsabhängig durch Zink inhibiert, wobei die halbmaximale Inhibition für den cAMP-Abbau bei einer Zinkkonzentration von 8  $\mu\text{M}$  lag, während sie für den cGMP-Abbau mit 3  $\mu\text{M}$  noch etwas niedriger lag (Abb. 3.3.).

Um zu untersuchen, ob die Inhibition der Phosphodiesterasen durch Zink reversibel ist, wurde das Mono-Mac1-Lysat zunächst mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  inkubiert. Wie Abb. 3.4. A zeigt, führte dies zu einer Inhibition der cAMP- und cGMP-Hydrolyse. Nach einer zusätzlichen Inkubation dieses Zink-behandelten Lysates mit 250  $\mu\text{M}$  des spezifischen Zinkchelators TPEN, konnte die Aktivität der Phosphodiesterasen wiederhergestellt werden. Anders verhielt sich die Aktivität der Phosphodiesterasen nach Inkubation intakter Mono-Mac1-Zellen mit 25  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  und 50  $\mu\text{M}$  Pyridithion.

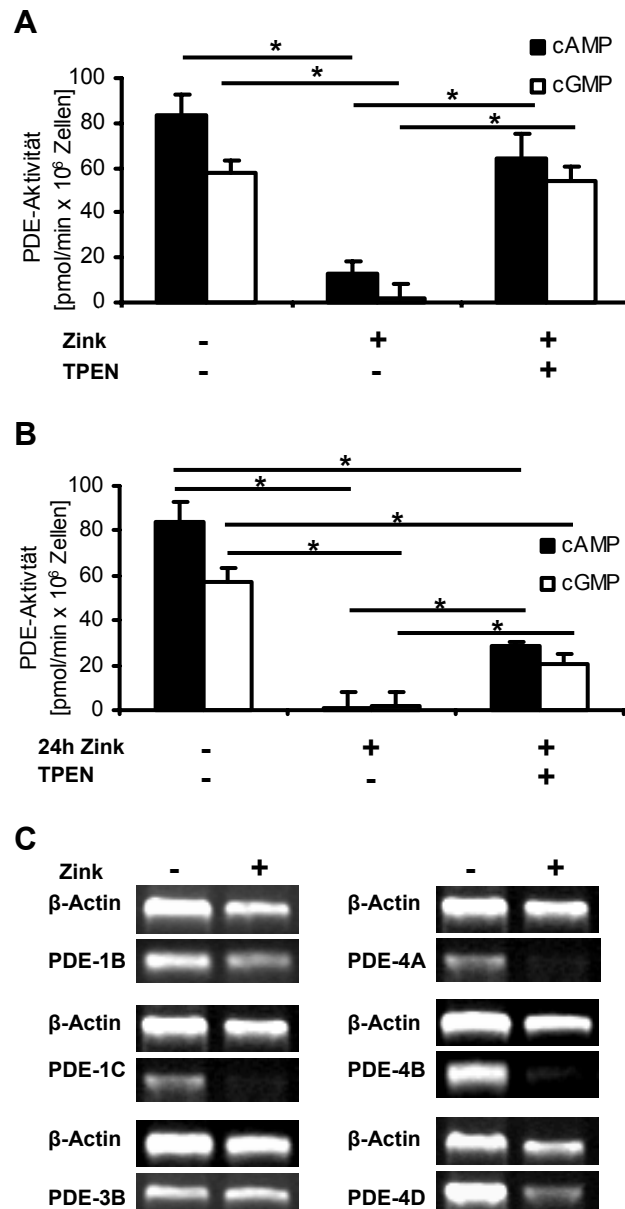




**Abb. 3.3.: Konzentrationsabhängiger Effekt von Zink auf die Cyclonukleotid-hydrolyse**

Mono-Mac1-Lysat wurde mit 1 µM, 3 µM, 10 µM und 50 µM ZnSO<sub>4</sub> für 30 Minuten vor Substratzugabe von cAMP und cGMP vorinkubiert. Der Abbau der Cyclonukleotide wurde mittels HPLC detektiert. Abgebildet sind die Mittelwerte von mindestens n=3 unabhängigen Experimenten.

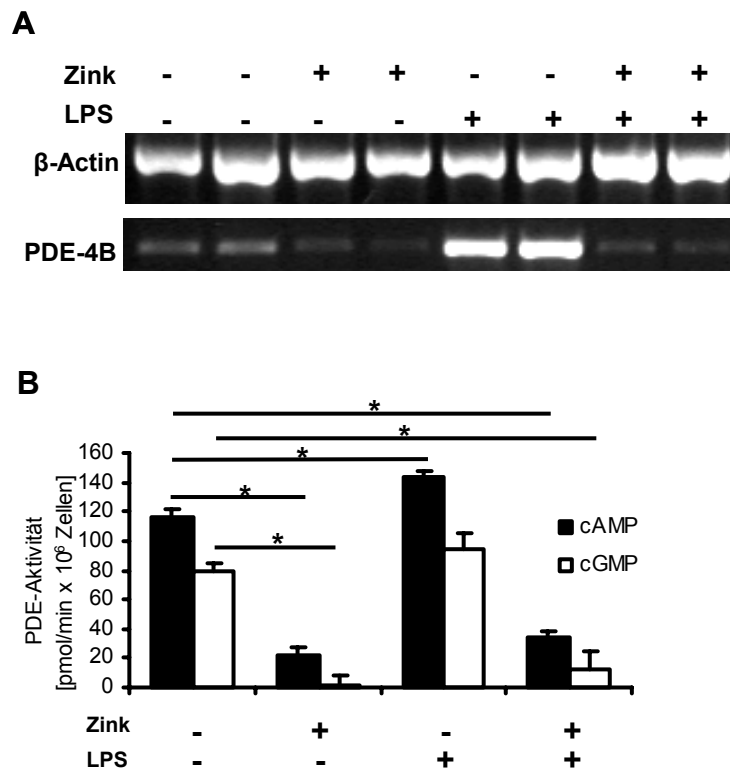
Im Zelllysats, das nach 24 Stunden Stimulation gewonnen wurde, fand sich die Aktivität der Phosphodiesterasen ebenfalls supprimiert (Abb. 3.4. B). Die Phosphodiesterase-Aktivität ließ sich aber nach Inkubation mit 250 µM TPEN nicht vollständig, sondern nur zu ca. 30% wiederherstellen (Abb. 3.4. B). Dies weist darauf hin, dass Zinkionen nicht nur die Enzymaktivität der Phosphodiesterasen inhibieren, sondern auch die Menge an zellulären Phosphodiesterasen negativ beeinflussen konnten. Daher wurde die mRNA-Expression der Phosphodiesterase-Subtypen mittels RT-PCR in Mono-Mac1-Zellen untersucht. Die Inkubation der Zellen mit 25 µM ZnSO<sub>4</sub> und 50 µM Pyrithion für 6 Stunden führte zu einer Suppression der Phosphodiesterase-Subtypen PDE-1C, PDE-4A und PDE-4B (Abb. 3.4. C). Die mRNA-Expression von PDE-1B und PDE-4D wurde nur schwach supprimiert, während die Expression der PDE-3B durch Zink nicht beeinflusst wurde. Die zu 30% wiederhergestellte Phosphodiesterase-Aktivität nach Inkubation mit TPEN (Abb. 3.4. B) dürfte also von PDE-1B, -3B und -4D stammen, deren Enzymaktivität durch Zink reversibel inhibiert wurde.



**Abb. 3.4.: Effekt von Zinkionen auf die Phosphodiesterase-Aktivität und mRNA-Expression**

Der cAMP- und cGMP-Abbau in Mono-Mac1-Lysat wurde mittels HPLC gemessen (**A** und **B**). Es ist der Mittelwert von mindestens n=3 unabhängigen Experimenten dargestellt (Student t-test \* p < 0,05). **A**, Das Lysat wurde mit 50 µM ZnSO<sub>4</sub> für 30 Minuten vor Substratzugabe vorinkubiert (Zink). Das Zink-behandelte Lysat wurde für 1 Stunde mit 250 µM TPEN inkubiert (TPEN). **B**, Intakte Mono-Mac1-Zellen wurden 24 Stunden vor der Lyse mit ZnSO<sub>4</sub> (25 µM) und Pyrithion (50 µM) stimuliert (24h Zink). Das Lysat von Zink-stimulierten Zellen wurde für 1 Stunde mit 250 µM TPEN inkubiert (TPEN). **C**, Mono-Mac1-Zellen wurden mit ZnSO<sub>4</sub> (25 µM) und Pyrithion (50 µM) für 6 Stunden stimuliert. Die mRNA-Expression der Phosphodiesterase-Subtypen wurde mittels RT-PCR detektiert. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis von n=3 unabhängigen Experimenten.

Die mRNA-Expression der PDE-4B wird in Monozyten durch die Stimulation mit LPS erhöht (Ma et al., 1999). Die Folge ist eine gesteigerte cAMP-Hydrolyse. In diesem Zusammenhang ist der inhibitorische Effekt von Zink auf die mRNA-Expression der PDE-4B von besonderem Interesse. Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob die Zink-induzierte Inhibition der Phosphodiesterasen und im speziellen die Inhibition der PDE-4B, einen möglichen Mechanismus darstellt, um LPS-induzierte Signale zu antagonisieren. Die Untersuchung der PDE-4B-mRNA-Expression nach Stimulation mit 250 ng/ml LPS führte erwartungsgemäß auch in der Zelllinie Mono-Mac1 zu einer Positiv-Regulation der PDE-4B-mRNA (Abb. 3.5. A).



**Abb. 3.5.: Zink supprimiert die LPS-vermittelte Positiv-Regulation der PDE-4B**

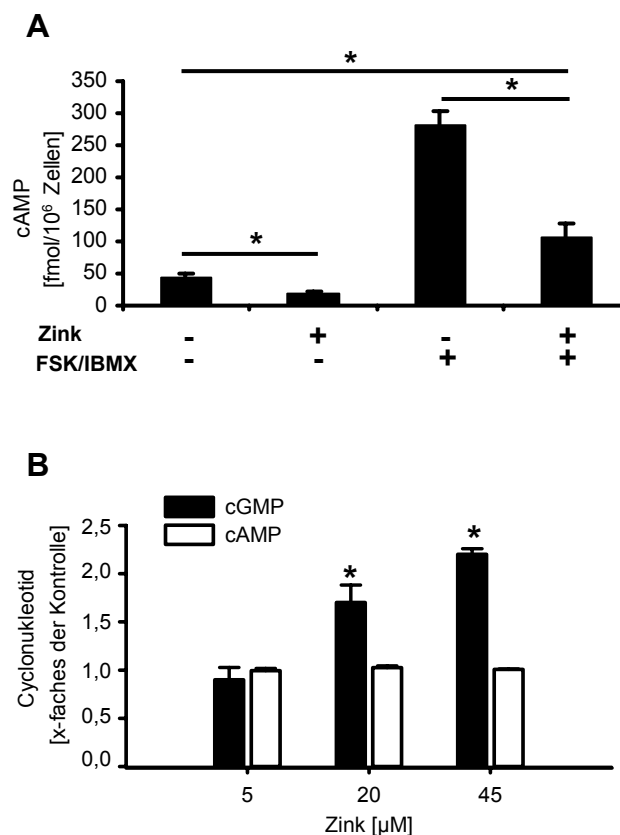
Mono-Mac1-Zellen wurden mit  $\text{ZnSO}_4$  (25  $\mu\text{M}$ ) und Pyrithion (50  $\mu\text{M}$ ) und/oder LPS (250 ng/ml) stimuliert. **A**, Die PDE-4B-mRNA-Expression wurde nach 24 Stunden Inkubation mit Zink und Pyrithion und/oder LPS mittels RT-PCR analysiert. Als housekeeping Gen wurde  $\beta$ -Actin verwendet. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis von  $n=3$  unabhängigen Experimenten. **B**, Die Phosphodiesterase-Aktivität wurde nach 24 Stunden Inkubation mit Zink und Pyrithion und/oder LPS durch Zugabe der Substrate cAMP oder cGMP mittels HPLC gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens  $n=3$  unabhängigen Experimenten (Student t-test \*  $p < 0,05$ ).

Nach 24 Stunden LPS-Stimulation wurde im Zelllysate von Mono-Mac1-Zellen ein signifikant erhöhter cAMP-Abbau gemessen (Abb. 3.1.5. B). Die cGMP-Hydrolyse blieb nach Stimulation mit LPS erwartungsgemäß unbeeinträchtigt, da PDE-4 ausschließlich cAMP hydrolysiert. Die zusätzliche Inkubation von 25  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> und 50  $\mu$ M Pyrithion suppressierte die LPS-vermittelte Positiv-Regulation der PDE-4B-mRNA-Expression (Abb. 3.5. A). In Übereinstimmung damit wurde auch die Hydrolyse von cAMP nach 24 Stunden inhibiert. Die Inkubation mit Zink in Gegenwart von LPS führte ebenfalls zu einer Inhibition der cGMP-Hydrolyse (Abb. 3.5. B). Die Stärke der Inhibition der Cyclonukleotidhydrolyse in Gegenwart von Zink alleine war in etwa vergleichbar mit der von Zink in Gegenwart von LPS.

### **3.4. Die Aktivierung der PKA durch Zinkionen**

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass Zink einen inhibitorischen Einfluss auf die Aktivität als auch einen suppressierenden Einfluss auf die mRNA-Expression verschiedener Phosphodiesterase-Subtypen hat. Die Zink-vermittelte Hemmung der Phosphodiesterase-Hydrolyse sollte zur intrazellulären Akkumulation der Cyclonukleotide führen. Zur Aufklärung dieser Fragestellung wurden Mono-Mac1-Zellen mit Zink und Pyrithion für 30 Minuten oder für 6 Stunden inkubiert und die intrazelluläre Konzentrationen von cAMP quantifiziert. Wie die Abb. 3.6. zeigt, wurde die intrazelluläre cAMP-Konzentration durch Zink weder nach 30 Minuten noch nach 6 Stunden erhöht. Vielmehr bewirkte Zink einen schwachen Rückgang der basalen cAMP-Konzentration nach 30 Minuten (Abb. 3.6. A). Für die Untersuchung einer möglichen Inhibition der cAMP-Synthese durch Zink, wurden Mono-Mac1-Zellen für 30 Minuten mit 4 mM IBMX und 10  $\mu$ M Forskolin inkubiert (Abb. 3.6. A). Forskolin ist ein Aktivator der Adenylat-Cyclase. Durch die Hemmung der Phosphodiesterase-Hydrolyse mit IBMX konnte die gesamte Menge an neu synthetisiertem cAMP gemessen werden (Abb. 3.6. A). Die zusätzliche Inkubation mit 25  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> und 50  $\mu$ M Pyrithion inhibierte die cAMP-Synthese, was sich

anhand einer signifikant reduzierten cAMP-Konzentration messen ließ. Die Stimulation mit verschiedenen Zinkkonzentrationen führte dagegen im Vergleich zur Kontrolle zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration nach 6 Stunden (Abb. 3.6. B). Obwohl Zink also die Enzymaktivität und mRNA-Expression verschiedener cAMP- und cGMP-abbauender Phosphodiesterase-Subtypen inhibierte, resultierte dies in einer Akkumulation nur eines Cyclonukleotids, dem cGMP.

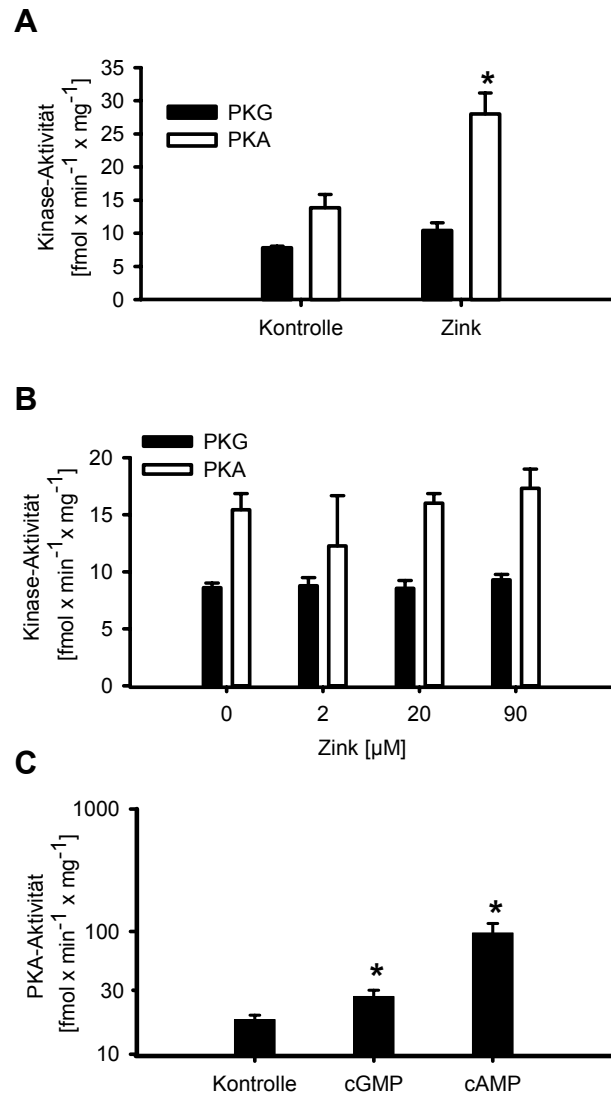


**Abb. 3.6.: Zink reguliert die intrazellulären Konzentrationen der Cyclonukleotide**

**A**, Mono-Mac1-Zellen wurden wie angegeben mit 4 mM IBMX, 10 μM Forskolin (FSK) oder/und 25 μM ZnSO<sub>4</sub> mit 50 μM Pyrithion für 30 Minuten stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und die zelluläre cAMP-Konzentration quantifiziert. **B**, Mono-Mac1-Zellen wurden mit 25 μM ZnSO<sub>4</sub> und 50 μM Pyrithion für 6 Stunden inkubiert. Die Zellysate wurden mittels cGMP-Enzymimmunoassay analysiert. Abgebildet sind die Mittelwerte von n=4 unabhängigen (**A**) oder mindestens n=3 unabhängigen Experimenten (**B**) (Student t-test \* p < 0,05).

Im folgenden Experiment wurde mittels spezifischer Kinaseassays überprüft, ob die Zink-induzierte Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels zur Aktivierung von PKG oder PKA führte. Die Inkubation von Mono-Mac1-Zellen mit 45  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  und 50  $\mu\text{M}$  Pyrithion für 6 Stunden erhöhte die Aktivität der PKA signifikant, wohingegen die Aktivität der PKG durch Zink unbeeinflusst blieb (Abb. 3.7. A). Durch Inkubation von Mono-Mac1-Zelllysat mit verschiedenen Zinkkonzentrationen konnte gezeigt werden, dass die PKA nicht direkt durch Zinkionen aktiviert wurde (Abb. 3.7. B). Üblicherweise wird die PKA durch cAMP aktiviert, jedoch wurde für einige Zelltypen die Aktivierung der PKA durch cGMP beschrieben (Li et al., 2003; Cornwell et al., 1994).

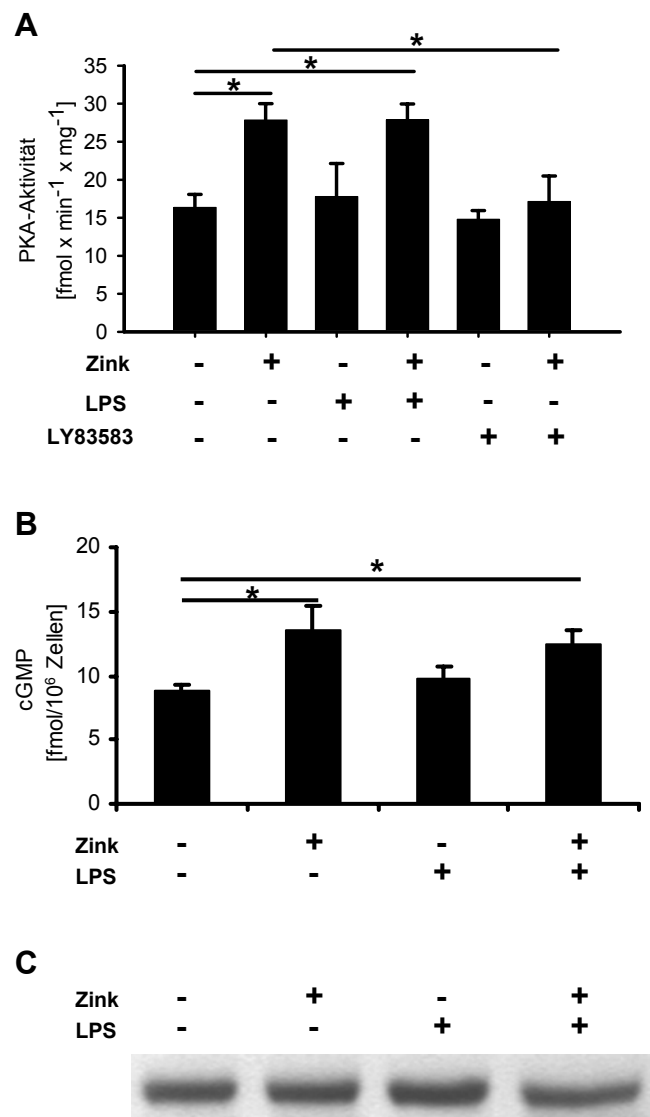
Eine Stimulation der PKA mit 1  $\mu\text{M}$  cGMP oder 1  $\mu\text{M}$  cAMP in Mono-Mac1-Zelllysat sollte darüber Aufschluß geben (Abb. 3.7. C), welches Cyclonukleotid in Mono-Mac1-Zellen für die Aktivierung von PKA verantwortlich ist. Beide Cyclonukleotide waren in der Lage, die PKA zu aktivieren. Die Aktivierung der PKA durch cAMP fiel deutlich stärker aus, jedoch wurde die Aktivität der PKA auch durch cGMP-Stimulation signifikant erhöht. Die Stärke der PKA-Aktivierung nach cGMP-Stimulation (Abb. 3.7. C) war dabei vergleichbar mit derjenigen, die nach Stimulation mit Zink erreicht wurde (Abb. 3.7. A). Eine Aktivierung der PKG konnte auch nach Stimulation mit cGMP im Mono-Mac1-Zelllysat nicht detektiert werden. Die Funktionalität des PKG-Assays konnte mit HEK293T-Zellen als Positivkontrolle bestätigt werden (nicht abgebildete Daten).



**Abb. 3.7.: Aktivierung der PKA durch Zinkionen**

**A**, Mono-Mac1-Zellen wurden für 6 Stunden mit  $\text{ZnSO}_4$  (45  $\mu\text{M}$ ) und Pyrithion (50  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Die PKA- und PKG-Aktivitäten wurden im Lysat mittels eines spezifischen Kinaseassays detektiert. **B** und **C**, Mono-Mac1 Zelllysate wurden mit  $\text{ZnSO}_4$  (**B**) oder mit 1  $\mu\text{M}$  cGMP oder 1  $\mu\text{M}$  cAMP für 30 Minuten (**C**) inkubiert. Abgebildet sind die Mittelwerte von mindestens  $n=3$  unabhängigen Experimenten (Student t-test \*  $p < 0,05$ ).

Ob eine Zink-induzierte PKA-Aktivierung auch in Gegenwart von LPS stattfindet, sollte durch die Analyse der cGMP-Konzentration sowie der PKA-Aktivität geklärt werden. Mono-Mac1-Zellen wurden für 6 Stunden mit Zink und Pyrithion in An- und Abwesenheit von 250 ng/ml LPS inkubiert (Abb. 3.8 A und B). Die LPS-Stimulation beeinflusste die cGMP-Konzentration sowie die PKA-Aktivität nicht, während die zusätzliche



**Abb. 3.8.: Der Einfluss von LPS und Inhibition der zytoplasmatischen Guanylat-Cyclase auf die Zink-induzierte PKA-Aktivierung**

**A** und **C**, Mono-Mac1-Zellen wurden mit 45  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  und 50  $\mu\text{M}$  Pyrithion für 6 Stunden mit 250 ng/ml LPS oder 1  $\mu\text{M}$  LY83583 (**B**) inkubiert. Die Zellen wurden mit 1  $\mu\text{M}$  LY83583 für 30 Minuten vor Zugabe von Zink und Pyrithion vorinkubiert. Die PKA-Aktivität wurde mittels Kinaseassay bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens  $n=3$  unabhängigen Experimenten. **B**, Mono-Mac1-Zellen wurden mit  $\text{ZnSO}_4$  (25  $\mu\text{M}$ ) und Pyrithion (50  $\mu\text{M}$ ) und/oder 250 ng/ml LPS für 6 Stunden inkubiert und die cGMP-Konzentration aus dem Zelllysate quantifiziert. Abgebildet sind die Mittelwerte von  $n=4$  unabhängigen Experimenten (Student t-test \*  $p < 0,05$ ). **C**, Im Westernblot wurden 25  $\mu\text{g}$  Protein des Mono-Mac1 Zelllysates analysiert. Die katalytische Untereinheit der PKA wurde bei 40 kD detektiert. Die Abbildung ist repräsentativ für  $n=3$  unabhängige Experimente.



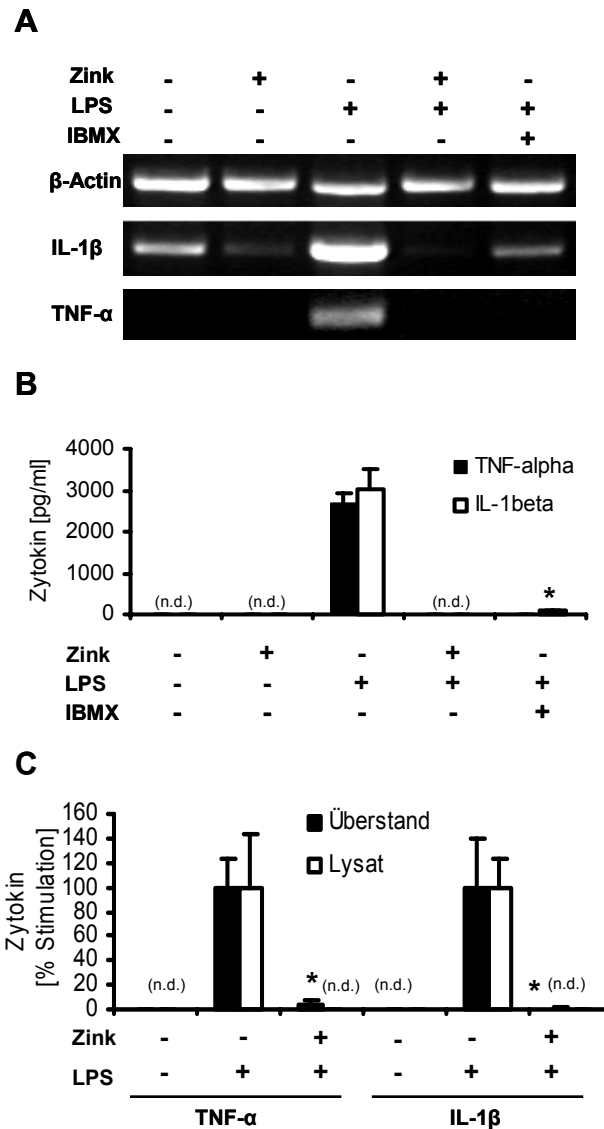
Inkubation mit Zink zu einem signifikanten Anstieg in der cGMP-Konzentration führte und die PKA-Aktivität steigerte. cGMP wird hauptsächlich von der zytoplasmatischen Guanylat-Cyclase in Monozyten synthetisiert (O'Dorisio et al., 1984). Eine Inhibition der cGMP-Synthese mit dem Inhibitor für die zytoplasmatische Guanylat-Cyclase LY83583 (Mülsch et al., 1988) verhinderte die Zink-induzierte PKA-Aktivierung. Dies bestätigt, dass die Zink-vermittelte Aktivierung der PKA cGMP-abhängig verlief (Abb. 3.8. B). Mittels Western Blot wurde untersucht, ob die Steigerung der PKA-Aktivität durch Zink die Folge einer vermehrten PKA-Expression sein könnte (Abb. 3.8. C). Die Untersuchung des Zelllysates aus Abb. 3.8. A mittels Westernblot ergab keine Unterschiede in der Proteinmenge der katalytischen Untereinheit der PKA. Eine Regulation der PKA auf Ebene der Transkription durch Zink bzw. durch Zink-induziertes cGMP konnte also ausgeschlossen werden. Die Steigerung der PKA-Aktivität war ausschließlich auf eine direkte Aktivierung des Enzyms durch cGMP zurückzuführen.

### **3.5. Die Zink-vermittelte Suppression der LPS-induzierten TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Expression**

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob Zink als unspezifischer Phosphodiesterase-Inhibitor die LPS-induzierte mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  supprimieren kann. Zusätzlich wurde der unspezifische pharmakologische Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX als Positivkontrolle verwendet. Nach Inkubation von Mono-Mac1-Zellen für drei Stunden mit 250 ng/ml LPS wurde die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression induziert und die IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression stark erhöht (Abb. 3.9. A). Die zusätzliche Inkubation mit 25  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> und 50  $\mu$ M Pyrithion oder die Vorinkubation mit 4 mM IBMX suppressierte die TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression nach LPS-Stimulation (Abb. 3.9. A). Zusätzlich wurden die Zellkulturüberstände von PBMC mittels ELISA untersucht, um die TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Sekretion zu messen. Die Stimulation von PBMC für 24 Stunden mit 250 ng/ml LPS

führte erwartungsgemäß zu einer starken TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Sekretion (Abb. 3.9. B). Die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Sekretion konnte durch die zusätzliche Inkubation von 25  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> zusammen mit 50  $\mu$ M Pyrithion oder durch die Vorinkubation mit 4 mM IBMX ebenfalls vollständig unterdrückt werden (Abb. 3.9. B).

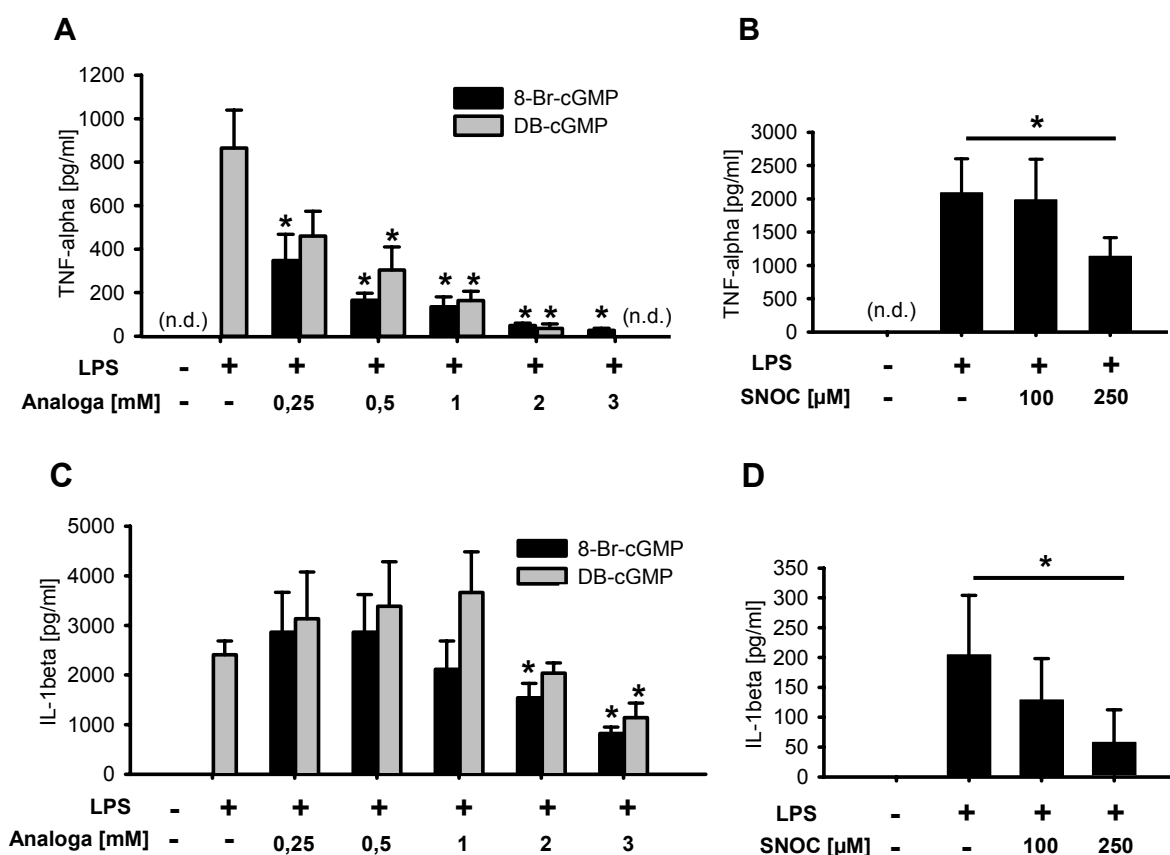
In einem weiteren Experiment wurde bewiesen, dass die Zink-vermittelte Inhibition der Zytokinsekretion Folge der mRNA-Suppression ist. Hierzu wurden mittels ELISA sowohl die Zellkulturüberstände als auch die Zelllysate von primären Monozyten untersucht. Nach 24 Stunden LPS-Stimulation (250 ng/ml) fand sich ein Anstieg von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  im Zelllysate und Zellkulturüberstand (Abb. 3.9. C). Würde Zink die Sekretion der Zytokine inhibieren, ließe sich dies anhand einer intrazellulären Akkumulation der Zytokine in der zytoplasmatischen Fraktion feststellen. Nach Zugabe von Zink wurde weder im Überstand noch im Zelllysate TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  detektiert (Abb. 3.9. C). Es konnte somit ausgeschlossen werden, dass Zink einen inhibitorischen Einfluss auf sekretorischer Ebene hatte.



**Abb. 3.9.: Zink und IBMX supprimieren die mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$**

Mono-Mac1-Zellen (**A**) und PBMC (**B**) wurden mit ZnSO<sub>4</sub> (25  $\mu$ M) und Pyrithion (50  $\mu$ M) oder 4 mM IBMX und/oder LPS (250 ng/ml) für 3 Stunden (**A**) bzw. 24 Stunden (**B**) stimuliert. **A**, Die TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression wurde mittels RT-PCR analysiert. Es ist ein repräsentatives Ergebnis von n=3 unabhängigen Experimenten dargestellt. **B**, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  wurden aus dem Zellkulturüberstand mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von n=4 verschiedenen Spendern. **C**, Monozyten wurden mit ZnSO<sub>4</sub> (1  $\mu$ M) und Pyrithion (50  $\mu$ M) und/oder 250 ng/ml LPS für 24 Stunden stimuliert. TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  aus Überstand und Lysat wurden mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus n=3 verschiedenen Spendern (Student t-test \* p < 0,05).

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob eine Erhöhung des cGMP-Spiegels ausreicht, um die Suppression von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in Gegenwart von LPS zu vermitteln. Wie Abb. 3.10. A und C zeigen, wurden PBMC in Gegenwart von LPS mit zwei verschiedenen membranpermeablen cGMP-Analoga 8-Br-cGMP und DB-cGMP mit unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert und die TNF- $\alpha$ - (Abb. 3.10. A) und IL-1 $\beta$ -Sekretion in den Zellkulturüberstand nach 24 Stunden mittels ELISA gemessen (Abb. 3.10. C). Beide cGMP-Analoga inhibierten die



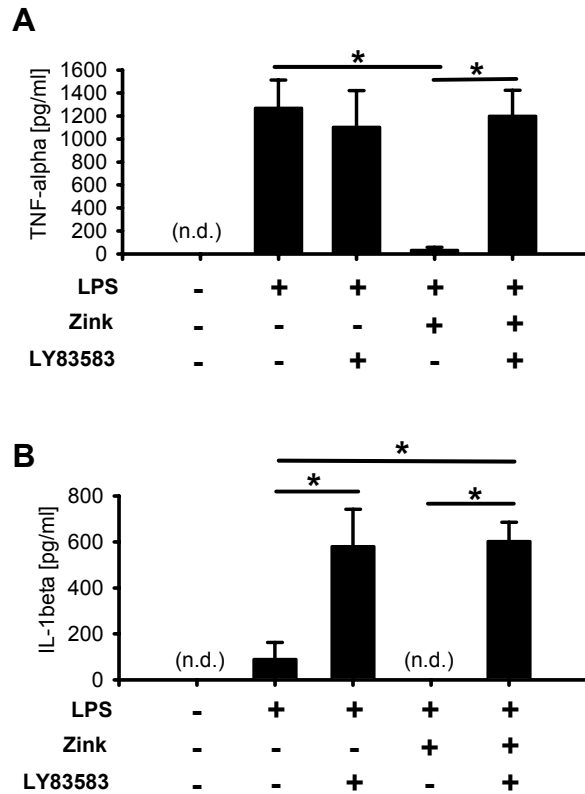
**Abb. 3.10.: Inhibition der Zytokinsekretion durch cGMP**

Die Ausschüttung der Zytokine in den Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens n=3 verschiedenen Spendern (Student t-test \*  $p < 0,05$ ). **A** und **C**, PBMC wurden mit verschiedenen Konzentrationen 8-Br-cGMP und DB-cGMP für 30 Minuten vor der Zugabe von LPS (250 ng/ml) vorinkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Überstände im TNF- $\alpha$ - (**A**, **B**) und IL-1 $\beta$ -ELISA (**C**, **D**) analysiert. **B** und **D**, Monozyten wurden mit 100  $\mu$ M oder 250  $\mu$ M SNOC in Gegenwart von 250 ng/ml LPS für 4 Stunden stimuliert. TNF- $\alpha$  (**B**) und IL-1 $\beta$  (**D**) wurden aus dem Zellkulturüberstand bestimmt.

LPS-induzierte TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Sekretion konzentrationsabhängig in PBMCs. Die zytoplasmatische Guanylat-Cyclase wird durch NO zur Synthese von cGMP angeregt. Um die cGMP-Synthese zu aktivieren wurden Monozyten mit dem NO-Donor SNOC inkubiert (Abb. 3.10. B und D) und die TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Sekretion der Zellen in den Zellkulturüberstand nach 4 Stunden analysiert. Die Stimulation der Monozyten mit SNOC inhibierte ebenfalls die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Sekretion.

Eine intrazelluläre Erhöhung des cGMP-Spiegels konnte die LPS-induzierte Sekretion von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in Monozyten supprimieren. Durch Hemmung der zytoplasmatischen Guanylat-Cyclase sollte sich bestätigen lassen, ob der inhibitorische Effekt von Zink auf die Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in der Tat durch cGMP vermittelt wurde. Hierzu wurde die cGMP-Synthese der zytoplasmatischen Guanylat-Cyclase mit dem Inhibitor LY83583 inhibiert und die TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Produktion in primären Monozyten nach 4 Stunden mittels ELISA analysiert (Abb. 3.11. A und B). Wie in Abb. 3.11. A dargestellt, hatte nach LPS-Stimulation die Inhibition der cGMP-Synthese durch LY83583 alleine keinen Einfluss auf die TNF- $\alpha$ -Sekretion. Die Stimulation der Monozyten mit 1  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> und Pyrithion konnte die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Sekretion zu mehr als 90% inhibieren. Durch die Inhibition der cGMP-Synthese mit LY83583 konnte dieser inhibitorische Effekt von Zink antagonisiert werden (Abb. 3.11. A). Dieses Ergebnis bestätigte, dass cGMP für den inhibitorischen Effekt von Zink auf die TNF- $\alpha$ -Sekretion verantwortlich ist.

Die Inkubation von Monozyten mit LY83583 in Gegenwart von LPS führte dagegen zu einem signifikanten Anstieg der IL-1 $\beta$ -Sekretion (Abb. 3.11. B). Basale Konzentrationen von cGMP schienen für die Inhibition dieses Zytokins ausreichend zu sein, da die cGMP-Konzentration durch LPS nicht erhöht wurde (siehe Abb. 3.8. B). Dennoch konnte gezeigt werden, dass auch die Zink-vermittelte IL-1 $\beta$  Suppression in Gegenwart von LPS durch Hemmung der cGMP-Synthese mittels LY83583 wieder aufgehoben werden konnte (Abb. 3.11. B). Die Experimente bestätigten, dass Zink seinen inhibitorischen Effekt auf beide Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  durch Erhöhung des cGMP-Spiegels ausübte.

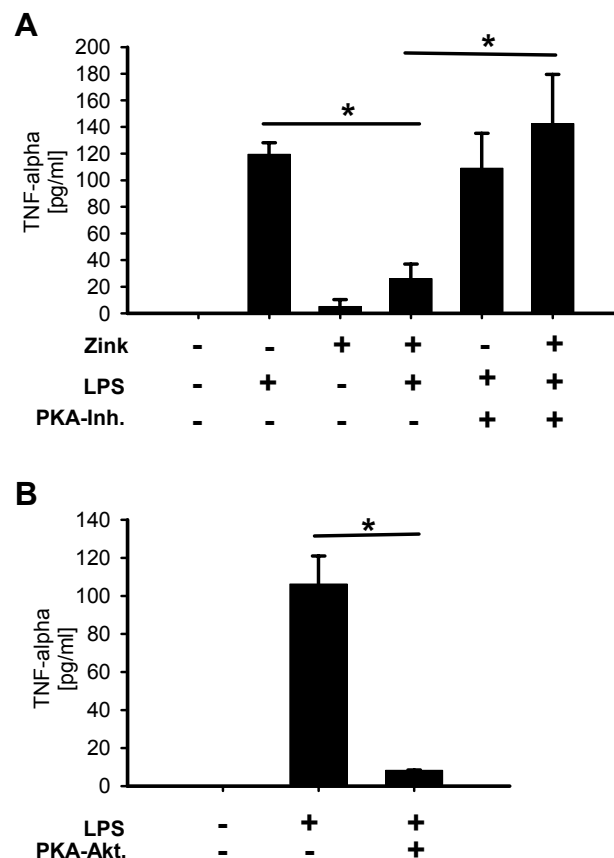


**Abb. 3.11.: Rolle von cGMP in der Zink-vermittelten Inhibition der Zytokinsekretion**

Monozyten wurden mit 250 ng/ml LPS, 1  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> mit 50  $\mu$ M Pyrithion oder 1  $\mu$ M LY83583 für 4 Stunden stimuliert. LY83583 wurde für 30 Minuten vor Zugabe von Zink und LPS vorinkubiert. Die TNF- $\alpha$ - (**A**) und IL-1 $\beta$ -Konzentrationen (**B**) aus dem Zellkulturüberstand wurden mittels ELISA analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von n=3 verschiedenen Spendern (Student t-test \* p < 0,05).

### 3.6. Die Zink-abhängige Suppression von Raf-1 und NFκB

In diesem Abschnitt wurde untersucht, ob die Zink-vermittelte Suppression von TNF-α PKA-abhängig verläuft. Die Stimulation von Mono-Mac1-Zellen mit 250 ng/ml LPS führte nach 4 Stunden zu einer Induktion der TNF-α-Sekretion, die durch Zink und Pyrithion supprimiert werden konnte (Abb. 3.12. A). Während die Inhibition der PKA in Gegenwart von LPS keinen Effekt auf die TNF-α-Sekretion hatte, wurde die Zink-vermittelte Suppression der TNF-α-Sekretion durch Inhibition der PKA antagonisiert (Abb. 3.12. A). Diese Ergebnisse konnten in Abb. 3.12. B mit einem PKA-



**Abb. 3.12.: Die Zink-vermittelte Suppression von TNF-α verläuft PKA-abhängig**

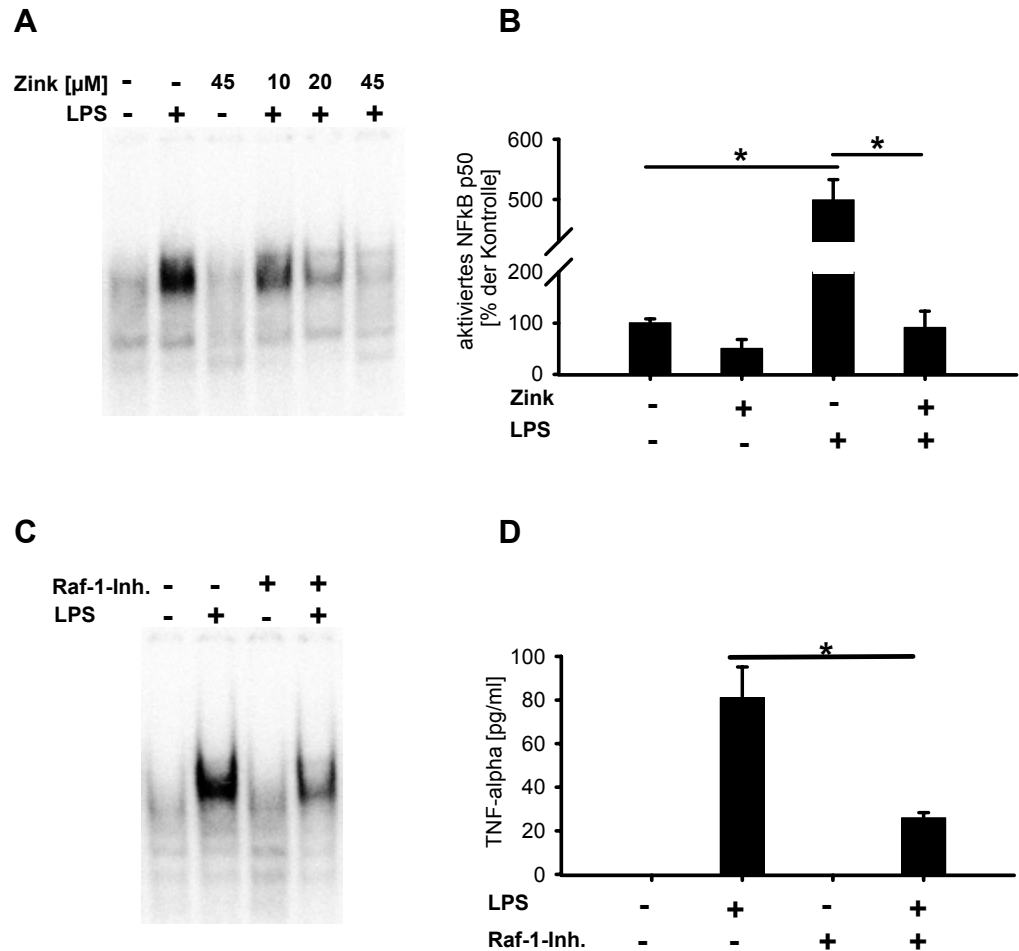
Mono-Mac1-Zellen wurden mit dem spezifischen PKA-Inhibitor Rp-8-CPT-cAMPS (200 μM) (**A**) oder dem spezifischen PKA-Aktivator Sp-8-CPT-cAMPS (200 μM) (**B**) für 30 Minuten vor Zugabe von 250 ng/ml LPS und/oder 20 μM ZnSO<sub>4</sub> und 5 μM Pyrithion vorinkubiert. Die TNF-α-Konzentration im Zellkulturüberstand wurde nach 4 Stunden Stimulation mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens n=3 unabhängigen Experimenten (Student t-test \* p < 0,05).

Aktivator bestätigt werden. Die Aktivierung der PKA war ausreichend, um die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Sekretion in Mono-Mac1-Zellen zu inhibieren. Dieser Mechanismus stellt einen wesentlichen Schritt in der Zink-vermittelten Suppression von TNF- $\alpha$  dar.

NF $\kappa$ B ist der Transkriptionsfaktor, der als Antwort auf LPS aktiviert wird und die Genexpression von TNF- $\alpha$  induziert. Der Einfluss der Zink-vermittelten Aktivierung der PKA auf die LPS-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B in Monozyten wurde mittels EMSA analysiert. Mono-Mac1-Zellen wurden für eine Stunde mit LPS und zusätzlich mit verschiedenen Zinkkonzentrationen stimuliert (Abb. 3.13. A). Es wurde eine NF $\kappa$ B-Konsensussequenz verwendet, die p50/p65-Heterodimere bindet (Qing et al., 2003). LPS führte erwartungsgemäß zu einer Aktivierung von NF $\kappa$ B (Abb. 3.13. A). In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Ergebnissen der TNF- $\alpha$ -Sekretion, inhibierte Zink konzentrationsabhängig die LPS-induzierte Aktivierung von NF $\kappa$ B. Die Quantifizierung von p50 mit einem NF $\kappa$ B-Transkriptionsfaktorassay bestätigte die Ergebnisse des EMSA (Abb. 3.13. B). 25  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> und 50  $\mu$ M Pyrithion bewirkten eine signifikante Abnahme der LPS-induzierten p50-Aktivierung.

Die LPS-induzierte Aktivierung der Kinase Raf-1 führt zur TNF- $\alpha$ -Sekretion in Monozyten (van der Brüggen et al., 1999). PKA kann die Aktivität von Raf-1 durch Phosphorylierung inhibieren (Dhillon et al., 2002b). Daher wurde im nächsten Experiment untersucht, ob die Inhibition von Raf-1 ausreichend ist, um die Aktivierung von NF $\kappa$ B zu hemmen. Die Inkubation von Mono-Mac1-Zellen mit einer 1  $\mu$ M Konzentration des Raf-1 Kinase Inhibitors I führte zu einer Abnahme der LPS-induzierten Aktivierung von NF $\kappa$ B (Abb. 3.13. C). Dieses Ergebnis ließ sich im TNF- $\alpha$  ELISA bestätigen (Abb. 3.13. D). Die Inhibition von Raf-1 konnte auch die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Sekretion in Mono-Mac1-Zellen signifikant inhibieren.



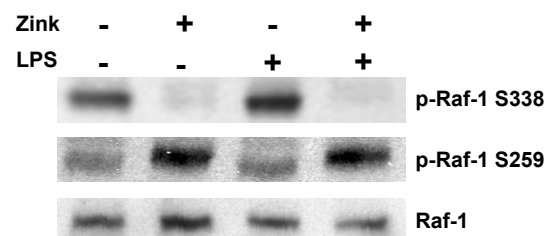


**Abb. 3.13.: Zink und Inhibition von Raf-1 supprimieren NFκB**

**A** und **C**, Mono-Mac1-Zellen wurden mit  $\text{ZnSO}_4$  und 50  $\mu\text{M}$  Pyrithion in Gegenwart von 250 ng/ml LPS inkubiert (**A**) oder für 30 Minuten mit 1  $\mu\text{M}$  Raf-1 Kinase Inhibitor I vor Zugabe von LPS vorinkubiert (**C**). Nach 1 Stunde Inkubation wurden die Kernextrakte gewonnen und mittels EMSA analysiert. Die Abbildungen **A** und **C** stellen repräsentativ jeweils eines von  $n=3$  unabhängigen Ergebnissen dar. **B**, Mono-Mac1-Zellen wurden für 1 Stunde mit 25  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  und 50  $\mu\text{M}$  Pyrithion und/oder 250 ng/ml LPS inkubiert. Die p50-Bindung an die NFκB-Konsensussequenz wurde mittels eines NFκB-Transkriptionsfaktorassays gemessen. **D**, Mono-Mac1-Zellen wurden für 4 Stunden mit 1  $\mu\text{M}$  Raf-1 Kinase Inhibitor I vor Zugabe von LPS vorinkubiert und die TNF- $\alpha$ -Konzentration mittels ELISA ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens  $n=3$  unabhängigen Experimenten (**B** und **D**) (Student t-test \*  $p < 0,05$ ).

LPS führt zur Aktivierung von Raf-1 durch Phosphorylierung an der Position Serin 338 (Reimann et al., 1994), während PKA die Aktivität von Raf-1 durch Phosphorylierung am Serin 259 inhibieren kann (Dhillon et al., 2002b). Da die Inhibition von Raf-1 zu einer Abnahme der Aktivierung von

NF $\kappa$ B führte und dies als Konsequenz die TNF- $\alpha$ -Sekretion weitgehend inhibierte, wurde untersucht, ob die Zink-induzierte Aktivierung der PKA die Phosphorylierung von Raf-1 beeinflussen kann. Die Westernblot Untersuchungen ergaben, dass Raf-1 in ruhenden Mono-Mac1-Zellen und verstärkt in LPS-stimulierten Zellen am Serin 338 phosphoryliert waren (Abb. 3.14. oben). Diese aktivierende Phosphorylierung am Serin 338 konnte durch die Stimulation mit 45  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> und 50  $\mu$ M Pyrithion alleine sowie in Gegenwart von LPS inhibiert werden (Abb. 3.14. oben). Die konstitutive Phosphorylierung von Raf-1 am Serin 388 in ruhenden Zellen ist in sofern nicht ungewöhnlich, als dieser Effekt bereits für murine dendritische DC2.4 Zellen beschrieben wurde (Nakayama et al., 2003). Die Inkubation von Mono-Mac1-Zellen mit Zink alleine oder in Gegenwart von LPS führte in Raf-1 zu einer erhöhten inhibitorischen Phosphorylierung am Serin 259 (Abb. 3.14. Mitte). Die Stimulation der Mono-Mac1-Zellen mit Zink bewirkte also eine Verlagerung von der aktivierenden zur inhibierenden Phosphorylierung im Raf-1. Die unterste Teilabbildung der Abb. 3.14. zeigt durch den Nachweis des Raf-1-Proteins, dass in allen Proben vergleichbare Proteinmengen vorlagen.



**Abb. 3.14.: Die Zink-induzierte Veränderung in der Raf-1-Phosphorylierung**

Mono-Mac1-Zellen wurden für 30 Minuten mit 45  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> und 50  $\mu$ M Pyrithion und/oder 250 ng/ml LPS inkubiert. In Westernblot-Experimenten wurden die Raf-1 Phosphorylierungsstellen Serin 338 und 259 und das Raf-1-Protein mit spezifischen Antikörpern wie unter Material und Methoden beschrieben nachgewiesen. Die Raf-1-Phosphorylierung und das Raf-1-Protein wurden bei 74 kD detektiert. Die Abbildungen sind repräsentativ für je n=3 unabhängige Experimente.

## 4. Diskussion

Obwohl die Wechselwirkungen zwischen LPS und Zink intensiv erforscht werden, sind die Ergebnisse dieser Studien aufgrund ihrer gegensätzlichen Aussagen, nur schwer zu interpretieren.

So zeigt eine Zinksupplementation auf der einen Seite einen protektiven Effekt in einem Mausmodell für LPS-induzierte Hepatotoxizität. Die Supplementation von Zink verminderte die TNF- $\alpha$ -Produktion in der Leber, wodurch die Mäuse vor der LPS-induzierten Hepatotoxizität geschützt wurden (Zhou et al., 2004). Ähnliche Ergebnisse wurden mit einer Zinksupplementierung nach einer Stimulation mit PMA/PHA *in vitro* erzielt. Zinksupplementation supprimierte die mRNA Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-8 (Bao et al., 2003).

Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass Zink bei zeitgleicher Gabe von LPS die verheerenden Auswirkungen einer Sepsis verstärkt (Krones et al., 2004). Dieser aktivierende Effekt von Zink ließ sich *in vitro* bestätigen. Niedrige Konzentrationen von Zink wirken synergistisch mit LPS und führen zu einer signifikant erhöhten Zytokinsekretion (Driessen et al., 1995).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die aktivierenden und inhibitorischen Effekte von Zink nicht gegenseitig ausschließen. Abhängig von der Zinkkonzentration können diese gegensätzlichen Effekte in ein und demselben System gemessen werden. Die unterschiedlichen Effekte können dadurch erklärt werden, dass Zink die LPS-induzierte Monokinsekretion in einem konzentrationsabhängigen Prozess beeinflusst, in welchem niedrige Zinkkonzentrationen den LPS-vermittelten Effekt potenzieren können und damit also proinflammatorisch wirken. Hohe Zinkkonzentrationen wirken auf die Monokinproduktion hingegen inhibierend und üben somit also einen antiinflammatorischen Effekt aus.

Eine mögliche Ursache für den proinflammatorischen Effekt von Zink dürfte sein, dass es die Aktivität von LPS verstärkt, indem es Einfluss auf den LPS-Fluiditätsstatus nimmt (Wellinghausen et al., 1997). Des weiteren

ist Zink in der Lage eine Vielzahl von Signalwegen zu aktivieren, insbesondere durch die Veränderung des Phosphorylierungsstatus der beteiligten Proteine (Beyersmann und Haase, 2001). Dieser kann durch die Inhibition der Protein-Tyrosin-Phosphatasen moduliert werden wie es z.B. beim Insulinrezeptor der Fall ist (Haase und Maret, 2003). Zink moduliert die Aktivierung der MAP-Kinasen (mitogen-activated protein) ERK, p38 und JNK, was die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren ATF-2 (activating transcription factor-2) und c-Jun in bronchialen Epithelzellen zur Folge hat (Beyersmann und Haase, 2001).

In dieser Studie wurde untersucht, wie Zinkionen in die Signaltransduktion von LPS-stimulierten Monozyten eingreifen und so die LPS-induzierte Monokinproduktion supprimieren. Cyclonukleotide spielen eine wichtige Rolle in der Vermittlung von antiinflammatorischen Effekten, die der LPS-induzierten Sekretion von TNF- $\alpha$  in Monozyten entgegenwirken. Agonisten von cGMP, wie DB-cGMP und 8-Br-cGMP, supprimieren die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Sekretion in Monozyten und murinen Makrophagen (Seldon et al., 1995; Kiemer et al., 2000). Die PDE-4-Inhibitoren Rolipram und Ro-20-1724 inhibieren die TNF- $\alpha$ -Sekretion in humanen PBMC und Monozyten durch eine Erhöhung des cAMP-Spiegels, indem sie den cAMP-Abbau inhibieren (Yoshimura et al., 1997; Seldon et al., 1995; Verghese et al., 1995; Greten et al., 1995; Barnette et al., 1998).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Zink die LPS-induzierte Monokinproduktion über eine Modulation des Cyclonukleotidspiegels supprimiert. Monozyten exprimieren die Phosphodiesterase-Familien PDE-1, PDE-3 und PDE-4, die alle drei durch Zink direkt und reversibel inhibiert werden. Nicht nur die Enzymaktivität wird inhibiert, sondern auch die mRNA-Expression verschiedener Phosphodiesterase-Subtypen, sowie die LPS-vermittelte Induktion der PDE-4B-mRNA-Expression. Durch die Verwendung von spezifischen Phosphodiesterase-Inhibitoren kann ausgeschlossen werden, dass eine weitere Phosphodiesterase-Familie in Mono Mac1-Zellen exprimiert wird.

Obwohl durch die Zink Inhibition aller 3 Phosphodiesterase-Familien im Lysat sowohl die cAMP-Hydrolyse, als auch die cGMP-Hydrolyse gehemmt wird, führt dies nur zu einem signifikanten Anstieg der

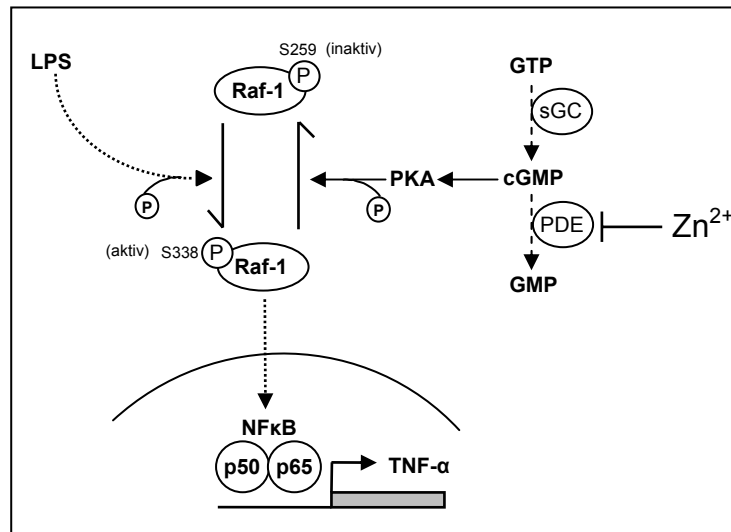
intrazellulären cGMP-Konzentration in Mono Mac1-Zellen. Die cAMP-Konzentration steigt nach Zinkstimulation nicht an. In Gegenwart von Zink findet sich auch nach Stimulation mit IBMX und Forskolin kein intrazellulärer Anstieg der cAMP-Konzentration. Dies deutet auf eine Zink-induzierte Inhibition der cAMP-Synthese hin. So zeigen auch andere Studien, dass Zink die GTPase-Aktivität des stimulatorischen GTP-bindenden Proteins hemmt, welches die Adenylat-Cyclase-Aktivität reguliert. Dadurch kann die Adenylat-Cyclase-Aktivität nicht mehr stimuliert werden (Klein et al., 2002, Gao et al., 2005). Zink inhibiert zwar die cAMP-Hydrolyse in Mono Mac1-Zellen, dies hat aber keine Auswirkungen im Sinne eines intrazellulären cAMP-Anstiegs. Eine Zink-abhängige Aktivierung der PKA durch cAMP wird dadurch verhindert. Eine Zink-abhängige Aktivierung der PKG durch cGMP findet ebenfalls nicht statt, da die PKG in Mono Mac1-Zelllysat durch cGMP nicht stimulierbar ist.

Für die cGMP-Synthese existieren zwei Formen der Guanylat-Cyclase, die membranassoziierte und die zytoplasmatische Guanylat-Cyclase. Es ist bisher nicht bekannt, ob Zink einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität der membranassoziierten Guanylat-Cyclase hat. Diese ist in Monozyten nur geringfügig aktiv (O'Dorisio et al., 1984). Die zytoplasmatische Guanylat-Cyclase wird durch NO zur cGMP-Synthese stimuliert. Eine Beteiligung der zytoplasmatischen Guanylat-Cyclase bei der Zink-vermittelten Supprimierung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  konnte in dieser Arbeit durch die Verwendung des zytoplasmatischen Guanylat-Cyclase-Inhibitors LY83583 bestätigt werden (Abb. 3.11.). Die LPS-induzierte IL-1 $\beta$ -Sekretion wird durch Inhibition der cGMP-Synthese signifikant erhöht, während die Inhibition der cGMP-Synthese auf die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Sekretion keinen Einfluss hat. TNF- $\alpha$  wird durch die Metalloprotease ADAM-17 enzymatisch gespalten. Die Prozessierung und Aktivierung von IL-1 $\beta$  dagegen erfolgt unter Beteiligung von Caspase 1 (IL-1-converting enzyme, ICE), deren Inhibition über cGMP-abhängige Signalwege verläuft (Fiorucci et al., 1999). Die basalen cGMP-Konzentrationen, scheinen also für die Hemmung der IL-1 $\beta$ -Sekretion wichtig zu sein.

Der NO-Donor SNOC supprimiert als Aktivator der cGMP-Synthese ebenfalls die LPS-stimulierte TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Sekretion. NO induziert aber auch gleichzeitig die oxidative Freisetzung von Zink aus Zink-bindenden Proteinen (Kröncke et al., 1994). Eine Zytokin-induzierte Produktion von NO zum Beispiel ist ausreichend, um eine Freisetzung, von intrazellulären Zink zu induzieren (Spahl et al., 2003). Es ist nicht auszuschließen, dass die oxidativ freigesetzte Menge an Zink die Inhibition des Cyclonukleotidabbaus beeinflusste, wodurch es synergistisch mit der Aktivierung der cGMP-Synthese gewirkt haben könnte.

Die in den Experimenten eingesetzte Zinkkonzentration liegt über der physiologischen Zinkplasmakonzentration von 12-16  $\mu$ M (Wellinghausen und Rink, 1998). In einigen Geweben wie der Skelettmuskulatur, der Leber und der Niere finden sich jedoch mit mehreren 100 Mikromolar weitaus höhere Zinkkonzentrationen, als die in den Experimenten eingesetzte inhibitorische Konzentration (Jackson 1989). In zinkreichen Geweben wie der Prostata liegt Zink sogar in millimolaren Konzentrationen vor (Vartsky et al., 2003). Bei diesen Konzentrationen würden die Phosphodiesterasen nach den Beobachtungen dieser Studie konstitutiv inaktiv vorliegen. Da aber der überwiegende Anteil des Zinks in der Zelle an Proteine gebunden vorliegt und nur ein sehr geringer Prozentsatz des Zinks frei in der Zelle vorkommt, dürfte die Konzentration des freien Zinks unter der inhibitorischen Zinkkonzentration für Phosphodiesterasen liegen. *In vitro* und *in vivo* können schnell Zinkkonzentrationen erreicht werden, die in der Lage sind, die TNF- $\alpha$ -Produktion zu inhibieren (Bao et al., 2003; Zhou et al., 2004).

Zink inhibiert nicht die Sekretion von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , vielmehr übt Zink seinen inhibitorischen Einfluss auf Ebene der Zytokin-mRNA-Expression aus. In welcher Weise eine Zinkstimulation in die LPS-induzierte Signaltransduktion in Monozyten eingreift, um die Produktion von TNF- $\alpha$  zu supprimieren, ist in Abb. 4.1 basierend auf den in dieser Arbeit gewonnen Daten schematisch dargestellt. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass die Inhibition der Phosphodiesterase-Enzymaktivität und mRNA-Expression zur intrazellulären Akkumulation von cGMP führt. Dies



**Abb. 4.1.: Molekularer Mechanismus der Zink-induzierten Raf-1-Inaktivierung**

Zinkionen inhibieren die Phosphodiesterase-Aktivität und supprimieren die Phosphodiesterase-mRNA-Expression in humanen Monozyten. Die Inhibition führt zu einer intrazellulären Akkumulation von cGMP durch Hemmung der Cyclonukleotidhydrolyse. cGMP aktiviert die PKA. PKA antagonisiert die LPS-induzierte proinflammatorische Signaltransduktion durch die inhibitorische Phosphorylierung von Raf-1 am Serin 259. Die Raf-1-Inhibition supprimiert die LPS-induzierte NFκB-Translokation in den Nukleus und die Transkription und Proteinsynthese von TNF-α in humanen Monozyten.

wiederum führt zur Aktivierung der PKA. Die PKA greift dann in die proinflammatorische Signaltransduktion durch Inhibition des Raf-1-Signalweges ein. Dies führt zu einer Supprimierung der NFκB-Aktivierung und TNF-α-Transkription.

Die PKA kann drei Positionen in Raf-1 phosphorylieren, Serin 43 (Wu et al., 1993), Serin 259 (Dhillon 2002a, 2002b) und 621 (Mischak et al., 1996). Die Raf-1-Inaktivierung wird hauptsächlich durch Phosphorylierung am Serin 259 vermittelt. Die Inhibition der ERK-Aktivität und der ERK-induzierten Genexpression wird über PKA-induzierte Raf-1-Inhibition vermittelt. Dabei inhibiert PKA die aktivierende Phosphorylierung in Raf-1 am Serin 338 (Dhillon et al., 2002b). In Makrophagen ist die Dephosphorylierung von Serin 259 in Raf-1 durch die Phosphatase PP2A die Voraussetzung für die Aktivierung von Raf-1 (Abraham et al., 2000) und reguliert die Bindung von Raf-1 an sein Substrat MEK (Dhillon et al.,

2002b). In *Xenopus* Oocyten wurde ein anderer Mechanismus der Zink-vermittelten Negativ-Regulation der Raf-1 Aktivität entdeckt. Die Aktivität von Raf-1 wird hier durch die Bindung an das Zink-Exportprotein ZnT1 gefördert. Die Bindung von Raf-1 an ZnT1 wird durch Zink inhibiert (Jirakulaporn und Muslin, 2004). Dieser Mechanismus der Raf-1-Inhibition kann in der vorliegenden Arbeit für Monozyten ausgeschlossen werden, da die Inhibition der zytoplasmatischen Guanylat-Cyclase und der PKA den inhibitorischen Zinkeffekt antagonisieren können. Dies beweist, dass die Inhibition von Raf-1 über die cGMP-induzierte PKA-Aktivität vermittelt wird.

Die exzessive und permanente Zytokinproduktion als Antwort auf Endotoxin bzw. bakterielles LPS verursacht vaskuläre Verletzungen bis hin zu Multiorganversagen und ist ein Kennzeichen der Sepsis und des septischen Schocks. Die verheerenden Konsequenzen der systemischen Inflammation sind mehr auf die unkontrollierte Zytokinproduktion zurückzuführen, als auf die Infektion selbst (Cohen et al., 2002). Die LPS-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB spielt hierbei eine zentrale Rolle, da er die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie zum Beispiel TNF-α induziert. Die Mortalitätsrate unter diesen Patienten ist hoch, obwohl intensive Bemühungen unternommen wurden, Sepsis und septischen Schock effektiv zu therapieren (Liu und Malik, 2006). Die Inhibition des Signalweges, der zur NFκB-induzierten Zytokinantwort führt, könnte die verheerenden Konsequenzen der Zytokinproduktion mindern.

Verschiedene Studien an Tiermodellen belegen, dass Zink einen schützenden Effekt gegenüber der durch Endotoxin induzierten proinflammatorischen TNF-α-Antwort ausübt (Snyder and Walker, 1976; Klosterhalfen et al., 1996; Zhou et al., 2004). Beginnt man mit einer Zinksupplementierung vor Injektion des Endotoxins, so wird die TNF-α-Plasmakonzentrationen im Schweinmodell signifikant reduziert und die Lethalitätsrate im Mausmodell gesenkt (Klosterhalfen et al., 1996; Snyder and Walker, 1976). In einem Mausmodell für LPS-induzierte Hepatotoxizität konnte nach Zinksupplementierung, die zeitlich vor der LPS-Injektion durchgeführt wurde, eine Abschwächung der TNF-α-



Produktion im Lebergewebe beobachtet werden. Diese war auf eine Inhibition der NF $\kappa$ B-Aktivierung zurückzuführen (Zhou et al., 2004). Der in dieser vorliegenden Arbeit identifizierte molekulare Mechanismus zeigt, in welcher Weise die Zinksupplementation ihren protektiven Effekt im Sepsismodell vermitteln könnte: Zink greift in die proinflammatorische Signaltransduktion ein, indem es die Inhibition des Raf-1-Signalweges und die Supprimierung der NF $\kappa$ B-Aktivierung induziert.

Eine Inhibition von Raf-1 durch PKA könnte einen allgemeinen molekularen Mechanismus darstellen, über den auch pharmakologische Substanzen (PDE-4 Inhibitoren usw.) die inflammatorische Zytokinproduktion supprimieren können. Nicht nur cGMP-Analoga (DB-cGMP und 8-Br-cGMP) supprimieren die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Produktion, wie es am Beispiel von primären Monozyten und murinen Makrophagen gezeigt wurde (Seldon et al., 1995; Kiemer et al., 2000), sondern auch pharmakologische Phosphodiesterase-Inhibitoren. Sie stellen potenziell antiinflammatorisch und immunmodulatorisch wirksame Substanzen dar. Die therapeutische Behandlung von Patienten im septischen Schock mit dem unspezifischem Phosphodiesterase-Inhibitor Pentoxifyllin, der sowohl den cAMP- als auch den cGMP-Abbau inhibiert, führt zu einer signifikanten Reduzierung der TNF- $\alpha$ -Plasmakonzentration nach 24 Stunden (Staudinger et al., 1996).

Die Negativ-Regulation der PDE-4B-mRNA-Expression zeigt, dass Zink auch ein Modulator des cAMP-Metabolismus sein kann (Abb. 3.5.). PDE-4 wird nicht nur in Monozyten exprimiert, sondern kommt in nahezu allen Zellen des Immunsystems vor (Essayan, 2001). Zinksupplementierung supprimiert die T-Zellaktivierung in der gemischten Lymphozytenkultur (mixed lymphocyte culture, MLC), einem anerkannten *in vitro*-Modell der Transplantationsmedizin (Faber et al., 2004). PDE-4 spielt eine wichtige Rolle bei der T-Zellaktivierung (Skalhegg et al., 2005). So wurde gezeigt, dass die Inhibition der PDE-4 z.B. durch Rolipram in T-Zellen zur Hemmung der T-Zellproliferation führt (Jimenez et al., 2001). Dieser Effekt ist vermutlich PKA-vermittelt, da gezeigt wurde, dass die Aktivierung der PKA die T-Zellaktivierung antagonisieren kann (Skalhegg et al., 2005). So werden PDE-4-Inhibitoren nicht nur für respiratorische Krankheiten wie

Asthma und COPD als Therapeutikum diskutiert, sondern auch für Krankheiten wie Multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Diabetes und septischen Schock (Piaz und Giovannoni, 2000; Dyke und Montana, 2002). Prostaglandin- $E_2$  und der PDE-4-Inhibitor Rolipram erhöhen beide die intrazelluläre cAMP-Konzentration und supprimieren die Produktion von TNF- $\alpha$  über eine cAMP-induzierte PKA-Aktivierung (Seldon et al., 2005). Es ist anzunehmen, dass dieser Effekt über eine PKA-vermittelte Inaktivierung von Raf-1 verläuft, ähnlich wie bei der Zink-vermittelten Supprimierung von TNF- $\alpha$ .

Viele der aufgezählten chronischen Krankheiten, wie Asthma (Truong-Tran et al., 2001), COPD (Karadag et al., 2004), rheumatoide Arthritis (Zoli et al., 1998) und Diabetes mellitus (Chausmer 1998), sind mit einem Zinkmangel assoziiert. Auch ältere Menschen, die generell zu einem niedrigen Zinkserumspiegel neigen, haben eine signifikant erhöhte und konstitutive Produktion der Zytokine IL-1, IL-6 und IL-8. Im Vergleich zu jungen Menschen zeigen sie auch nach Stimulation des Vollblutes mit LPS eine erhöhte Zytokinsekretion (Gabriel et al., 2002). In Patienten mit rheumatoider Arthritis korrelieren die Serumkonzentrationen von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  negativ mit dem Zinkstatus der Patienten (Zoli et al., 1998). Diese beiden Zytokine sind verantwortlich für die Zerstörung der  $\beta$ -Zellen im Typ-1 Diabetes mellitus (Chausmer 1998). Eine Zinksupplementierung verhindert den spontanen und Streptozotocin-induzierten Diabetes in einem Mausmodell für Typ-1 Diabetes (NOD Mäuse, Nonobese diabetic) (Schott-Ohly et al., 2004).

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, in welcher Weise eine Zinksupplementierung die LPS-induzierte Signaltransduktion antagonisiert, welcher molekulare Mechanismus dem zu Grunde liegt. Der jetzt identifizierte Mechanismus der Phosphodiesterase-Inhibition durch Zinksupplementation gibt Grund zu der Überlegung, ob bei Zinkmangel eine Dysregulation der Phosphodiesterase-Aktivität vorliegt und dies der Grund für eine erhöhte Monokinsekretion sein könnte. Es bleibt noch zu untersuchen, ob unter Zinkmangelbedingungen eine erhöhte Phosphodiesterase-Aktivität die Ursache oder zumindest ein Teilaspekt der erhöhten Zytokinproduktion in Monozyten darstellt. Die therapeutische

Anwendung von Zink mit dem Ziel der Korrektur einer gestörten Zinkhomöostase und zur Wiederherstellung normaler Zinkkonzentrationen im Plasma, könnte dann einen Weg darstellen, den Cyclonukleotidspiegel und folglich die PKA-Aktivität zu normalisieren. Dadurch würde die Produktion proinflammatorischer Zytokine zurückgehen und Entzündungsreaktionen bei Autoimmunerkrankungen und septischem Schock würden supprimiert werden.

Der Mechanismus des inhibitorischen Zinkeffekts, der hier erstmals beschrieben wird, macht die Zinksupplementation zu einem höchst wichtigen und viel versprechenden Therapeutikum für die Behandlung von Autoimmunerkrankheiten und systemischer Inflammation. Die geringe akute Toxizität von Zink könnte eine Therapieform mit geringen Nebenwirkungen bieten.

Dennoch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die Dosis, der Zeitpunkt und die Art der Verabreichung von Zink von entscheidender Bedeutung sind. Konzentrationsabhängig kann Zink pro- oder antiinflammatorische Effekte haben. Daher kann der therapeutische Einsatz je nach Zinkkonzentration potenziell gefährliche Konsequenzen mit sich bringen. Ein gutes Beispiel hierfür sind die Tiermodellstudien zum septischen Schock. Die Zinksupplementierung schützt die Mäuse zwar vor dem septischen Schock, aber nur in einem engen Konzentrationsbereich (Snyder und Walker, 1976). Und obwohl die Vorweggabe von Zink die Mortalitätsrate senkt, führt eine gleichzeitige Gabe von Zink und LPS zu erhöhten TNF- $\alpha$ -Serumkonzentrationen. Diese geht mit einer erhöhten Mortalitätsrate einher (Snyder und Walker, 1976; Krones et al., 2004; Klosterhalfen et al., 1996). Einen ganz ähnlichen Effekt zeigt Zink *in vitro* in niedrigen Konzentrationen, wenn PBMC gleichzeitig mit LPS inkubiert werden. Zink hat dann einen synergistischen Effekt mit LPS auf die IL-1 $\beta$ -Sekretion (Driessen et al., 1995).

Zink ist potenziell ein immunmodulatorisches Agens, das immunologische Antworten in zweierlei Richtungen beeinflussen kann. Es kann durch seinen stimulatorischen Effekt auf Monozyten die Produktion proinflammatorischer Zytokine und damit die Aktivierung anderer Zellen des Immunsystems fördern. Zink kann durch seinen inhibitorischen Effekt

auf Monozyten über Inhibition der Phosphodiesterasen die Produktion proinflammatorischer Zytokine supprimieren, möglicherweise auch in Autoimmunerkrankungen oder bei septischem Schock. Auch wenn diese Studie unser Verständnis über die immunmodulatorischen Effekte von Zink auf molekularer Ebene erweitert, so ist unser heutiger Wissensstand dennoch zu unvollkommen, um die Komplexität des Zinkmetabolismus bei Aufnahme und Verteilung im Organismus und den Einfluss auf zellulärer und molekularer Ebene in der Gesamtheit zu verstehen. Erst detaillierte und umfassende Studien zur Aufklärung dieser Zusammenhänge werden es uns ermöglichen, das volle immunmodulatorische Potenzial von Zink zu erfassen.

## 5. Zusammenfassung

Zink ist ein essentielles Spurenelement für das Immunsystem. Die Stimulation von Monozyten mit Lipopolysaccharid (LPS), einem Bestandteil der bakteriellen gramnegativen Zellwand, aktiviert Signalkaskaden, die zur Produktion und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  führen. Mit Zinkkonzentrationen, die einen inhibitorischen Effekt auf die LPS-induzierte Monokinsekretion haben, wurde in dieser Studie erstmals gezeigt, auf welche Weise supplementiertes Zink die Immunantwort von Monozyten durch das selektive Eingreifen in den Raf-1-Signalweg vermitteln kann. Dabei konnte der exakte molekulare Mechanismus mit dem Zink die LPS-Signaltransduktion beeinflusst aufgeklärt werden. Dies resultiert in einer Supprimierung der LPS-induzierten Monokinproduktion. Zink inhibiert reversibel die Enzymaktivität der PDE-1, -3 und -4 und die mRNA-Expression von PDE-1C, -4A und -4B in Monozyten. Obwohl die cAMP- und cGMP-Hydrolyse inhibiert wird, steigt nur die intrazelluläre cGMP-Konzentration an. Der Zink-induzierte Anstieg der cGMP-Konzentration aktiviert die PKA. Die Aktivität der PKG hingegen ist nicht durch cGMP stimulierbar. Die Aktivierung der Kinase Raf-1 spielt eine wichtige Rolle bei der LPS-induzierten Monokinproduktion und konnte durch die Inhibition des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B und der TNF- $\alpha$ -Sekretion mittels eines Raf-1-Inhibitors gezeigt werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass Aktivierung der PKA durch Zink in die LPS-induzierte Signalkaskade eingreift, indem die Aktivierung von Raf-1 unterbunden wird. LPS-Stimulation führt zur Aktivierung von Raf-1 durch Phosphorylierung am Serin 338. Diese aktivierende Phosphorylierung wird durch Zink inhibiert. Zink induziert die inhibitorische Phosphorylierung am Serin 259, auch wenn die Zellen mit LPS stimuliert werden.

Die Studie leistet einen Beitrag zum besseren Verständnis darüber, wie eine Zinksupplementierung ihren antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Effekt auf Zellen des Immunsystems ausüben kann. Für eine mögliche therapeutische Anwendung in der Zukunft dürften diese Kenntnisse von Nutzen sein.

## 6. Literatur

- Abraham, D., K. Podar, M. Pacher, M. Kubicek, N. Welzel, B. A. Hemmings, S. M. Dilworth, H. Mischak, W. Kolch und M. Baccarini. 2000. Raf-1-associated protein phosphatase 2A as a positive regulator of kinase activation. *J.Biol.Chem.* 275:22300-22304.
- Akira, S. und K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat.Rev.Immunol.* 4:499-511.
- Andrews, G. K. 2001. Cellular zinc sensors: MTF-1 regulation of gene expression. *Biometals* 14:223-237.
- Auron, P. E., A. C. Webb, L. J. Rosenwasser, S. F. Mucci, A. Rich, S. M. Wolff und C. A. Dinarello. 1984. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81:7907-7911.
- Bao, B., A. S. Prasad, F. W. Beck und M. Godmere. 2003. Zinc modulates mRNA levels of cytokines. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 285:E1095-E1102.
- Barnette, M. S., S. B. Christensen, D. M. Essayan, M. Grous, U. Prabhakar, J. A. Rush, A. Kagey-Sobotka und T. J. Torphy. 1998. SB 207499 (Ariflo), a potent and selective second-generation phosphodiesterase 4 inhibitor: in vitro anti-inflammatory actions. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 284:420-426.
- Beyersmann, D. und H. Haase. 2001. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals* 14:331-341.
- Blanc, P. D., H. A. Boushey, H. Wong, S. F. Wintermeyer und M. S. Bernstein. 1993. Cytokines in metal fume fever. *Am.Rev.Respir.Dis.* 147: 134-138
- Chang, F., L. S. Steelman, J. T. Lee, J. G. Shelton, P. M. Navolanic, W. L. Blalock, R. A. Franklin und J. A. McCubrey. 2003. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia* 17:1263-1293.
- Chausmer, A. B. 1998. Zinc, insulin and diabetes. *J.Am.Coll.Nutr.* 17:109-115.
- Cohen, J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420:885-891.
- Colbran, J. L., S. H. Francis, A. B. Leach, M. K. Thomas, H. Jiang, L. M. McAllister und J. D. Corbin. 1992. A phenylalanine in peptide substrates provides for selectivity between cGMP- and cAMP-dependent protein kinases. *J.Biol.Chem.* 267:9589-9594.
- Cornwell, T. L., E. Arnold, N. J. Boerth und T. M. Lincoln. 1994. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am.J.Physiol.* 267:C1405-C1413.
- Cousins, R. J. Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. 1985. *Physiol.Rev.* 65: 238-309.

Crea, T., V. Guerin, F. Ortega und P. Hartemann. 1990. Zinc and the immune system. *Ann.Med.Interne* 141: 447-451.

Dhillon, A. S., C. Pollock, H. Steen, P. E. Shaw, H. Mischak und W. Kolch. 2002b. Cyclic AMP-dependent kinase regulates Raf-1 kinase mainly by phosphorylation of serine 259. *Mol.Cell Biol.* 22:3237-3246.

Dhillon, A. S., S. Meikle, Z. Yazici, M. Eulitz und W. Kolch. 2002a. Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *EMBO J.* 21:64-71.

Dinarello C. A: 1984. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase-response. *New. Engl. J. Med.* 311: 1413-1418.

Dousa, T. P. 1999. Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int.* 55:29-62.

Driessen, C., K. Hirv, H. Kirchner und L. Rink. 1995. Divergent effects of zinc on different bacterial pathogenic agents. *J.Infect.Dis.* 171:486-489.

Driessen, C., K. Hirv, L. Rink und H. Kirchner. 1994. Induction of cytokines by zinc ions in human peripheral blood mononuclear cells and separated monocytes. *Lymphokine Cytokine Res.* 13:15-20.

Dyke, H. J. und J. G. Montana. 2002. Update on the therapeutic potential of PDE4 inhibitors. *Expert.Opin. Investig.Drugs* 11:1-13.

Eide, D. J. 2006. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim.Biophys.Acta.*

Endres, S., H. J. Fulle, B. Sinha, D. Stoll, C. A. Dinarello, R. Gerzer und P. C. Weber. 1991. Cyclic nucleotides differentially regulate the synthesis of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear cells. *Immunology* 72:56-60.

Essayan, D. M. 2001. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J.Allergy Clin.Immunol.* 108:671-680.

Faber, C., P. Gabriel , K. H. Ibs und L. Rink. 2004. Zinc in pharmacological doses suppresses allogeneic reaction without affecting the antigenic response. *Bone Marrow Transplant.* 33:1241-1246.

Ferencik, M. und L. Ebringer: 2003. Modulatory effects of selenium and zinc on the immune system. *Folia Microbiol.* 48: 417-426.

Fiorucci, S., E. Antonelli, L. Santucci, O. Morelli, M. Miglietti, B. Federici, R. Mannucci, P. Del Soldato und A. Morelli. 1999. Gastrointestinal safety of nitric oxide-derived aspirin is related to inhibition of ICE-like cysteine proteases in rats. *Gastroenterology* 116:1089-1106.

Fosmire, G. J.1990. Zinc toxicity. *Am.J.Clin.Nutr.* 51: 225-227

Gabriel, P., I. Cakman und L. Rink. 2002. Overproduction of monokines by leukocytes after stimulation with lipopolysaccharide in the elderly. *Exp.Gerontol.* 37:235-247.

Gantner, F., R. Kupferschmidt, C. Schudt, A. Wendel und A. Hatzelmann. 1997. In vitro differentiation of human monocytes to macrophages: change of PDE profile and its relationship to suppression of tumour necrosis factor- $\alpha$  release by PDE inhibitors. *Br.J.Pharmacol.* 121:221-231.

Gao, X., Z. Du und T. B. Patel. 2005. Copper and zinc inhibit G $\alpha$ s function: a nucleotide-free state of G $\alpha$ s induced by Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>. *J.Biol.Chem.* 280:2579-2586.

Good, R. A., G. Fernandes , J. A. Garofalo, C. Cunningham-Rundles, T. Iwata und A. West. 1982. Zinc and Immunity. *Clin.Biochem.Nutr.Aspect. Trace Elem.* 6:189-202.

Greten, T. F., A. Eigler, B. Sinha, J. Moeller und S. Endres. 1995. The specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram differentially regulates the proinflammatory mediators TNF- $\alpha$  and nitric oxide. *Int.J.Immunopharmacol.* 17:605-610.

Grüngreiff, K. 1993. Zink: Bedeutung in der ärztlichen Praxis. 1. Aufl., Köhler Pharma GmbH, Alsbach.

Haase, H. und W. Maret. 2003. Intracellular zinc fluctuations modulate protein tyrosine phosphatase activity in insulin/insulin-like growth factor-1 signaling. *Exp.Cell Res.* 291: 289-298.

Haase, H. und W. Maret. 2005. Fluctuations of cellular, available zinc modulate insulin signaling via inhibition of protein tyrosine phosphatases. *J.Trace Elem.Med.Biol.* 19:37-42.

Halsted, J.A. und JC Smith, Jr. 1970. Plasma-zinc in health and disease. *Lancet* 1: 322-324

Hambleton, J., M. McMahon und A. L. DeFranco. 1995. Activation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinase in murine macrophages partially mimics lipopolysaccharide-induced signaling events. *J.Exp.Med.* 182:147-154.

Ho, L. H., R. E. Ruffin, C. Murgia, L. Li, S. A. Krilis und P. D. Zalewski. 2004. Labile zinc and zinc transporter ZnT4 in mast cell granules: role in regulation of caspase activation and NF- $\kappa$ B translocation. *J.Immunol.* 172: 7750-7760.

Ibs, K.H. und L. Rink. 2003. Zinc-altered immune function. *J.Nutr.* 133: 1452S-1456S

Jackson, M. J., 1989. Physiology of zinc: general aspects. *Zinc and human and biology*. C. F. Mills ed., Springer-Verlag, London.

Jimenez, J. L., C. Punzon, J. Navarro, M. A. Munoz-Fernandez und M. Fresno. 2001. Phosphodiesterase 4 inhibitors prevent cytokine secretion by T lymphocytes by inhibiting nuclear factor- $\kappa$ B and nuclear factor of activated T cells activation. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 299:753-759.

Jirakulaporn, T. und A. J. Muslin. 2004. Cation diffusion facilitator proteins modulate Raf-1 activity. *J.Biol.Chem.* 279:27807-27815.



- Karadag, F., O. Cildag, M. Altinisik, L. D. Kozaci, G. Kiter und C. Altun. 2004. Trace elements as a component of oxidative stress in COPD. *Respirology*. 9:33-37.
- Kemp, B. E., D. J. Graves, E. Benjamini und E. G. Krebs. 1977. Role of multiple basic residues in determining the substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J.Biol.Chem.* 252:4888-4894.
- Kiemer, A. K., T. Hartung und A. M. Vollmar. 2000. cGMP-mediated inhibition of TNF-alpha production by the atrial natriuretic peptide in murine macrophages. *J.Immunol.* 165:175-181.
- Kim, C. H., J. H. Kim, S. J. Moon, K. C. Chung, C. Y. Hsu, J. T. Seo und Y. S. Ahn. 1999. Pyrithione, a zinc ionophore, inhibits NF-kappaB activation. *Biochem.Biophys.Res.Communic.* 259:505-509.
- Kirchner, H., A. Kruse, P. Neustock und L. Rink. 1993. Cytokine und Interferone, 1. Auflage, Spektrum, Akademischer Verlag Heidelberg.
- Klein, C., R. K. Sunahara, T. Y. Hudson, T. Heyduk und A. C. Howlett. 2002. Zinc inhibition of cAMP signaling. *J.Biol.Chem.* 277:11859-11865.
- Klosterhalfen, B., C. Tons, S. Hauptmann, L. Tietze, F. A. Offner, W. Kupper und C. J. Kirkpatrick. 1996. Influence of heat shock protein 70 and metallothionein induction by zinc-bis-(DL-hydrogenaspartate) on the release of inflammatory mediators in a porcine model of recurrent endotoxemia. *Biochem.Pharmacol.* 52:1201-1210.
- Kolch, W. 2000. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem.J.* 351 Pt 2:289-305.
- Kröncke, K. D., K. Fehsel, T. Schmidt, F. T. Zenke, I. Dasting, J. R. Wesener, H. Bettermann, K. D. Breunig und V. Kolb-Bachofen. 1994. Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9. *Biochem.Biophys.Res.Communic.* 200:1105-1110.
- Krones, C., B. Klosterhalfen, V. Fackeldey, K. Junge, R. Rosch, R. Schwab, M. Stumpf, U. Klinge und V. Schumpelick. 2004. Deleterious effect of zinc in a pig model of acute endotoxemia. *J.Invest Surg.* 17:249-256.
- Kruse-Jarres, J.D. The significance of zinc for humoral and cellular immunity. 1989. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 3: 1-8
- Kury, S., B. Dreno, S. Bezieau, S. Giraudet, M. Kharfi, R. Kamoun und J. P. Moisan. 2002. Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica. *Nat.Genet.* 31:239-240.
- Lagoo-Deenadayalan, S., A. S. Lagoo, W. H. Barber und K. J. Hardy. 1993. A standardized approach to PCR-based semiquantitation of multiple cytokine gene transcripts from small cell samples. *Lymphokine Cytokine Res.* 12:59-67.
- Lee, H. H., A. S. Prasad, G. J. Brewer und C. Owyang. 1989. Zinc absorption in human small intestine. *Am.J.Physiol* 256: G87-G91.

- Li, Z., J. Ajdic, M. Eigenthaler und X. Du. 2003. A predominant role for cAMP-dependent protein kinase in the cGMP-induced phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein and platelet inhibition in humans. *Blood* 101:4423-4429.
- Liu, S. F. und A. B. Malik. 2006. NF- $\kappa$ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 290:L622-L645.
- Ma, D., P. Wu, R. W. Egan, M. M. Billah und P. Wang. 1999. Phosphodiesterase 4B gene transcription is activated by lipopolysaccharide and inhibited by interleukin-10 in human monocytes. *Mol.Pharmacol.* 55:50-57.
- Mischak, H., T. Seitz, P. Janosch, M. Eulitz, H. Steen, M. Schellerer, A. Philipp und W. Kolch. 1996. Negative regulation of Raf-1 by phosphorylation of serine 621. *Mol.Cell Biol.* 16:5409-5418.
- Mocchegiani, E., L. Santarelli, M. Muzzioli und N. Fabris N.1995. Reversibility of the thymic involution and of age-related peripheral immune dysfunctions by zinc supplementation in old mice. *Int.J.Immunopharmacol.* 17: 703-718.
- Mülsch, A., R. Busse, S. Liebau und U. Forstermann. 1988. LY 83583 interferes with the release of endothelium-derived relaxing factor and inhibits soluble guanylate cyclase. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 247:283-288.
- Myonahan, E. J. 1981. Acrodermatitis enteropathica and the immunological role of zinc. *Immunodermatology* 30:437-447.
- Nakayama, K., Y. Ota, S. Okugawa, N. Ise, T. Kitazawa, K. Tsukada, M. Kawada, S. Yanagimoto und S. Kimura. 2003. Raf1 plays a pivotal role in lipopolysaccharide-induced activation of dendritic cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 308:353-360.
- Neldner, K. H. und K. M. Hambidge. 1975. Zinc therapy of acrodermatitis enteropathica, *N.Engl.J.Med.* 292: 879-882
- Neldner, K. H., K. M. Hambidge und P. A. Walravens. 1978. Acrodermatitis enteropathica. *Int.J.Dermatol.* 17:380-387.
- O'Dorisio, M.S., R. Fertel, E. Finkler, R. Brooks und L. Vassalo. 1984. Characterization of cyclic nucleotide metabolism during human monocyte differentiation. *J.Leukoc.Biol.* 35:617-630.
- Pennica, D., G. E. Nedwin, J. S. Hayflick, P. H. Seeburg, R. Derynck, M. A. Palladino, W. J. Kohr, B. B. Aggarwal und D. V. Goeddel. 1984. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312:724-729.
- Percival, M. D., B. Yeh und J. P. Falgoutret. 1997. Zinc dependent activation of cAMP-specific phosphodiesterase (PDE4A). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 241:175-180.
- Piaz, D. V. und M. P. Giovannoni. 2000. Phosphodiesterase 4 inhibitors, structurally unrelated to rolipram, as promising agents for the treatment of asthma and other pathologies. *Eur.J.Med.Chem.* 35:463-48

- Pillai, R., S. F. Staub und J. Colicelli. 1994. Mutational mapping of kinetic and pharmacological properties of a human cardiac cAMP phosphodiesterase. *J.Biol.Chem.* 269:30676-30681.
- Pilz, R. B. und D. E. Casteel. 2003. Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ.Res.* 93:1034-1046.
- Qing, M., K. Schumacher, R. Heise, M. Woltje, J. F. Vazquez-Jimenez, T. Richter, M. Arranda-Carrero, J. Hess, G. von Bernuth und M. C. Seghaye. 2003. Intramyocardial synthesis of pro- and anti-inflammatory cytokines in infants with congenital cardiac defects. *J.Am.Coll.Cardiol.* 41:2266-2274.
- Reimann, T., D. Buscher, R. A. Hipskind, S. Krautwald, M. L. Lohmann-Matthes und M. Baccarini. 1994. Lipopolysaccharide induces activation of the Raf-1/MAP kinase pathway. A putative role for Raf-1 in the induction of the IL-1 beta and the TNF-alpha genes. *J.Immunol.* 153:5740-5749.
- Rink, L. und P. Gabriel. 2000. Zinc and the immune system, *Proc.Nutr.Soc.* 59: 541-552
- Rink, L. und P. Gabriel. 2001. Extracellular and immunological actions of zinc, *Biometals* 14: 367-383
- Rink, L. und H. Kirchner. 2000. Zinc-altered immune function and cytokine production. *J.Nutr.* 130:1407S-1411S.
- Schott-Ohly, P., A. Lgssiar, H. J. Partke, M. Hassan, N. Friesen und H. Gleichmann. 2004. Prevention of spontaneous and experimentally induced diabetes in mice with zinc sulfate-enriched drinking water is associated with activation and reduction of NF-kappa B and AP-1 in islets, respectively. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 229:1177-1185.
- Seldon, P. M., K. K. Meja und M. A. Giembycz. 2005. Rolipram, salbutamol and prostaglandin E2 suppress TNFalpha release from human monocytes by activating Type II cAMP-dependent protein kinase. *Pulm.Pharmacol.Ther.* 18:277-284.
- Seldon, P. M., P. J. Barnes, K. Meja und M. A. Giembycz. 1995. Suppression of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha generation from human peripheral blood monocytes by inhibitors of phosphodiesterase 4: interaction with stimulants of adenylyl cyclase. *Mol.Pharmacol.* 48:747-757.
- Skalhegg, B. S., A. Funderud, H. H. Henanger, T. T. Hafte, A. C. Larsen, A. K. Kvissel, S. Eikvar und S. Orstavik. 2005. Protein kinase A (PKA)--a potential target for therapeutic intervention of dysfunctional immune cells. *Curr Drug Targets.* 6:655-664.
- Snyder, S. L. und R. I. Walker. 1976. Inhibition of lethality in endotoxin-challenged mice treated with zinc chloride. *Infect.Immun.* 13:998-1000.
- Spahl, D. U., D. Berendji-Grun, C. V. Suschek, V. Kolb-Bachofen und K. D. Kroncke. 2003. Regulation of zinc homeostasis by inducible NO synthase-derived NO: nuclear metallothionein translocation and intranuclear Zn<sup>2+</sup> release. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:13952-13957.

- Staudinger, T., E. Prestler, W. Graninger, G. J. Locker, S. Knapp, K. Laczika, G. Klappacher, B. Stoiser, A. Wagner, P. Tesinsky, H. Kordova und M. Frass. 1996. Influence of pentoxifylline on cytokine levels and inflammatory parameters in septic shock. *Intensive Care Med.* 22:888-893.
- Tapiero, H. und K. D. Tew. 2003. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed.Pharmacother.* 57:399-411.
- Torphy, T. J. 1998. Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 157:351-370.
- Truong-Tran, A. Q., J. Carter, R. Ruffin und P. D. Zalewski. 2001. New insights into the role of zinc in the respiratory epithelium. *Immunol.Cell Biol.* 79:170-177.
- Ückert, S., A. Kuthe, U. Jonas und C. G. Stief. 2001. Characterization and functional relevance of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes of the human prostate. *J.Urol.* 166:2484-2490.
- Vallee, B. L. Und K. H. Falchuk. 1993. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev.* 73: 79-118
- van der Brüggen, T., S. Nijenhuis, E. van Raaij, J. Verhoef und B. S. van Asbeck. 1999. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway. *Infect.Immun.* 67:3824-3829.
- van Wouwe, J. P. und j. J. Uijlenbroek. 1994. The role of the pancreas in the regulation of zinc status. *Biol.Trace Elem.Res.* 42: 143-149
- Vartsky, D., S. Shilstein, A. Bercovich, M. Huszar, A. Breskin, R. Chechik, S. Korotinsky, S. D. Malnick und E. Moriel. 2003. Prostatic zinc and prostate specific antigen: an experimental evaluation of their combined diagnostic value. *J.Urol.* 170:2258-2262.
- Verghese, M. W., R. T. McConnell, A. B. Strickland, R. C. Gooding, S. A. Stimpson, D. P. Yarnall, J. D. Taylor und P. J. Furdon. 1995. Differential regulation of human monocyte-derived TNF alpha and IL-1 beta by type IV cAMP-phosphodiesterase (cAMP-PDE) inhibitors. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 272:1313-1320.
- Wang, K., B. Zhou, Y. M. Kuo, J. Zemansky und J. Gitschier. 2002. A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. *Am.J.Hum.Genet.* 71:66-73.
- Wätjen, W., J. Benders, H. Haase, F. Schwede, B. Jastorff und D. Beyersmann. 2001. Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> increase the cyclic GMP level in PC12 cells by inhibition of the cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Toxicology* 157:167-175.
- Wellinghausen, N., A. B. Schromm, U. Seydel, K. Brandenburg, J. Luhm, H. Kirchner und L. Rink. 1996a. Zinc enhances lipopolysaccharide-induced monokine secretion by alteration of fluidity state of lipopolysaccharide. *J.Immunol.* 157:3139-3145.
- Wellinghausen, N., C. Driessen und L. Rink. 1996b. Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells by zinc and related cations. *Cytokine* 8:767-771.

Wellinghausen, N., M. Martin und L. Rink. 1997. Zinc inhibits interleukin-1-dependent T cell stimulation. *Eur.J.Immunol.* 27: 2529-2535.

Wellinghausen, N. und L. Rink. 1998. The significance of zinc for leukocyte biology. *J.Leukoc.Biol.* 64:571-577.

Wu, J., P. Dent, T. Jelinek, A. Wolfman, M. J. Weber und T. W. Sturgill. 1993. Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* 262:1065-1069.

Yoshimura, T., C. Kurita, T. Nagao, E. Usami, T. Nakao, S. Watanabe, J. Kobayashi, F. Yamazaki, H. Tanaka und H. Nagai. 1997. Effects of cAMP-phosphodiesterase isozyme inhibitor on cytokine production by lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. *Gen.Pharmacol.* 29:633-638.

Zhou, Z., L. Wang, Z. Song, J. T. Saari, C. J. McClain und Y. J. Kang. 2004. Abrogation of nuclear factor-kappaB activation is involved in zinc inhibition of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production and liver injury. *Am.J.Pathol.* 164:1547-1556.

Zoli, A., L. Altomonte, R. Caricchio, A. Galossi, L. Mirone, M. P. Ruffini und M. Magaro. 1998. Serum zinc and copper in active rheumatoid arthritis: correlation with interleukin 1 beta and tumour necrosis factor alpha. *Clin.Rheumatol.* 17:378-38.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

|             |                                                                           |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 5'-AMP      | Adenosin-5'-Monophosphat                                                  |
| 5'-GMP      | Guanosin-5'-Monophosphat                                                  |
| 8-Brom-cGMP | 8-Bromguanosin-3', 5'-zyklisches<br>Monophosphothioat                     |
| A           | Adenin                                                                    |
| AC          | Adenylat-Cyclase                                                          |
| APS         | Ammoniumperoxodisulfat                                                    |
| ATF-2       | activating transcription factor-2                                         |
| ATP         | Adenosin-5'-Triphosphat                                                   |
| bp          | Basenpaar                                                                 |
| BSA         | bovine serum albumin, Rinderserumalbumin                                  |
| C           | Cytosin                                                                   |
| cAMP        | zyklisches Adenosin-3', 5'-monophosphat                                   |
| CD          | cluster of differentiation                                                |
| cGMP        | zyklisches Guanosin-3', 5'-monophosphat                                   |
| COPD        | chronic obstructive pulmonary disease                                     |
| CR          | conserved region                                                          |
| DB-cGMP     | N <sup>2</sup> , 2'-O-Dibutyrylguanosin-3', 5'-zyklisches<br>Monophosphat |
| DMEM        | Dulbecco's-modified Eagle's medium                                        |
| DNA         | desoxyribonucleic acid,<br>Desoxyribonukleinsäure                         |
| dNTP        | 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat                                     |
| EDTA        | Ethylendiamintetraessigsäure                                              |
| ELISA       | enzyme-linked immuno sorbent assay                                        |
| ERK1/2      | extracellular-signal-regulated kinase 1 and 2                             |
| FACS        | fluorescence-activated cell sorter,<br>Durchflusszytometer                |
| FCS         | fetal calf serum, Fötales Kälberserum                                     |
| FITC        | Fluoresceinisothiocyanat                                                  |
| FSK         | Forskolin                                                                 |
| G           | Guanin                                                                    |

|               |                                                                                  |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| GC            | Guanylat-Cyclase                                                                 |
| h             | hour, Stunde                                                                     |
| IBMX          | 3-Isobutyl-1-methylxanthine                                                      |
| IFN- $\gamma$ | Interferon-gamma                                                                 |
| IGF-1         | insulin-like growth factor-1                                                     |
| IL            | Interleukin                                                                      |
| IRAK          | IL-1 receptor-associated kinase                                                  |
| JNK           | c-Jun N-terminal kinase                                                          |
| kD            | Kilodalton                                                                       |
| LBP           | LPS-bindendes Protein                                                            |
| LPS           | Lipopolysaccharid                                                                |
| LY83583       | 6-(Phenylamino)-5, 8-quinolindion                                                |
| MAP           | mitogen-activated protein                                                        |
| MEK           | MAP/ERK kinase kinase                                                            |
| MLC           | mixed lymphocyte culture, gemischte<br>Lymphozytenkultur                         |
| mRNA          | messenger ribonucleic acid,<br>Ribonukleinsäure                                  |
| MT            | Metallothionein                                                                  |
| MTF-1         | metal-response element-binding transcription<br>factor-1                         |
| n.d.          | nicht detektierbar                                                               |
| NEAA          | non essential amino acids                                                        |
| NF $\kappa$ B | nuclear factor- $\kappa$ B                                                       |
| NO            | Stickstoffmonoxid                                                                |
| NOD           | Nonobese diabetic                                                                |
| PBMC          | peripheral blood mononuclear cells,<br>Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes |
| PBS           | phosphate buffered saline,<br>phosphatgepufferte Salzlösung                      |
| PCR           | polymerase chain reaction,<br>Polymerasekettenreaktion                           |
| PDE           | Phosphodiesterase                                                                |
| PHA           | Phytahaemagglutinin                                                              |

|                 |                                                                     |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------|
| PKA             | Protein Kinase A                                                    |
| PKG             | Protein Kinase G                                                    |
| PMA             | Phorbol-12-myristat-13-acetat                                       |
| Ro-20-1724      | 4-(3-Butoxy-4-methoxybenzyl)-imidazolidin-2-on                      |
| Rp-8-CPT-cAMPS  | 8-(4-Chlorophenylthio) Adenosin-3', 5'-zyklisches Monophosphothioat |
| Rp-8-pCPT-cGMPS | 8-(4-Chlorophenylthio) Guanosin-3', 5'-zyklisches Monophosphothioat |
| RmT             | Raumtemperatur                                                      |
| rpm             | rounds per minute, Umdrehungen pro Minute                           |
| RT              | Reverse Transkriptase                                               |
| SDS             | sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat                        |
| sGC             | soluble guanylate cyclase, zytoplasmatische Guanylat-Cyclase        |
| SNOC            | S-Nitrosocystein                                                    |
| T               | Thymin                                                              |
| Taq             | <i>Thermus aquaticus</i>                                            |
| TBE             | Tris-borate-EDTA                                                    |
| TBST            | Tris buffered saline Tween                                          |
| TEMED           | N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin                               |
| TLR-4           | Toll-like-Rezeptor-4                                                |
| TNF- $\alpha$   | Tumornekrosefaktor- $\alpha$                                        |
| TPEN            | N, N, N', N',-Tetrakis-(2-pyridyl-methyl)-ethylendiamin             |
| Tris            | Trishydroxymethylaminomethan                                        |
| ZIP             | Zrt-, Irt-like protein                                              |
| ZnT-1           | Zinktransporter-1                                                   |



## Lebenslauf

### Person

Verena von Bülow (geb. Preuß)  
geboren am 12. Januar 1978 in Goch  
verheiratet

### Schule

|             |                                             |
|-------------|---------------------------------------------|
| 08/84-07/88 | Grundschule, Düsseldorf                     |
| 08/88-02/90 | Theodor Fliedner Gymnasium, Düsseldorf      |
| 02/90-06/94 | Realschule in der Lohe, Düsseldorf          |
| 07/94-06/97 | Georg Büchner Gymnasium, Düsseldorf, Abitur |

### Studium

|             |                                                                                                                                             |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10/97-09/03 | Studium der Biologie an der RWTH Aachen                                                                                                     |
| 12/02-09/03 | Diplomarbeit am IZKF BIOMAT, Universitätsklinikum Aachen bei Univ.-Prof. Dr. Willi Jahnen-Dechent, Thema: „Regulation des Fetuin-Genlocus“, |
| seit 01/04  | Promotion am Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Aachen bei Univ.-Prof. Dr. Lothar Rink                                          |

### Studienbegleitende Tätigkeiten

Studentische Hilfskraft am Institut für Biotechnologie bei Prof. Hartmeier und am Institut für Physiologie, Universitätsklinikum Aachen bei Prof. Mottaghy

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Lothar Rink, der mir die Bearbeitung dieses interessanten Themas ermöglichte. Ich danke ihm herzlich für seine höchst engagierte Betreuung und seine uneingeschränkte Unterstützung.

Ich bedanke mich bei Prof. Klaus Wolf für die Bereitschaft als zweiter Gutachter zur Verfügung zu stehen.

Insbesondere möchte ich auch meinem Arbeitsgruppenleiter Prof. Hajo Haase danken, der durch sein stetes Interesse am Verlauf der Arbeit und seine Diskussionsbereitschaft eine produktive Zusammenarbeit ermöglichte. Ich möchte ihm für seine Geduld, seine Anregungen und für die Anleitung zum wissenschaftlichen Denken und Handeln herzlich danken.

Ich bedanke mich bei meiner Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die vielen Tips, Anregungen und Diskussionen im Laboralltag.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern des Institutes für Immunologie für eine angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, ihre Hilfsbereitschaft im Laboralltag, mit der sie mich und meine Arbeit tatkräftig unterstützt haben.

Ich danke meinem Mann Silvester für die anregenden Diskussionen und seine Unterstützung.

Herzlich möchte ich meiner Familie danken, die mich tatkräftig unterstützte und mir diesen Weg ermöglichte.