

Aus dem Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zum Einfluss von Zinkfinger-Protein 580 auf die LPS-
induzierte Interleukin-6-Produktion in Monozyten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Philipp Stenzel

aus Berlin

Datum der Promotion: 16.06.2018

Inhaltsverzeichnis

Abstract Deutsch	1
Abstract English.....	2
Abkürzungsverzeichnis.....	3
1 Einleitung.....	6
1.1 Zinkfinger-Proteine.....	6
1.1.1 C2H2-Zinkfinger-Proteine	6
1.1.2 Allgemeiner Aufbau und DNA-Bindung des Zinkfingers.....	7
1.2 Zinkfinger-Protein 580.....	8
1.3 Monozyten und MonoMac6.....	10
1.4 Lipopolysaccharid	11
1.5 NF κ B.....	13
1.5.1 Struktur des NF κ B-Komplex	13
1.5.2 Aktivierung von NF κ B	14
1.5.3 Funktion von NF κ B	15
1.6 Interleukin-6	15
1.7 Zielsetzung der Arbeit	16
2 Materialien und Methoden	18
2.1 Puffer und verwendete Substanzen	18
2.1.1 Zellkultur	18
2.1.2 Fluoreszenzmikroskopie	18
2.1.3 Proteinextraktion.....	18
2.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	19
2.1.5 Immunoblotting	20
2.1.6 Zellstimulationsexperimente	21
2.1.7 Reverse Transkription (RT).....	22
2.1.8 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	22
2.2 Methoden	23
2.2.1 Zellkultur	23
2.2.2 Fluoreszenzmikroskopie von ZNF580.....	23
2.2.3 Proteinextraktion und -quantifizierung.....	24
2.2.4 Immunoblotting	24
2.2.5 Stimulationsexperimente.....	25

2.2.6 RNA-Isolation und Reverse Transkription.....	26
2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion.....	27
2.2.8 RNA-Interferenz (RNAi) mittels siRNA-Transfektion von MonoMac6.....	30
2.2.9 IL-6-Proteinmessung im Überstand und Berechnung der IL-6-Produktionsrate.....	30
2.2.10 Statistische Analyse.....	31
3 Ergebnisse.....	32
3.1 Nachweis und Lokalisation von ZNF580 in MonoMac6.....	32
3.2 LPS-Dosis-abhängige Regulation von ZNF580.....	32
3.3 Negative Korrelation zwischen ZNF580 und IL-6 nach LPS-Stimulation.....	34
3.4 Erhöhte LPS-abhängige IL-6-Produktion nach Knockdown von ZNF580.....	36
3.5 Zeitgang der ZNF580-abhängigen IL-6-Produktion nach LPS-Stimulation	38
4 Diskussion	40
4.1 Monozytenmodell	40
4.2 ZNF580 in MonoMac6.....	40
4.3 Wirkung von LPS auf ZNF580.....	41
4.4 ZNF580-Knockdown führt zu einer erhöhten, LPS-induzierten IL-6-Produktion	42
4.5 ZNF580 im Zeitverlauf nach LPS-Stimulation	42
4.6 ZNF580 als Entzündungsmodulator durch IL-6-supprimierende Wirkung.....	44
4.7 Zusammenfassung.....	45
5 Ausblick	46
6 Literaturverzeichnis	48

Abstract Deutsch

Einleitung: Zinkfingerprotein 580 (ZNF580) ist an der Expressionsregulation verschiedener Zielgene und dadurch an der Modulation von Angiogenese und Endothelzellfunktionen beteiligt. Über seine Funktion bei entzündlichen Prozessen ist bislang wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit war die Überprüfung der Hypothese, dass ZNF580 an der Regulation von Entzündungsprozessen beteiligt ist.

Methoden: MonoMac6 wurden mit LPS, TNF- α oder fMLP stimuliert. Zum Nachweis und zur intrazellulären Lokalisation von ZNF580 wurden die Zellen nach Färbung im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Expression von ZNF580, IL-1, IL-6 und IL-8 wurde nach reverser Transkription der mRNA mittels quantitativer real-time PCR gemessen. Zur Quantifizierung von Proteinen wurden Zelllysate mittels Immunoblotting sowie Zellkulturüberstände mittels ELISA analysiert. Zum „Knockdown“ von ZNF580 wurde ZNF580-spezifische siRNA verwendet.

Ergebnisse: ZNF580 ist in MonoMac6 exprimiert und im Nukleus lokalisiert. Nach 24 h Stimulation mit LPS war die ZNF580-Expression erhöht, während TNF- α und fMLP unter diesen Bedingungen keinen Effekt zeigten. Zudem gab es nach LPS-Stimulation eine dosis-abhängige, negative Korrelation zwischen ZNF580 und IL-6. Dementsprechend war nach „Knockdown“ von ZNF580 mit spezifischer siRNA die LPS-abhängige IL-6-Produktion erhöht. Im Zeitgang der LPS-Stimulation war ZNF580 auf Proteinebene nach 2 h bis 8 h moderat erhöht und nach 16 h drastisch reduziert. Diese Reduktion fiel mit der zweiten Phase der prolongierten IL-6-Produktion zusammen.

Schlussfolgerung: In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass ZNF580 in MonoMac6 exprimiert wird und an der LPS-induzierten IL-6-Produktion beteiligt ist. Somit scheint ZNF580 ein neuer Akteur bei der Regulation von Entzündungsreaktionen von Monozyten zu sein.

Abstract English

Introduction: Zinc finger protein 580 (ZNF580) is a nuclear-located factor, probably affecting gene expression control. It is involved in the modulation of angiogenesis and endothelial function. Little is known about a role of ZNF580 in inflammation. The aim of this study was to determine how ZNF580 contributes to the regulation of inflammatory processes.

Methods: MonoMac6 were stimulated with LPS, TNF- α or fMLP. The cells were analysed with a fluorescence microscope for detection and intracellular localisation of ZNF580. Expression of ZNF580, IL-1, IL-6 and IL-8 was quantified after reverse transcription of mRNA via quantitative real-time PCR. For quantification of protein cell lysates were analysed via immunoblotting and cell culture supernatants via ELISA. Specific siRNA was used to knock out ZNF580 gene.

Results: ZNF580 is expressed in MonoMac6 and located in the nucleus. Its expression was increased after 24 h of LPS stimulation, whereas TNF- α and fMLP had no effect under these conditions. There was a dose-dependent negative correlation between ZNF580 and IL-6. siRNA mediated knockdown led to an increased IL-6 production after LPS stimulation in MonoMac6. The time course of LPS stimulation showed ZNF580 to be moderately increased after 2 h up to 8 h, followed by a sharp decline after 16 h. This late decline of ZNF580 coincided with the second phase of the prolonged IL-6 production.

Conclusion: This study showed, that ZNF580 is expressed in MonoMac6 and involved in the LPS-induced IL-6 production. Thus ZNF580 seems to be a novel player in the regulation of inflammatory reactions of monocytes.

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxosulfat
BAFF	B-Zell aktivierender Faktor
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
BTB	broad complex, tram track and bric a brac
C2H2-ZNF	Cystidin ₂ -Histidin ₂ -Zinkfinger-Proteine
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplimentäre Desoxribonukleinsäure
CRP	C-reaktives Protein
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino -2-Phenylindol-Dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dT	Deoxythymine
DTT	Dithiotreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinases 1 and 2
FKS	Fetales Kälberserum
fMLP	N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor
HCl	Salzsäure
HDL	high density lipoprotein

HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
HRP	horseradish peroxidase
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IFN- γ	Interferon γ
IL-1	Interleukin 1
IL-2	Interleukin 2
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kalium-Dihydrogenphosphat
KRAB	Krüppel associated box
LBP	Lipopolysaccharid-binding-protein
LDL	low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor
MMP-2	matrix metalloprotease 2
mRNA	messenger ribonucleotide acid
MyD88	myeloid differentiation primary response protein 88
Na ₂ HPO ₄	Di-Natrium-Hydrogenphosphat
Na ₃ VO ₄	Natrium-ortho-Vanadat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaPi	Natriumphosphat
NF κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NIK	NF κ B-induzierende Kinase
oxLDL	oxidiertes low density lipoprotein
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEST	Penicillin/Streptomycin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbolmyristataacetat

PMSF	Phenylmethanolsulfonylfluorid
POZ	poxvirus and zinc finger
PVDF	Polyvinylidendifluorid
q-rt-PCR	quantitative real-time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	Ribonukleinsäure-Interferenz
RNAse	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkription
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SCAN	<u>S</u> erum Response Element Zinc finger domain Binding Protein, <u>C</u> Tfin51 (=Zinc finger and SCAN domain-containing protein 21), <u>A</u> W-1 (=ZNF174) and <u>N</u> umber 18 cDNA (=ZNF197)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SE	Standardfehler
siRNA	small interfering ribonucleotid acid
SMAD2	Mothers against decapentaplegic homolog 2
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TF	tissue factor
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TLR-4	MD-2/toll-like receptor-4-Komplex
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TRIS	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-Propan-1,3-diol
VEGF-A	vascular endothelial growth factor A
ZNF580	Zinkfinger-Protein 580

1 Einleitung

1.1 Zinkfinger-Proteine

1.1.1 C2H2-Zinkfinger-Proteine

Transkriptionsfaktoren regulieren die Ablesevorgänge von Genen und sind dadurch an einer Vielzahl von Entwicklungs-, Differenzierungs- und Anpassungsvorgängen im menschlichen Körper beteiligt. Zinkfinger sind bekannte Motive in Transkriptionsfaktoren und können an die Desoxyribonukleinsäure (DNA) binden, eine notwendige Voraussetzung dafür, dass die Genexpression beeinflusst werden kann. Außerdem können auch Ribonukleinsäuren (RNA) (1) oder andere Proteine (2) mit dem Zinkfinger gebunden werden. Nach dem Vorkommen bestimmter Aminosäuren in der Zinkfinger-Struktur, können insgesamt 26 Zinkfinger-Protein-Familien unterschieden werden (3). Die größte Gruppe dabei ist die der Cystidin₂-Histidin₂-Zinkfinger-Proteine (C2H2-ZNF) (4,5).

C2H2-ZNF wiederum können in drei Gruppen nach Anzahl und Anordnung der Zinkfinger eingeteilt werden:

1. drei Zinkfinger am C-terminalen Ende, dazu gehört u.a. die Familie der Krüppel-like-Faktoren;
2. ein oder mehrere paarige Zinkfinger, wobei diese über das gesamte Protein verteilt sind;
3. Gruppen von vier oder mehr Zinkfingern, wobei in einem Protein auch mehrere verschiedene Zinkfinger-Domänen vorkommen können. Manche Zinkfinger-Proteine weisen Charakteristika mehrerer Gruppen auf (4,5).

Zudem können C2H2-ZNF auch nach dem Vorkommen anderer, Zinkfinger-unabhängiger, Proteindomänen eingeteilt werden, wie z.B. die „Krüppel associated box domain“ (KRAB-Domäne), „Serum Response Element Zinc Binding Protein, CTfin51 (=Zinc finger and SCAN domain-containing protein 21), AW-1 (=ZNF174) and Number 18 cDNA (=ZNF197)-domain“ (SCAN-Domäne) oder „broad complex, tram track and

bric a brac/pox virus and zinc finger domain“ (BTB/POZ-Domäne), welche für die Bindung an andere Proteine wichtig sind (4). Die meisten der C2H2-ZNF wirken als Repressoren der Gen-Transkription über die Bildung von Heterochromatin via Histon-Deacetylierung bzw. -Methylierung und Rekrutierung von Heterochromatin-Protein 1 (4). C2H2-ZNF, die die Transkription von Genen initiieren, tragen zur Bildung des Transkriptions-Initiationskomplex bei (4).

1.1.2 Allgemeiner Aufbau und DNA-Bindung des Zinkfingers

Der allgemeine Aufbau eines C2H2-Zinkfingers besteht aus der Konsensus-Sequenz (F/Y)-X-C-X₂₋₅-C-X₃-(F/Y)-X₅-ψ-X₂-H-X₃₋₅-H, wobei X für jede beliebige Aminosäure und ψ für einen hydrophoben Rest steht (6). Die Aminosäuren formen als Sekundärstruktur zwei β-Faltblätter sowie eine α-Helix, in der das Zink-Ion koordinativ an die zwei Cystidin- und Histidin-Reste gebunden wird (Abbildung 1.1) (6).

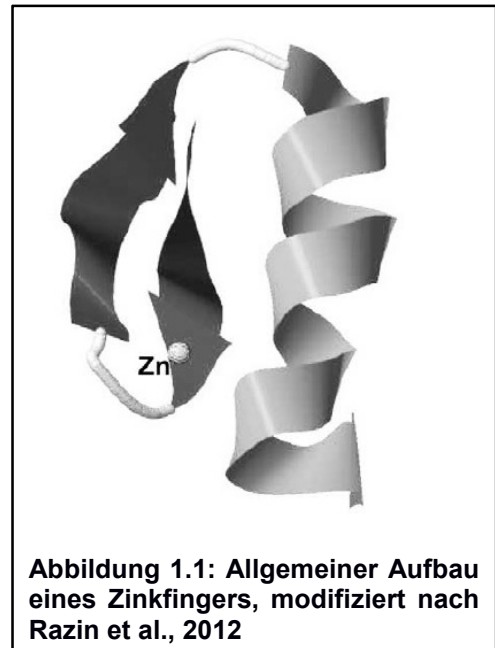
C2H2-Zinkfinger können über zwei Mechanismen an die DNA binden:

1. Vier Aminosäurereste, die sich am N-terminalen Ende der α-Helix befinden, binden über Wasserstoffbrückenbindungen an die DNA (6). Die Position und Typ der Aminosäuren können jedoch bei verschiedenen Zinkfinger-Proteinen unterschiedlich sein.
2. Zur Bindungsstabilisierung binden Aminosäuren auch an die DNA-Phosphatleiter.

Die Anzahl der Zinkfinger in einem Protein ist zudem verantwortlich für die Bindungsaffinität an die DNA: Je mehr Zinkfinger in einem Protein vorkommen, desto höher ist die Affinität. Die Spezifität der Bindung ist am ehesten durch die Interaktion zwischen Aminosäuren und DNA-Basen bestimmt, wobei hierfür vor allem die Bindung zwischen Arginin und Guanin wichtig ist (6).

1.2 Zinkfinger-Protein 580

Zinkfinger-Protein 580 (ZNF580) ist ein Mitglied der C2H2-Zinkfinger-Proteinfamilie (7) mit drei Zinkfinger-Strukturen am C-terminalen Ende (8), deren Sequenzen in Abbildung 1.2 angegeben sind (9). Es ist an der Regulation verschiedener Zielgene beteiligt, die unter anderem Angiogenese, Endothelzellfunktionen und die endotheliale Stickstoffmonoxid-Produktion beeinflussen (8,10,11). In EA.hy926-Zellen, einer Endothelzelllinie, zeigt sich nach Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-Stimulation eine zeit- und dosisabhängige Hochregulation von ZNF580-messenger Ribonucleinsäure (mRNA) und -Protein über den p38-MAP-Kinase-Signalweg (8). Zudem ist die Expression von „matrix metalloproteinase 2“ (MMP2) und von „vascular endothelial growth factor a“ (VEGF-A) sowie Endothelzellmotilität und -proliferation abhängig von ZNF580 (8).



Des Weiteren ist in EA.hy926 nach Stimulation mit transforming growth factor β (TGF- β) die Expression der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) sowie auch Endothelzellmigration und -proliferation ZNF580-abhängig (11). Wie in einer weiteren Studie per yeast-two-hybrid-screen gezeigt wurde, bindet ZNF580 in HEK293-Zellen an das Protein Mothers against decapentaplegic homolog 2 (SMAD2) (10). In EA.hy926 wiederum sind die übereinander gelegten Fluoreszenzsignale beider Proteine im Nuk-

leus deckungsgleich, so dass auch hier aufgrund der Kolo-kalisation eine Bindung diskutiert wird (10).

Im Tiermodell ist das Homologprotein von ZNF580 in Ratten – *ZFP580* genannt – an der Entwicklung und Differenzierung von endothelialen Progenitorzellen in reife Endothelzellen sowie an der Blutgefäßbildung beteiligt (12). Hieraus wird ein möglicher therapeutischer Nutzen bei der Behandlung von Gefäßerkrankungen abgeleitet. Nach ZNF580-Gen-transfer mittels Mikropartikeln, Nanopartikeln oder Micellen in EA.hy926 ist die Migration der Endothelzellen verbessert (13–19). Zudem ist ZFP580 im Rattenmodell und an der aus embryonalen Rattenherzen gewonnenen Zelllinie H9c2 ein Mediator des „Preconditioning“, dem kardioprotektiven Effekts von intermittierender Höhenhypoxie: Als Signalmolekül im protektiven extracellulär signal-response kinases 1 and 2-Signalweg (ERK1/2) hemmt es die Zellapoptose (20). Neueste Arbeiten zeigen zudem, dass ZFP580 auch im Rattenmodell am TGF- β -/Smad2-Signalweg beteiligt ist und dort die protektiven Effekte von TGF- β auf Kardiomyozyten reguliert, indem es den mitochondrialen Signalweg der Apoptose inhibiert (21).

Ferner ist ZNF580 an Entzündungsvorgängen am Endothel involviert (22,23). So wird ZNF580 auf mRNA-Ebene in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) nach Stimulation mit nativem low density lipoprotein (LDL) dosisabhängig induziert, während andere Stimulatoren wie high density lipoprotein (HDL) oder Tumornekrose-Faktor α (TNF- α) keinen Effekt auf die Expression haben. Gleichzeitig hat eine Inkubation von HUVEC mit LDL-Partikeln mit höherem Oxidationsniveau (oxLDL) eine Abnahme von ZNF580 zur Folge. Nach siRNA-Knockdown von ZNF580 zeigt sich eine starke und signifikante Induktion von Interleukin 8 (IL-8) und eine erhöhte Adhäsion von Monozyten am Endothel. Folglich ist auch nach Stimulation von HUVEC mit höher oxidiertem LDL und einer Abnahme von ZNF580 die IL-8-Produktion erhöht (22). In einer weiteren Studie ist ZNF580 in EA-hy926 nach H₂O₂-Stimulation zeit- und dosisabhängig auf mRNA- und Proteinebene heraufreguliert. Dieser Effekt wird durch einen chemischen Inhibitor der p65-Untereinheit von nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF κ B) teilweise aufgehoben. Im Gegensatz zu Hofmann et al. führt eine ZNF580-

Überexpression zu einer signifikanten Induktion von IL-8 in EA.hy926, sowohl basal als auch nach H₂O₂-Stimulation (23).

1.3 Monozyten und MonoMac6

Monozyten sind Zellen der myeloischen Reihe und zirkulieren im peripheren Blut. So-

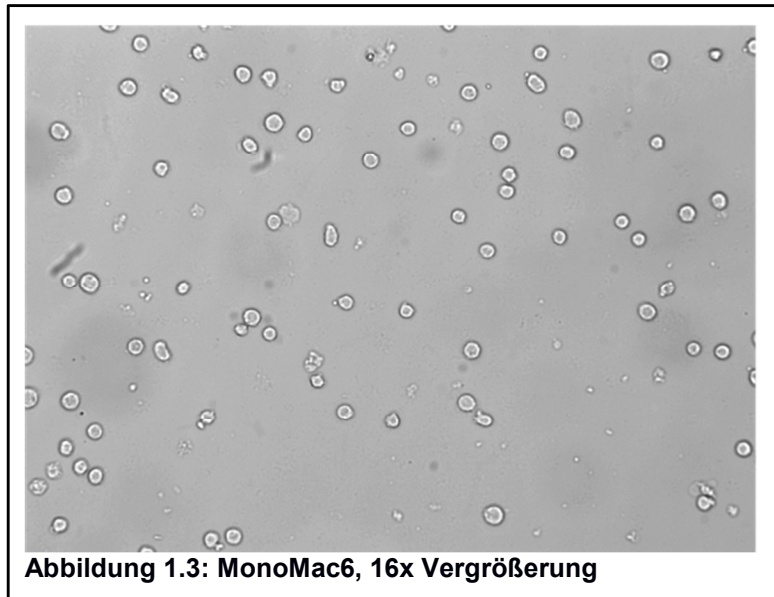


Abbildung 1.3: MonoMac6, 16x Vergrößerung

wohl während Homöostase als auch bei einem Entzündungsprozess emigrieren sie aus dem Blut in die angrenzenden Gewebe bzw. an den Ort der Entzündung und differenzieren sich in Makrophagen oder Gewebe-spezifische Dendritische Zellen. Sie sind somit zentrale Akteure des angeborenen und auch des adaptiven Immunsystems und als solche an der Entzündungsantwort

v.a. gegen bakterielle Infektionen, aber auch gegen Virus- und Pilzinfektionen beteiligt (24,25).

Die Zelllinie MonoMac6 (Abbildung 1.3) wurde aus Blutproben eines Patienten isoliert, der im Frühjahr 1985 an einer monoblastischen Leukämie erkrankte (26). Unter Therapie wurde zunächst eine Remission erreicht, jedoch rezidierte die Erkrankung im Sommer und der Patient verstarb. MonoMac6 weisen Monozyten-assoziierte Oberflächenmarker, z.B. Cluster of Differentiation 14 (CD14), auf, während Lymphozyten-typische Oberflächenmarker (CD3 und CD20) fehlen. MonoMac6 sind zu Monozyten-typischem biologischen Verhalten in der Lage wie Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Phagozytose. Interessanterweise zeigt der Vergleich mit den Monozyten-Zelllinien U-937 und THP-1, dass bei diesen beiden Zelllinien CD14 basal oder nach IFN- γ -Stimulation entweder gar nicht oder in geringerem Ausmaß als bei

MonoMac6 exprimiert wird, so dass MonoMac6 ein besseres Modell für reife Monozyten darstellen (26). MonoMac6 sind als Reaktion auf einen LPS-Stimulus in der Lage, eine Reihe proinflammatorischer Zytokine (u.a. TNF- α , Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6)), zu sezernieren (27), die für Monozyten charakteristisch sind. Dieser Effekt kann durch eine prä-stimulatorische Inkubation mit IFN- γ oder LPS im Sinne einer LPS-Desensibilisierung abgeschwächt werden (27,28). Darüber hinaus können MonoMac6 durch verschiedene Stimuli in Richtung reifer Monozyten differenziert werden. Die drei Substanzen Prostaglandin E₂ (PGE₂), Lipopolysaccharid (LPS) und Phorbolmyristacetat (PMA) erhöhen in unterschiedlichem Ausmaß die Fähigkeit zur Adhäsion und Phagozytose sowie die Expression von Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor (M-CSF). Zudem werden nach Stimulation spezifische Oberflächenmoleküle reifer Monozyten (CD14, CD23) vermehrt und CD33 als ein Marker unreifer myeloischer Vorläuferzellen weniger exprimiert (29). NF κ B, ein zentraler Akteur von Entzündungsvorgängen, wird konstitutiv in MonoMac6 exprimiert; das Expressionsniveau bleibt auch nach Reifeinduktion mit Vitamin D₃ unverändert (30). Zusammenfassend weisen MonoMac6 Charakteristika reifer Monozyten auf und ähneln ihnen in ihrem biologischen Verhalten, so dass es sich um eine gute Monozyten-Modellzelllinie für *in vitro*-Versuche handelt.

1.4 Lipopolysaccharid

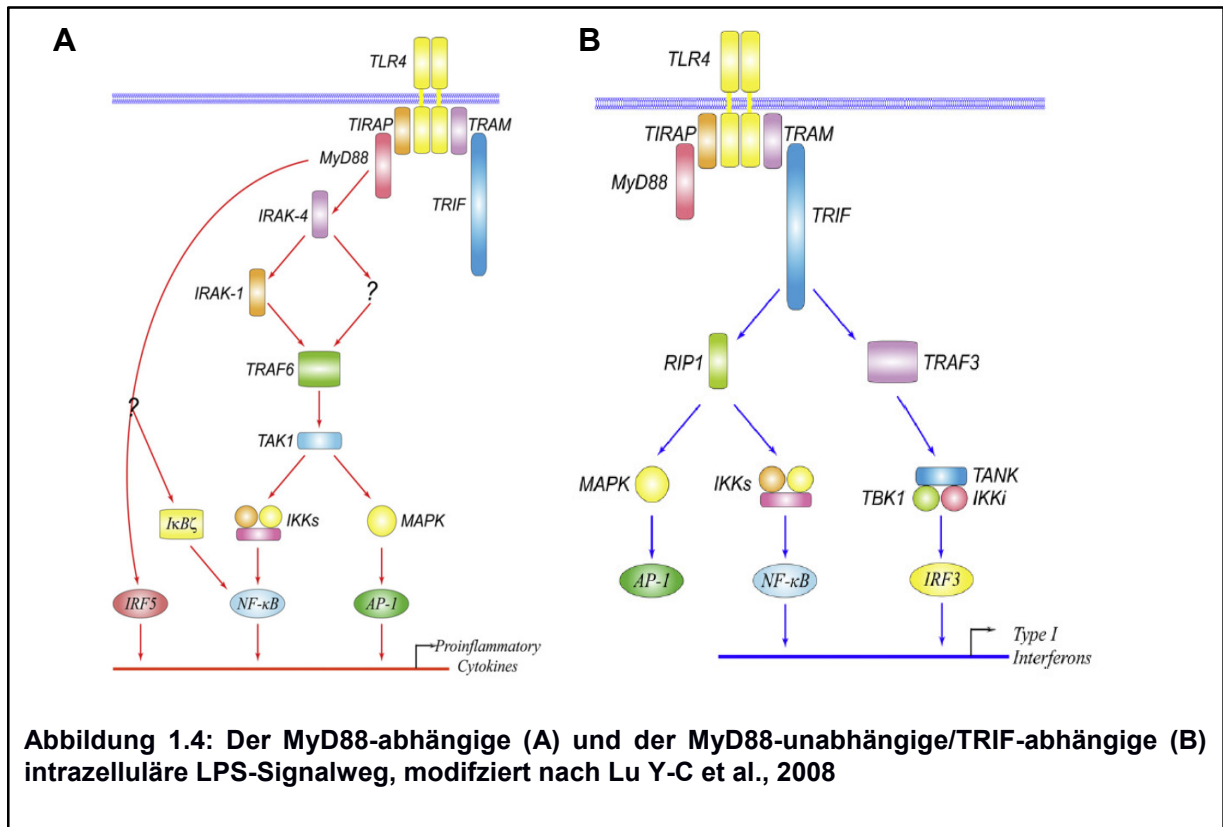
LPS ist ein essentieller Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien. Es besteht aus den drei Untereinheiten Lipid A, O-Polysaccharid und der Kernregion (31): Von Lipid A wird angenommen, für die toxischen Effekte verantwortlich zu sein. Das O-Polysaccharid ist eine variable Seitenkette, die abhängig vom Subtyp des gramnegativen Bakteriums ist. Die Kernregion verbindet die beiden Untereinheiten miteinander.

LPS bindet auf der Zelloberfläche an CD14 und wird dadurch dem Toll-like-receptor 4 (TLR4) präsentiert. Zudem können CD14 und Lipopolysaccharid-binding-protein (LBP) zusammen LPS aus der äußeren Zellwand von Bakterien herauslösen und so das LPS-Signal noch zusätzlich verstärken (32). Nach LPS-Bindung an TLR4 kommt es zu einer Rezeptor-Homodimerisierung, so dass an die intrazellulären Rezeptoranteile weitere Signalmoleküle binden können: Es wird eine myeloid differentiation primary response

protein 88-abhängige (MyD88) und MyD88-unabhängige intrazelluläre Signalkaskade unterschieden (32). Beide führen zu einer Aktivierung von NFκB und weiterer Transkriptionsfaktoren, die letztendlich die Transkription proinflammatorischer Zytokine (MyD88-abhängiger Signalweg) bzw. Typ-I-Interferonen (MyD88-unabhängiger oder TRIF-abhängiger Signalweg) induzieren (33,34) (Abbildung 1.4). LPS induziert über diese Signalkaskade in Monozyten die Transkription einer Reihe von proinflammatorischen Zytokinen, darunter auch IL-6 (32) (Tabelle 1).

Tabelle 1: Von Monozyten/monozytischen Zellen produzierte Zytokine, modifiziert nach Rossol et al, 2011

Zytokine	Funktion	Kinetik
TNF- α	pro-inflammatorisch	früh (4 h)
IL-1	pro-inflammatorisch	früh bis spät (2 h – 12 h)
IL-6	pro-inflammatorisch	früh (7 h)
IL-8	pro-inflammatorisch	früh (4 h)



1.5 NF κ B

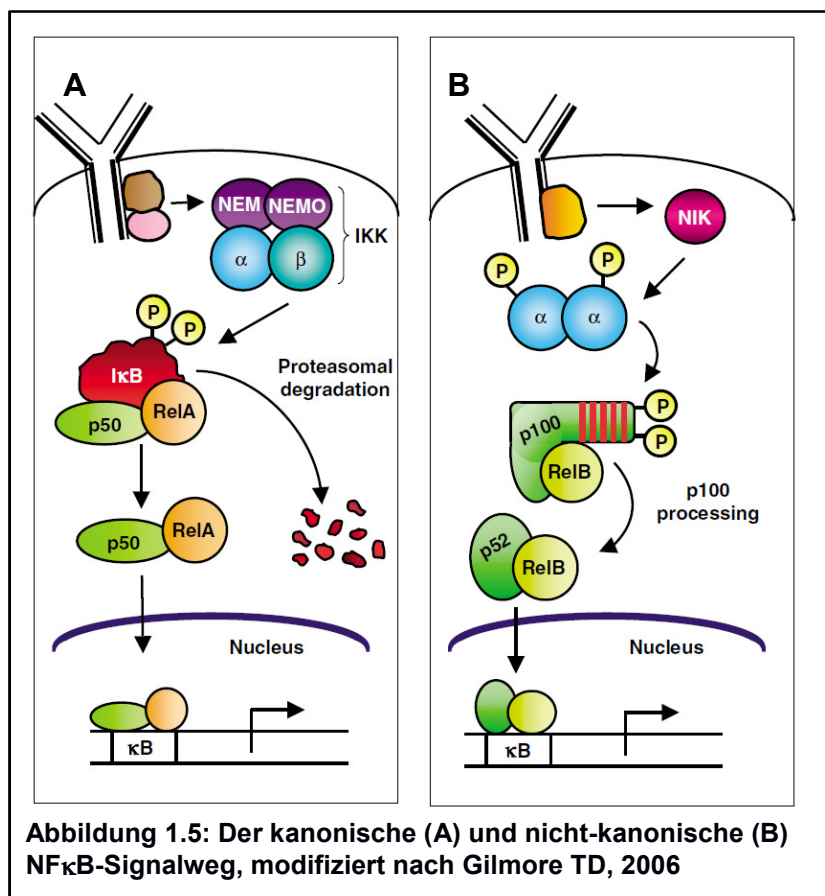
1.5.1 Struktur des NF κ B-Komplex

Der ruhende NF κ B-Komplex besteht aus mehreren Untereinheiten im Zytosol und transloziert nach Stimulation durch proinflammatorische Mediatoren in den Zellkern. Dort induziert er in Abhängigkeit des Stimulus proinflammatorische Zytokine und wird als ein zentraler Akteur in Entzündungsprozessen angesehen. Die Untereinheiten des Komplexes sind in Säugetieren Homo- oder Heterodimere von Proteinen der Rel-Familie (RelA (früher p65), RelB und c-Rel) sowie der NF κ B-Familie (p105 und p100) (35–37). Aus den Proteinen der NF κ B-Familie können durch limitierte Proteolyse die Proteine p50 und p52 gebildet werden. Alle Proteine haben die Rel-Homologie-Domäne, mit der sie aneinander binden können. Bis auf RelB kommen diese Proteine auch als Homodimere *in vivo* vor (38). Zusätzlich besitzen die Proteine der Rel-Familie eine C-terminale Transaktivierungsdomäne, mit der sie die Transkription von Genen induzieren können, während diese bei p50 und p52 fehlt. So ist zu erklären, dass die NF κ B-

Heterodimere, typischerweise p50/RelA oder p52/RelB, nach Translokation in den Nukleus die Transkription von Genen induzieren, p50- bzw. p52-Homodimere diese jedoch hemmen (38).

1.5.2 Aktivierung von NF κ B

Der NF κ B-Komplex liegt in ruhenden Zellen im Zytosol vor und wird durch die Bindung von inhibierenden Proteinen der I κ B-Familie inaktiviert (36–39). Nach Bindung von Liganden an bestimmte Membranrezeptoren (z.B. TLR4) kommt es zum Abbau von I κ B, wodurch der hemmende Einfluss aufgehoben wird und NF κ B in den Nukleus translozieren kann (36,38,39). Dort bindet der Proteinkomplex an das κ B-Motiv mit der teilweise palindromischen Konsensussequenz 5'-GGGACTTTCC-3' (39).



Es gibt zwei verschiedene Signalwege, die zum Abbau von I κ B und dadurch zur Aktivierung von NF κ B führen (35) (Abbildung 1.5):

1. der kanonische Signalweg, der v.a. bei Prozessen des angeborenen Immunsystems beteiligt ist und über Phosphorylierung von I κ B durch die I κ B-Kinase (IKK), welche aus einer α -Untereinheit, einer β -Untereinheit und dem regulatorischen Protein NEMO besteht, zum

proteolytischen Abbau von I κ B und zur Aktivierung von p50/RelA-Dimeren führt. Die meisten physiologischen Stimuli, wie z.B. auch LPS, aktivieren diesen Signalweg.

2. der nicht-kanonische Signalweg, der bei Prozessen des erworbenen Immunsystems beteiligt ist (35,40). Dabei kommt es durch Bindung bestimmter Moleküle, wie z.B. Lymphotoxin B, B-Zell aktivierender Faktor (BAFF) oder CD40, zur Aktivierung von NF κ B-induzierender Kinase (NIK), die einen Komplex aus zwei α -Untereinheiten der IKK phosphoryliert und damit aktiviert. Dieser wiederum phosphoryliert das p100-Protein, was zur limitierten Proteolyse und Freisetzung des p52/RelB-Komplexes führt. Darüber hinaus gibt es weitere Wege der NF κ B-Aktivierung, deren physiologische Bedeutung noch nicht abschließend geklärt ist (35).

1.5.3 Funktion von NF κ B

NF κ B ist in die Regulation verschiedener zellulärer Prozesse eingebunden, z.B. bei der Differenzierung von Prä-B-Zellen zu reifen B-Zellen (37) oder beim Immunglobulin-Klassenwechsel nach LPS-Stimulation (39). In T-Zellen kommt es nach Aktivierung mit physiologischen Mediatoren, die zu einer intrazellulären Kalzium-Mobilisierung und einer Proteinkinase-C-Aktivierung (PKC) führen, immer auch zu einer NF κ B-Aktivierung, in deren Folge es die Synthese von Interleukin 2 (IL-2), einem autokrinen Stimulus für T-Zell-Proliferation, induziert (37). In Monozyten und Makrophagen kommt es nach LPS-Stimulation zu einer schnellen Transkription einer Reihe von proinflammatorischen Genen, darunter M-CSF, Granulozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor (G-CSF), Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor (GM-CSF), TNF- α , IL-1 und IL-6, tissue factor (TF) und der α -Untereinheit des IL-2-Rezeptors (37,39). In Monozyten bindet NF κ B unter anderem an den IL-6-Promotor (41).

1.6 Interleukin-6

IL-6 ist ein Zytokin mit pleiotropen, sowohl proinflammatorischen als auch antiinflammatorischen Effekten, wodurch es zur Krankheitsentstehung und -progression, aber auch zur Beendigung von Entzündungsprozessen beitragen kann (42). Es wird lokal im Ge-

webe, u.a. von Monozyten und Makrophagen, produziert und gelangt in den Blutkreislauf, wodurch es systemische Effekte hat. Es bewirkt die Differenzierung von B-Zellen in Antikörper-produzierende Plasmazellen bzw. in regulatorische B-Zellen (42). Auf ruhende T-Zellen wirkt es aktivierend und antiapoptotisch, fördert die Differenzierung in proinflammatorische Th1- oder auch Th17-Zellen und inhibiert die Differenzierung in regulatorische T-Zellen mit antiinflammatorischer Wirkung (43,44). IL-6 induziert in der Leber die Synthese von sog. Akute-Phase-Proteinen, darunter C-reaktives Protein (CRP), Serum-Amyloid, α 1-Antitrypsin, Ferritin und Haptoglobin (31,39).

Über die oben genannten Mechanismen ist IL-6 an der Pathogenese einer Reihe von chronisch-entzündlichen Erkrankungen beteiligt, wie z.B. rheumatoider Arthritis, systemischer Sklerose, multipler Sklerose oder systemischem Lupus erythematoses (45). Bei diesen Erkrankungen gibt es mit IL-6-neutralisierenden Antikörpern Behandlungsstrategien, die diese immunmodulatorischen Effekte von IL-6 vermindern (45,46). Die Assoziation von chronisch-entzündlichen Erkrankungen mit Tumorentstehung und -progression über IL-6 ist mittlerweile gut belegt (45). So erhält IL-6 bei Colitis ulcerosa- bzw. M. Crohn-assoziierten kolorektalen Karzinomen die entzündliche Aktivität der zugrunde liegenden Darmerkrankung und wirkt proliferationsfördernd und antiapoptotisch auf Tumorzellen (47). Zudem ist IL-6 ein wichtiger Mediator in der Sepsis, einem Krankheitsbild mit systemischer Entzündung und mit konsekutiver hoher Morbidität und Mortalität (48). Im klinischen Alltag ist IL-6 ein anerkannter Sepsis-Marker und wird bei der Diagnostik eingesetzt (49,50). Darüber ist IL-6 ein prädiktiver Marker für die Gesamtmortalität von Sepsispatienten nach Entlassung aus dem Krankenhaus (51).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

ZNF580 ist ein noch wenig charakterisierter Transkriptionsregulator. Bisherige Ergebnisse über seine Beteiligung an Reaktionen des vaskulären Endothels auf inflammatorische Stimuli wie oxLDL oder H₂O₂ ebenso wie die protektive Rolle im Rahmen des Ischämie-Reperfusionssyndroms führen zu der Hypothese, dass ZNF580 als Mediator inflammatorischer Reaktionen fungiert. Besonders schwerwiegende Entzündungsreaktionen treten bei einer Sepsis auf. Zentrale Akteure einer Sepsis sind Monozyten. Diese

Zellen sind an der Initiation einer Entzündung beteiligt sind, indem sie Zytokine sezernieren und ROS produzieren. Einer der potentesten Aktivatoren von Monozyten ist LPS. Eines der Haupteffektormoleküle von Monozyten ist IL-6, ein Mediator der sog. Akuten Phase. Daher soll in dieser Studie nach Stimulation mit LPS ZNF580 in Monozyten und die Produktion von IL-6 untersucht werden.

Dazu soll zunächst gezeigt werden, ob ZNF580 in der Monozyten-Zelllinie MonoMac6 exprimiert wird und ob seine Expression durch Stimulation mit Entzündungsmediatoren beeinflusst werden kann. Sodann soll der Zusammenhang zwischen ZNF580 und der Produktion von IL-6 LPS-Dosis- und Zeit-abhängig untersucht werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Puffer und verwendete Substanzen

2.1.1 Zellkultur

- RPMI-Medium (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Fetales Kälberserum (FKS) (Biochrom, Berlin, Deutschland), 10 % (v/v)
- L-Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland), 2 mM
- Penicillin/Streptomycin (PEST) (Biochrom, Berlin, Deutschland), 0,5 % (v/v)
- vor siRNA-Transfektion: OPI-Supplement (0,15 g Oxaloacetat, 0,05 g Pyruvat und 0.0082 g Insulin) (Sigma-Aldrich, München, Germany)

2.1.2 Fluoreszenzmikroskopie

- FKS (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Methanol (-20°C) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) mit/ohne Magnesium-/Calciumchlorid (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Bovines Serum Albumin (BSA) (Sigma Aldrich, München, Deutschland)
- 4',6-Diamidino -2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI) (Merck, Darmstadt, Germany)

- PBS-BSA 1 % (w/v): BSA 1 % (w/v) in 1x PBS

- PBS-BSA-Triton-X: BSA 1 % (w/v), Triton X-100 0,1 % (v/v) in 1x PBS

2.1.3 Proteinextraktion

- Protein-Extraktions-Puffer:
 - Natriumphosphat (NaPi) (pH 7,8) (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 20 mM
 - Triton X-100 (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), 1 % (v/v)

- Natriumchlorid (NaCl) (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 150 mM
 - Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 2,5 mM
 - Natrium-ortho-Vanadat (Na_3VO_4) (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), 1 mM
 - Natriumfluorid (NaF) (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 50 mM
 - Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 1 mM
 - Leupeptin (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
 - Pepstatin A (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
 - Aprotinin (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
- 6x Lämmli Buffer:
- 2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-Propan-1,3-diol (TRIS)/Salzsäure (HCl), pH 6,8 (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,3 M
 - Natriumdodecylsulfat (SDS) (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 10 % (w/v)
 - Glycerol (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 30 % (v/v)
 - Bromphenolblau (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,1 % (w/v)
 - DTT, 100 mM (kurz vor Benutzung hinzugefügt) (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- Bradford-Reagenz (Biorad, München, Deutschland)

2.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

- Sammelgel, 4 %:
- 1,84 mL H_2O
 - 313 μL Tris-HCl, pH 6,8 (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 1 M
 - 12,5 μL SDS (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 20 %
 - 345 μL Acrylamide, 8% Bisacrylamide (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), 30 %
 - 5 μL Tetramethylethyldiamin (TEMED) (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), 0,2 %

- 12,5 µL Ammoniumperoxosulfat (APS) (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), 10 %
- Trenngel, 12 %:
 - 3,35 mL H₂O
 - 2,5 mL Tris-HCl, pH 8,8 (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 1,5 M
 - 50 µL SDS (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 20 %
 - 4 mL Acrylamide 30 %, Bisacrylamide 8 % (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
 - 10 µL TEMED (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), 0,1 %
 - 50 µL APS (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), 10 %
- Anodenpuffer: Tris, pH 8,9 (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,2 M
- Kathodenpuffer:
 - Tricin (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,1 M
 - Tris (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,1 M
 - SDS (w/v) (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,1 %
- Proteinmarker: Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BioRad, München, Deutschland)

2.1.5 Immunoblotting

- Transferpuffer:
 - Methanol (v/v) (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 10 %
 - Glycin (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 150 mM
 - Tris (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 25 mM
- PBS 10x (nach Maniatis):
 - NaCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 1,37 M
 - Kaliumchlorid (KCl) (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 27 mM

- Dinatrium-Hydrogenphosphat (Na_2HPO_4) (Roth, Karlsruhe, Deutschland),
100 mM
- Kalium-Dihydrogenphosphat (KH_2PO_4) (Roth, Karlsruhe, Deutschland),
17,5 mM
- in MilliQ-Wasser aufgelöst and zu einem pH 7,4 mit Salzsäure adjustiert

- Waschpuffer PBS-T: Tween-20 (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) 0,1 % (v/v) in
1x PBS (Biochrom, Berlin, Deutschland)

- Blockierungspuffer: Sucofin Milchpulver (TSI Company GmbH und Co. KG, Germany)
5 % (w/v) in PBS-T

- Ladekontrolle:
 - Ponceau-Rot (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
 - Essigsäure (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 5 % (v/v)

- Dunkelkammer:
 - Western Lightning chemiluminescence kit (Perkin Elmer, Waltham, Massachu-
setts, USA)
 - Hyperfilm enhanced chemiluminescence (ECL) (Amersham, Freiburg, Germany)

2.1.6 Zellstimulationsexperimente

Stammlösungen:

- LPS 055:B5 (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) 1 mg/mL in PBS (Biochrom, Ber-
lin, Deutschland)
- N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) (Sigma-Aldrich, München, Deutsch-
land) 10 mM in Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS (Biochrom, Berlin,
Deutschland)

2.1.7 Reverse Transkription (RT)

- Oligo-deoxy-Thymin(dT)-Annealing-Mix: für 15 μL
 - 2 μg Ribonukleinsäure (RNA) (= x μL)
 - 1 μL Oligo-dT-Primer (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - 15 μL – x μL RNA – 1 μL Oligo-dT-Primer = y μL Ribonuklease (RNase)-freies Wasser (Qiagen, Hilden, Deutschland)

- RT-Mix: für 10 μL
 - 2,75 μL RNase-freies Water (Qiagen, Hilden, Deutschland)
 - 5 μL RT-Puffer (M1701, Promega, USA), 5fach
 - 1,25 μL Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) (L785.2, Roth, Karlsruhe, Germany), 10 mM
 - 1 μL (=200U) Reverse Transkriptase (M1701, Promega, Madison, WI, USA)

2.1.8 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

- Primer-Mix (Verdünnung 1:70):
 - 1 μL forward Primer
 - 1 μL reverse Primer
 - 68 μL Desoxyribonuklease(DNAse)-freies Wasser (Qiagen, Hilden, Deutschland)

- PCR-Mix:
 - 10 μL SYBR-Green-Mastermix (QuantiTect SYBR Green PCR Kit, Qiagen, Hilden, Germany)
 - 4 μL Primer-Mix
 - 4 μL DNAse-freies Wasser (Qiagen, Hilden, Deutschland)
 - 2 μL komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

MonoMac6-Zellen wurden in RPMI-1640-Medium, ergänzt mit FKS 10 %, L-Glutamin 2 mM und PEST 0,5 %, bei 37°C in einem Inkubator in angefeuchteter Atmosphäre kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die in Suspension lebenden Zellen bei einer Dichte von $1,4 \times 10^6$ Zellen/mL im Verhältnis 2:1 passagiert. Dazu wurde zu den in Kulturmedium befindlichen Zellen das gleiche Volumen hinzugefügt, mittels Auf- und Abpipettieren eine homogene Suspension hergestellt, die Hälfte wieder entnommen, in eine weitere Kulturflasche übertragen oder für Experimente verwendet. Vor Transfektion mit siRNA wurde dem Medium zusätzlich das OPI-Supplement hinzugefügt.

2.2.2 Fluoreszenzmikroskopie von ZNF580

Zellpellets von MonoMac6 wurden durch fünfminütige Zentrifugation bei 4° C und 106 x g (1000 Umdrehungen/Minute) (Zentrifuge 5417 R, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) erstellt und der Überstand verworfen. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden in 200 µL FKS resuspendiert und auf einem Objektträger ausgestrichen. Nach Trocknung wurden die Zellen 20 Minuten lang mit eiskaltem Methanol fixiert. Alle weiteren Schritte erfolgten in einer abgedunkelten, feuchten Kammer: Die Zellen wurden mit PBS-BSA-Triton-X 10 Minuten lang geblockt und gleichzeitig mild lysiert, um ein besseres Eindringen des Antikörpers in die Zellen zu erreichen. Die Zellen wurden 1 h mit dem Primärantikörper gegen ZNF580, 1 h mit dem Cy-3-gekoppelten Sekundärantikörper sowie 30 Minuten mit DAPI in einer Verdünnung von 1:10.000 in PBS-BSA inkubiert. Zwischen den Einzelschritten erfolgten jeweils zwei fünfminütige Waschschrte mit PBS-BSA. Zu jeder Färbung erfolgte eine Negativkontrolle ohne Inkubation mit dem Primärantikörper. Die Objektträger wurden mit einem Deckglas versehen und sofort mit einem Zeiss Axioskop 40 Mikroskop mit Zeiss-Objektiven (Neofluar, 16/0,4 Fluoreszenzfilter, Carl Zeiss, Jena, Germany) analysiert. Für die Bildaufnahmen wurde eine Digitalkamera (Kappa, DX4, Kappa, Gleichen, Germany) verwendet. Die Aufnahmen wurden nachträglich mit der frei erhältlichen Software ImageJ farbkodiert.

2.2.3 Proteinextraktion und -quantifizierung

MonoMac6 wurden wie beschrieben pelletiert und mit kaltem PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Für Zellysate wurden die Zellen in Protein-Extraktions-Puffer resuspendiert und 20 Minuten unter gelegentlichem Schütteln auf Eis belassen. Danach wurden die Proben 15 Minuten bei 4° C und 15.000 x g erneut zentrifugiert, um Zellorganellen und größere Membranreste aus der Lösung zu entfernen. Die in den Proben enthaltene Proteinmenge wurde nach der Bradfordmethode bestimmt: 2 µL Probe wurden zu 98 µL MilliQ-Wasser hinzugefügt und mit 1 mL Bradford-Reagenz in einer Küvette 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde photometrisch (1101M, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) bei einer Wellenlänge von 578 nm gemessen. Die Proben wurden zur Verbesserung der Messpräzision in Duplikaten gemessen und der arithmetische Mittelwert berechnet. Zu jeder Messreihe wurde die Extinktion von Proteinstandards (0 µg, 1 µg, 2 µg, 4 µg, 6 µg und 8 µg) bestimmt, mit deren Werten eine Standardkurve erstellt und so der Proteingehalt der Proteinproben berechnet werden konnte.

2.2.4 Immunoblotting

Für die SDS-PAGE wurden 30 µg Protein pro Spur aufgetragen. Die Proteinproben wurden mindestens 1 h bei konstanter Stromstärke von 80 mA in dem Gel aufgetrennt, bis die Bromphenol-Lauffront das untere Ende des Trenngels erreicht hatte. Zu jedem Lauf wurde ein Marker mit definierten Proteinbanden hinzugefügt. Für den Proteintransfer auf eine PVDF-Membran wurde die Tank-Blot-Methode (BioRad, München, Deutschland) verwendet. Der Einsatz bestand in Anoden-Kathoden-Richtung aus einem Schwamm, Whartmann-Papier, Trenngel, auf Trenngelgröße zugeschnittener PVDF-Membran, Whartmann-Papier und Schwamm. Es wurde auf einen luftblasenfreien Aufbau geachtet. Die aufgetrennten Proteinproben wurden 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 240 mA auf die PVDF-Membran übertragen. Während des Transfers stand der Transfertank zur Kühlung in einem Eisbad. Die Membran wurde 1 h bei Raumtemperatur mit Blockierungs-Puffer geblockt und über Nacht bei 4° C mit den Primärantikörpern (Tabelle 2.1) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal für je 5

Minuten bei Raumtemperatur mit PBS-T gewaschen, mit dem Sekundärantikörper (Tabelle 2.1) inkubiert (120 Minuten für ZNF580, 45 Minuten für β -Actin oder VEGF-A) und nicht-gebundener Antikörper mit drei aufeinander folgenden Waschschritten entfernt. Die Membran wurde in einer Dunkelkammer nach Angaben der Hersteller mit dem Western Lightning chemiluminescence kit inkubiert und einem lichtsensiblen Film (Hyperfilm enhanced chemiluminescence) exponiert. Für die densitrometrische Auswertung der Proteinbanden wurde die Software OneD-Scan (Scanalytics, Rockville, MD, USA) verwendet.

2.2.5 Stimulationsexperimente

MonoMac6 wurden mit fMLP 100 nM oder TNF- α 10 ng/mL für 24 h inkubiert. Die verwendeten LPS-Konzentrationen für 24 h waren 0,1 ng/mL, 0,3 ng/mL, 1 ng/mL, 3 ng/mL und 10 ng/mL. Um Zeit-abhängige Effekte nach LPS-Stimulation auf ZNF580 zu untersuchen, wurden die Zellen mit jeweils 10 ng/mL LPS unterschiedlich lange (1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h und 24 h) inkubiert. Bei allen Versuchen wurde die Vehikelbehandlung (PBS bzw. DMSO) als Negativkontrolle benutzt. Nach Behandlung wurden die Zellen pelletiert und jeweils die Hälfte für mRNA- oder Proteinanalyse verwendet. Die Mediumüberstände wurden für IL-6-Quantifizierung aufbewahrt. Alle Experimente wurden in 12-Well-Platten durchgeführt (TPP, Trasadingen, Schweiz).

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Antikörper

Antikörper (AK)	Klon	Firma	Verdünnung	Tier
Anti-ZNF580-AK	ARP39236_P050	Aviva Bio Systems, San Diego, CA, USA	1:500 in Blockierungspuffer (Immunoblotting), 1:100 in PBS-BSA (Immunzytochemie)	Kaninchen
Anti- β -Actin-AK	A-5441	Sigma Aldrich, München, Deutsch- land	1:2000 in Blockierungspuffer	Maus
HRP-markierter Ziege-anti-Kanin- chen-AK	P0448	Dako, Glostrup, Denmark	1:5000 in Blockierungspuffer	Ziege
HRP-markierter Ka- ninchen-anti-Maus- AK	P0260	Dako, Glostrup, Denmark	1:20.000 in Blockierungspuffer	Kaninchen
Cy3-markierter Ziege-anti-Kanin- chen-AK	TM 111-165-045	Jackson Immunore- search Laborato- ries, West Grove, PA, USA	1:1000 in PBS-BSA	Ziege

2.2.6 RNA-Isolation und Reverse Transkription

Die Gesamt-RNA wurde mit dem Rneasy Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Anweisung des Herstellers extrahiert. Dabei wurden die Zellen mit RLT-Puffer plus β -Mercaptoethanol lysiert und die RNA in mehreren Waschschritten mit unterschiedlichen Puffern und anschließender Zentrifugation isoliert. Um die Verunreinigung mit genomischer DNA zu minimieren, wurde noch eine DNase-Behandlung nach Angaben des Herstellers eingefügt. Die RNA-Menge wurde mit dem Photometer GeneQuant (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2 μ g RNA wurden in komplementäre DNA (cDNA) mit dem reverse transcriptase kit (M1701, Promega, Madison, WI, USA) umgeschrieben. Dazu wurde die RNA mit oligo-

dT-Primern (Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 8 Minuten bei 70° C denaturiert, anschließend mit dem RT-Mix für 1 h bei 42° C transkribiert und schließlich für 10 Minuten bei 70° C zur Inaktivierung der reversen Transkriptase inkubiert. Die cDNA wurde bis zur weiteren Analyse bei -20° C gelagert.

2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur spezifischen Amplifikation von definierten DNA-Sequenzen. Die spezifischen äußeren und inneren Primer für ZNF580, GAPDH, IL-1, IL-6 und IL-8 wurden mit dem primer design tool des National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) designt und bei Eurofins, Hamburg, Deutschland gekauft. Die Sequenzen, Produktgrößen in Basenpaaren (bp) und Annealing-Temperaturen sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Der verwendete Thermocycler für die real-time PCR war eine Rotorgene 2000-Maschine (Corbett Life Science, Mortlake, NSW, Australia). Das PCR-Programm für jeden Ansatz bestand aus einer Aktivierungsphase (95°C, 900 s), 45 Zyklen und der Erstellung einer Schmelzkurve. Ein Zyklus wiederum bestand aus einer Denaturierungsphase (95°C, 15 s), in der der DNA-Doppelstrang aufgebrochen wird, einer Annealing-Phase (Temperatur Primer-abhängig, 30 s), in der die spezifischen Primer an die DNA binden können, und einer Elongationsphase (72°C, 15 s), in der die DNA amplifiziert wird. Zum Nachweis einer basalen Expression der oben genannten Gene wurde die cDNA mit den jeweiligen äußeren Primern inkubiert und wie oben beschrieben amplifiziert. Zur Auswertung von im Verlauf des Projekts durchgeführten quantitativen real-time PCRs (q-rt-PCR) wurde für jedes Gen eine Standardkurve mit PCR-generierten Standards erstellt. Dazu wurde der Gehalt an doppelsträngiger DNA in den Proben, die mit den äußeren Primern amplifiziert worden waren, photometrisch bestimmt und die Kopienanzahl der PCR-Produkte unter der Annahme einer durchschnittlichen Nukleotidmasse in doppelsträngiger DNA von 660 Dalton (Da) mit der Formel berechnet:

$$\text{DNA Kopienzahl} = \frac{\text{PCR Produktmenge [ng]} * \frac{6,023 * 10^{23}}{\text{mol}}}{\text{PCR Produktlänge [bp]} * 10^9 * 660 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}$$

Die PCR-Reaktionsansätze wurden auf eine Kopienanzahl von 10^{10} Kopien/ μl verdünnt und anschließend daraus eine Verdünnungsreihe (1:10) bis einschließlich 10^2 Kopien/ μl erstellt. Mit jeweils 1 μl eines jeden Verdünnungsschrittes als template (entspricht 10^x Kopien/Ansatz) wurde eine weitere PCR unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, bei der die inneren Primer (siehe Tabelle 2.2) verwendet wurden. Aus der Standardreihe (CT-Wert als Funktion der template-Konzentration) konnte eine Formel zur Berechnung beliebiger template-Konzentrationen in einer Probe, die unter gleichen Bedingungen wie die Standards amplifiziert wurde, abgeleitet werden.

Die q-rt-PCR wurde mit den inneren Primern unter oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Am Ende jeder Elongationsphase wurde die Fluoreszenzintensität des im Reaktionsansatz enthaltenen SYBR-Greens gemessen. SYBR-Green ist ein Farbstoff, der bei Einlagerung in einen DNA-Doppelstrang ein Fluoreszenzsignal aussendet: Je mehr doppelsträngige DNA in der Probe vorhanden ist, desto stärker ist das Signal. Die Qualität der Amplifikate in den einzelnen Proben wurde am Ende der PCR mit einer Schmelzkurve überprüft. Dabei wurde die Temperatur schrittweise bis auf 90°C erhöht und der Verlust des SYBR-Green-Fluoreszenzsignals bei Auseinanderweichen der DNA-Doppelstränge detektiert. Jeweils nur ein Schmelzbereich (nur ein Peak in der ersten Ableitung der Schmelzkurve) zeigt die Amplifikation eines einzigen PCR-Produkts und dessen Reinheit. Dabei müssen Reaktionsansätze mit denselben Primern dieselben Schmelztemperaturen ihrer Amplifikationsprodukte aufweisen. Abweichende Schmelzkurven können auf eine Kontamination, z.B. mit genomischer DNA, oder unzureichende Spezifität der PCR hinweisen.

Die ZNF580-, IL-1-, IL-6- und IL-8-Expression wurden auf die jeweilige GAPDH-Expression normalisiert. Für alle real-time-PCR-Analysen wurden entsprechende non-template und non-RT-Kontrollen sowie ein Standard bekannter template-Konzentration als Positivkontrolle durchgeführt.

Tabelle 2.2: Primersequenzen, Produktgrößen und Annealing-Temperaturen

Gen	vorwärts gerichteter Primer	Reverser Primer	Produktgröße	Annealing-Temperatur
ZNF580 äußere Primer	5' CCC TCC ACT CCT TCC T 3'	5' ACG TGA AGG GCT TGA GGT C 3'	262 Basenpaare (bp)	60°C
ZNF580 innere Primer	5' CGC CAC CTC CTC ATC GAC GC 3'	5' TCC GGG CAG CTG TAG CCC TT 3'	134 bp	60°C
GAPDH äußere Primer	5' TGG TGG ACC TGA CCT GCC GTC 3'	5' AGG GGT CTA CAT GGC AAC TG 3'	415 bp	60°C
GAPDH innere Primer	5' TCA AGA AGG TGG TGA AGC AG 3'	5' CCC TGT TGC TGT AGC CAA AT 3'	198 bp	60°C
IL-6 äußere Primer	5'TGC AAT AAC CAC CCC TGA CC 3'	5' GTG CCC ATG CTA CAT TTG CC 3'	163 bp	58°C
IL-6 innere Primer	5' TGC CAG CCT GCT GAC GAA G 3'	5' AGC TGC GCA GAA TGA GAT GAG 3'	77 bp	58°C
IL-1 äußere Primer	5' ACC AA CCT CCT CGA GGC AC 3'	5' TAC GTG CAC ATA AGC CTC GT 3'	434 bp	58° C
IL-1 innere Primer	5' CCA GCT ACG AAT CTC CGA CC 3'	5' CAT GGC CAC AAC AAC TGA CG 3'	70 bp	58° C
IL-8 äußere Primer	5' GTA GGG TTG CCA GAT GCA AT 3'	5' GCT TCC ACA TGT CCT CAC AA 3'	497 bp	58° C
IL-8 innere Primer	5' TAG CAA AAT TGA GGC CAA GG 3'	5' TCC TGG CTA GCA GAC TAG GG 3'	194 bp	58° C

2.2.8 RNA-Interferenz (RNAi) mittels siRNA-Transfektion von MonoMac6

Für die Transfektion von small interfering RNA (siRNA) wurden spezifische siRNAs gegen ZNF580 (Thermo Fisher Scientific/Ambion, Waltham, MA, USA), unspezifische (= scrambled) siRNA (Thermo Fisher Scientific/Ambion, Waltham, MA, USA) als Negativkontrolle und Cy3-markierte siRNA gegen GAPDH (Thermo Fisher Scientific/Ambion, Waltham, MA, USA) als Kontrolle für den Transfektionserfolg verwendet. Für den Knockdown von ZNF580 wurden die Zellen mit der zuvor ermittelten optimalen siRNA-Konzentration 50 nM bis 70 nM transfiziert. Als Transfektionsmedium wurde Lipofectamin 2000 (Thermo Fisher Scientific/Invitrogen, Waltham, MA, USA) nach Herstellerangaben benutzt. Der Knockdown von ZNF580 und der Effekt auf IL-6 bei unstimulierten Zellen wurde nach 24 h mittels q-rt-PCR analysiert. Um den Einfluss von ZNF580 auf die LPS-induzierte IL-6-Produktion zu bestimmen, wurden MonoMac6 zunächst 4 h mit ZNF580-spezifischer oder unspezifischer siRNA 70 nM transfiziert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, in RPMI-1640-Medium mit Zusätzen resuspendiert und für 1 h bis 4 h mit LPS 10 ng/mL bzw. PBS als Negativkontrolle stimuliert.

2.2.9 IL-6-Proteinmessung im Überstand und Berechnung der IL-6-Produktionsrate

Sezerniertes IL-6 wurde im Zellkulturmedium-Überstand mit dem Quantikine Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit for human IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Es handelt sich um einen Sandwich-Elisa, bei dem eine Mikroplatte mitgeliefert wird, die bereits mit einem Antikörper gegen humanes IL-6 beschichtet ist. Die Probe wird aufgetragen, ungebundene Substanz in einem Waschschrift entfernt und ein Sekundärantikörper hinzugegeben, der ebenfalls an humanes IL-6 bindet. Ungebundener Sekundär-AK wird mit einem Waschschrift entfernt und eine Färbelösung hinzugegeben, deren Intensität abhängig von der gebundenen IL-6-Menge der Probe ist. Die Farbintensität wurde photometrisch bestimmt. Aus den Messwerten von mitgelieferten IL-6-Standards wurde eine Standardkurve erstellt, anhand derer die IL-6-Konzentration in den Proben berechnet werden konnte. Jede Probe wurde dreifach gemessen, um die Präzision zu erhöhen.

Aus diesen Werten wurde auch die IL-6-Produktionsrate nach folgender Formel berechnet:

$$\text{IL-6-Produktionsrate} = \frac{\text{IL6}_{T_2} - \text{IL6}_{T_1}}{T_2 - T_1}$$

T_1 und T_2 waren zwei aneinander grenzende Zeitpunkte in der Messreihe, wobei T_2 zeitlich hinter T_1 lag. Das Ergebnis wurde auf der Abszisse bei T_2 aufgetragen.

2.2.10 Statistische Analyse

Zu jedem Experiment wurden mindestens drei unabhängige Wiederholungen durchgeführt. Aus den Daten wurden, soweit nicht anders angegeben, die arithmetischen Mittelwerte sowie der Standardfehler als Streuungsmaß berechnet. Für die Erstellung der Graphen wurde das Programm Sigma Plot 13 verwendet. Für die Berechnung der statistischen Analysen wurde entweder Sigma Plot 13 oder Microsoft Excel 2011 verwendet: Zum Vergleich Kontrolle vs. Intervention wurde bei zwei Testpartnern der gepaarte t-Test und bei mehr als zwei Testpartnern die einfaktorielle Varianzanalyse (one way ANOVA) verwendet. In Fällen, in denen keine Normalverteilung nach Shapiro-Wilk vorlag, wurde bei zwei Testpartnern der Mann-Whitney-Test verwendet, bei mehr als zwei Testpartnern der Kruskal-Wallis-Test. Als Post-Hoc-Test bei der Varianzanalyse wurde das Holmes-Sidak-Verfahren verwendet, im Falle einer vorherigen Kruskal-Wallis-Testung der Tukey-Test. Um die Güte der Ausgleichsgerade zu bestimmen, wurde das Bestimmtheitsmaß r^2 berechnet. Die Ausgleichsgerade mit dem höchsten Bestimmtheitsmaß wurde als passend angesehen und im Folgenden weiter verwendet. Für die Analyse der linearen Korrelation wurde der Pearson'sche Korrelationskoeffizient r und die Irrtumswahrscheinlichkeit aus Korrelationskoeffizient und Stichprobengröße berechnet. Bei allen verwendeten statistischen Analysen wurden Unterschiede mit Irrtumswahrscheinlichkeiten von $p \leq 0,05$ als signifikant interpretiert.

3 Ergebnisse

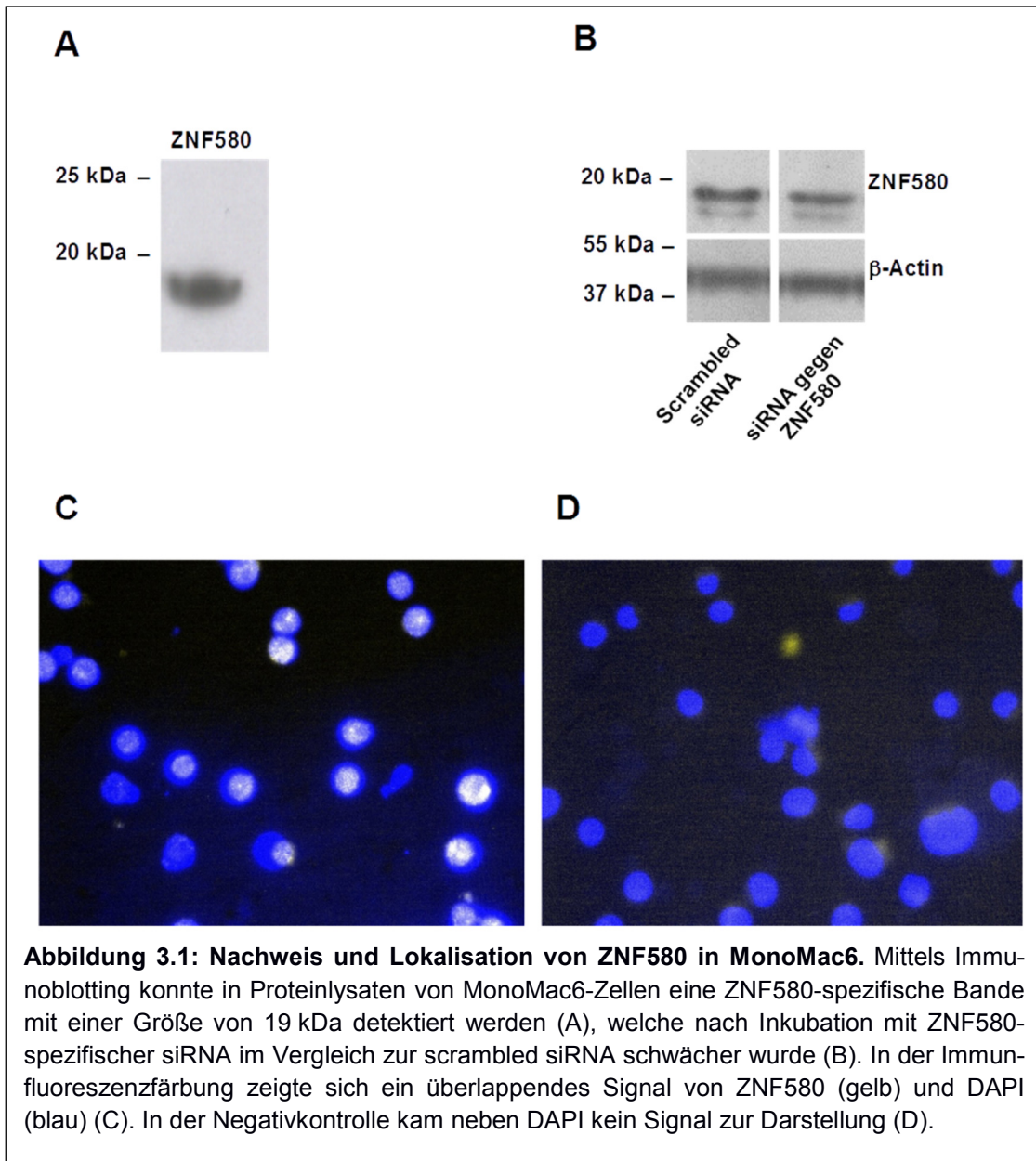
3.1 Nachweis und Lokalisation von ZNF580 in MonoMac6

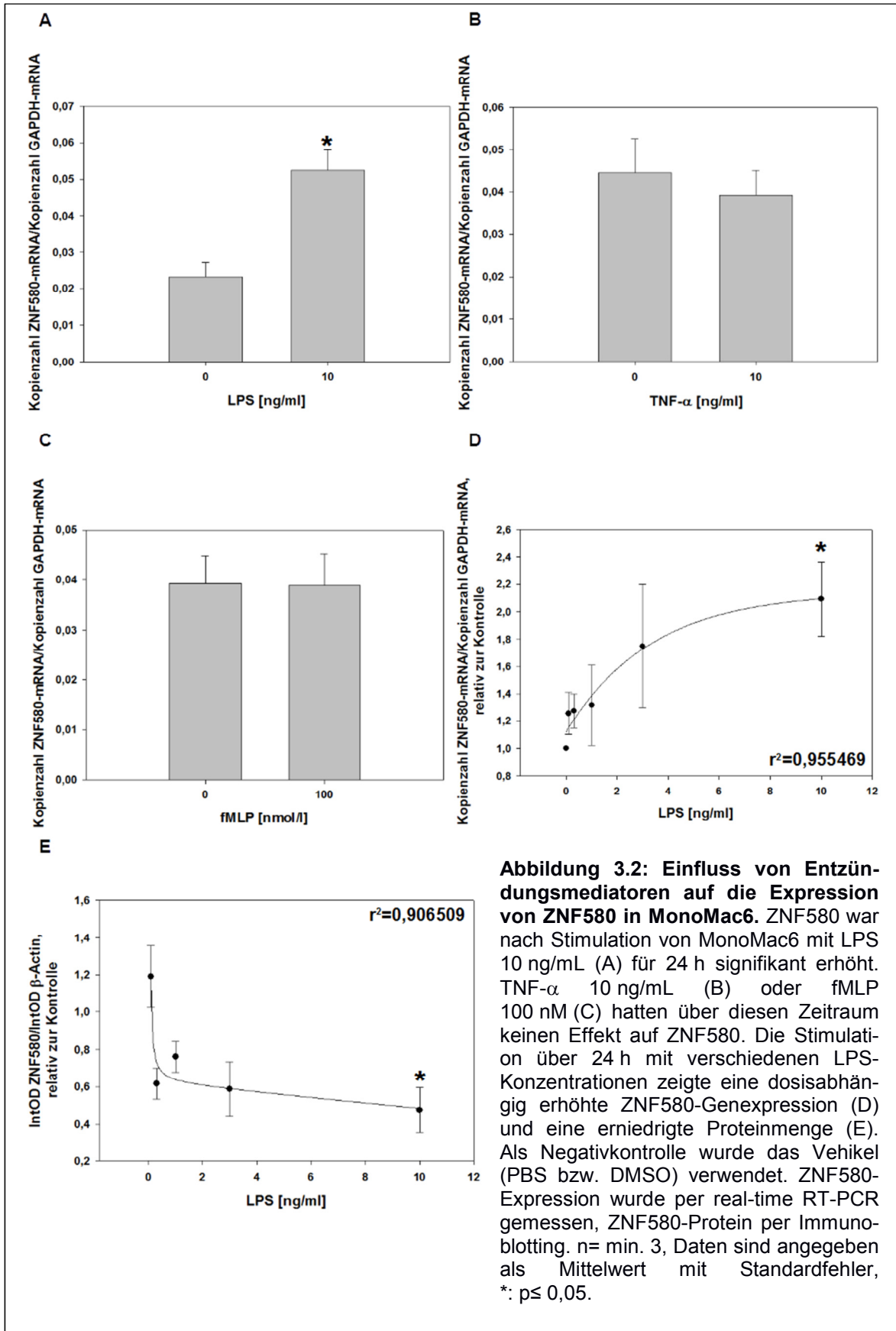
Beim Immunoblotting mit dem anti-ZNF580-AK konnte eine spezifische Bande mit einer Größe von 19 kDa detektiert werden (Abbildung 3.1 A). Diese Bande war nach Behandlung der Zellen mit ZNF580-spezifischer siRNA im Vergleich zu fragmentierter siRNA („scrambled siRNA“) vermindert, wenn auch nicht komplett verschwunden (Abbildung 3.1 B), weshalb sie im Folgenden als ZNF580-spezifisch erachtet wurde. In der Fluoreszenzfärbung zeigte sich ein überlappendes ZNF580-Signal (gelb) mit der DAPI-Färbung (blau) (Abbildung 3.1 C). Die Negativkontrolle ohne den anti-ZNF580-AK zeigte keine Färbung der Zellen (Abbildung 3.1 D).

3.2 LPS-Dosis-abhängige Regulation von ZNF580

MonoMac6 wurden über 24 h mit LPS 10 ng/mL, TNF- α 10 ng/mL oder fMLP 100 nM stimuliert. Dabei zeigte sich eine signifikante Erhöhung der ZNF580-mRNA nach LPS-Stimulation ($p=0,037$) (Abbildung 3.2 A), während TNF- α ($p=0,681$) oder fMLP ($p=0,917$) unter diesen Bedingungen keinen Effekt hatten (Abbildung 3.2 B und C).

Nach Inkubation mit verschiedenen LPS-Konzentrationen für 24 h war die ZNF580-mRNA Dosis-abhängig mit einem signifikanten Maximum bei LPS 10 ng/mL erhöht ($p=0,028$) (Abbildung 3.2 D), während sich überraschenderweise ein Dosis-abhängiger Abfall des ZNF580-Proteins bei LPS-Konzentrationen über 0,1 ng/mL mit einem signifikanten Minimum bei LPS 10 ng/mL zeigte ($p=0,006$) (Abbildung 3.2 E).



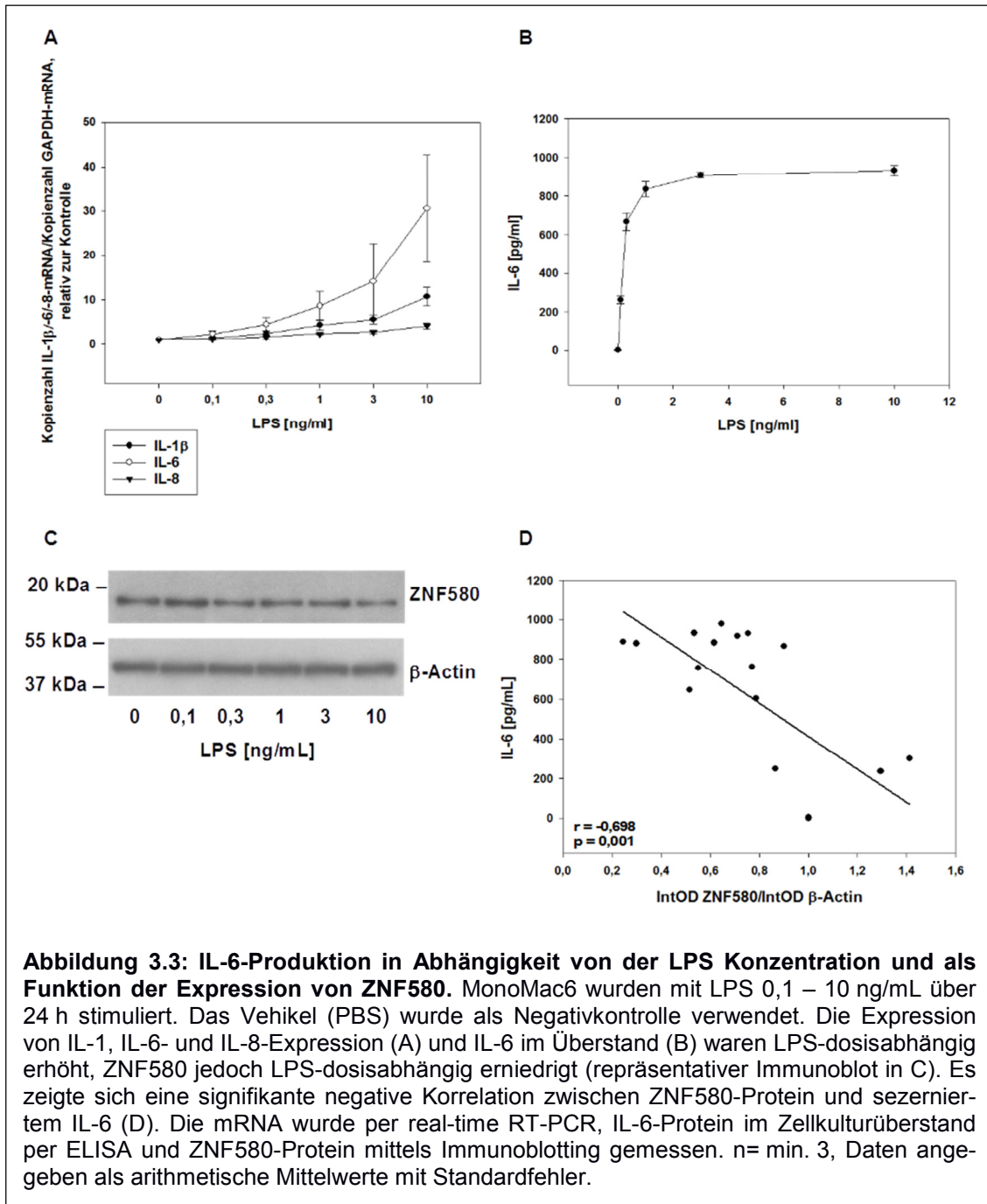


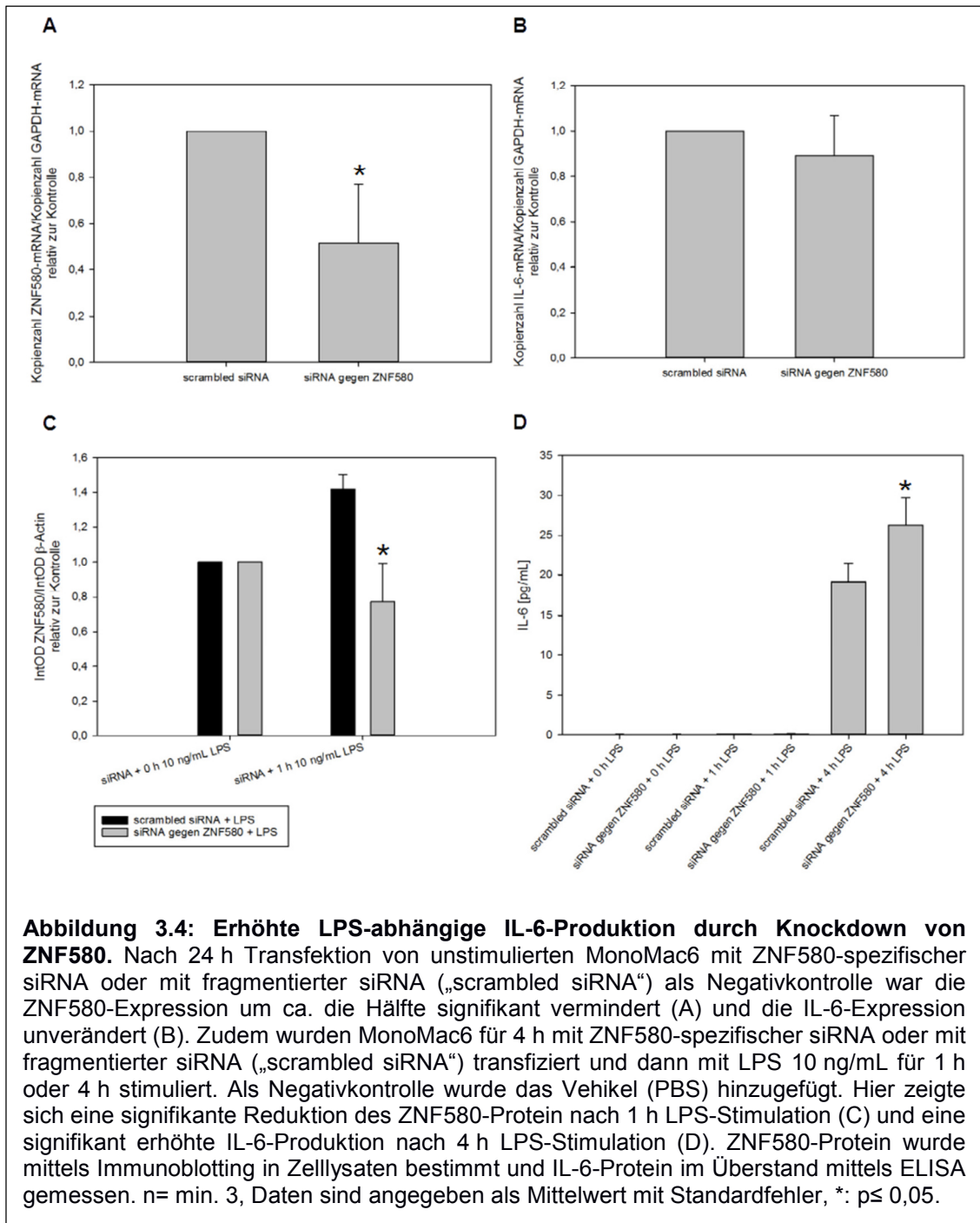
3.3 Negative Korrelation zwischen ZNF580 und IL-6 nach LPS-Stimulation

Die Genexpression von IL-1, IL-6 und IL-8 bzw. sezerniertes IL-6 im Überstand wurde in den LPS-behandelten Proben gemessen. Dabei zeigte sich LPS-Dosis-abhängig die mRNA von IL-1, IL-6 und IL-8 (Abbildung 3.3 A) und auch IL-6-Protein (Abbildung 3.3 B) im Überstand erhöht. Unter diesen experimentellen Bedingungen konnte für die Dosisabhängigkeit von LPS eine negative Korrelation von ZNF580-Protein (repräsentativer Immunoblot in Abbildung 3.3 C) und IL-6 im Überstand gezeigt werden (Abbildung 3.3 D). Der berechnete Pearson'sche Korrelationskoeffizient dieser angenommenen Ausgleichsgeraden betrug $r = -0,698$ ($p = 0,001$).

3.4 Erhöhte LPS-abhängige IL-6-Produktion nach Knockdown von ZNF580

Nach Transfektion von MonoMac6 mit ZNF580-spezifischer siRNA war die ZNF580-mRNA nach 24 h signifikant um knapp die Hälfte im Vergleich zur Negativkontrolle mit fragmentierter siRNA („scrambled siRNA“) vermindert ($p \leq 0,001$) (Abbildung 3.4 A). Dies führte jedoch in unstimulierten Zellen nicht zu einer Veränderung der basalen Expression von IL-6-mRNA (Abbildung 3.4 B). Nach Transfektion mit ZNF580-spezifischer siRNA und Stimulation mit LPS 10 ng/mL für 1 h war das ZNF580-Protein signifikant vermindert im Vergleich zur Negativkontrolle ($p = 0,04$) (Abbildung 3.4 C). Zu diesem Zeitpunkt konnte im Überstand noch kein IL-6-Protein gemessen werden, jedoch war nach 4 h LPS-Stimulation IL-6 signifikant erhöht im Vergleich zur Negativkontrolle ($p \leq 0,01$) (Abbildung 3.4 D).





3.5 Zeitgang der ZNF580-abhängigen IL-6-Produktion nach LPS-Stimulation

Um den Zeitverlauf der LPS-induzierten Effekte auf ZNF580 genauer zu charakterisieren, wurden MonoMac6 mit LPS 10 ng/mL für 0 h bis 24 h stimuliert. Dabei zeigte sich ein Anstieg der mRNA mit einem Maximum nach 2 h, gefolgt von einem anhaltenden Abfall mit einem Minimum nach 8 h und einem zweiten Anstieg mit Erreichen des Ausgangsniveaus nach ungefähr 16 h sowie Überschreiten desselben nach 24 h (Abbildung 3.6 A). Das Protein war in der Zeit von 1 h bis 4 h nach LPS-Zugabe erhöht, um dann steil abzufallen mit einem signifikanten Minimum nach 16 h ($p=0,012$) (Abbildung 3.6B). Die Ausgangswerte wurden nach 24 h noch nicht wieder erreicht.

IL-6-mRNA (Abbildung 3.5 C) und sezerniertes Protein im Überstand (Abbildung 3.5 D) stiegen nach LPS-Stimulation im Zeitverlauf bis 4 h steil an. Die IL-6-mRNA fiel danach im Zeitraum bis 24 h wieder ab, ohne Ausgangswerte zu erreichen. IL-6-Protein stieg im Zeitraum nach 4 h weiterhin an und erreichte das Maximum nach 16 h.

Der Verlauf der IL-6-Produktionsrate war zweiphasig (Abbildung 3.6 E): In der ersten Phase von 1 h bis 4 h zeigte sich ein steiler Anstieg der Produktionsrate. In der zweiten Phase fiel diese in der Zeit von 4 h bis 8 h ebenso steil wieder ab, blieb jedoch in geringerem Maße konstant erhöht in der Zeit von 8 h bis 16 h, um nach 24 h wieder auf 0 abzusinken.

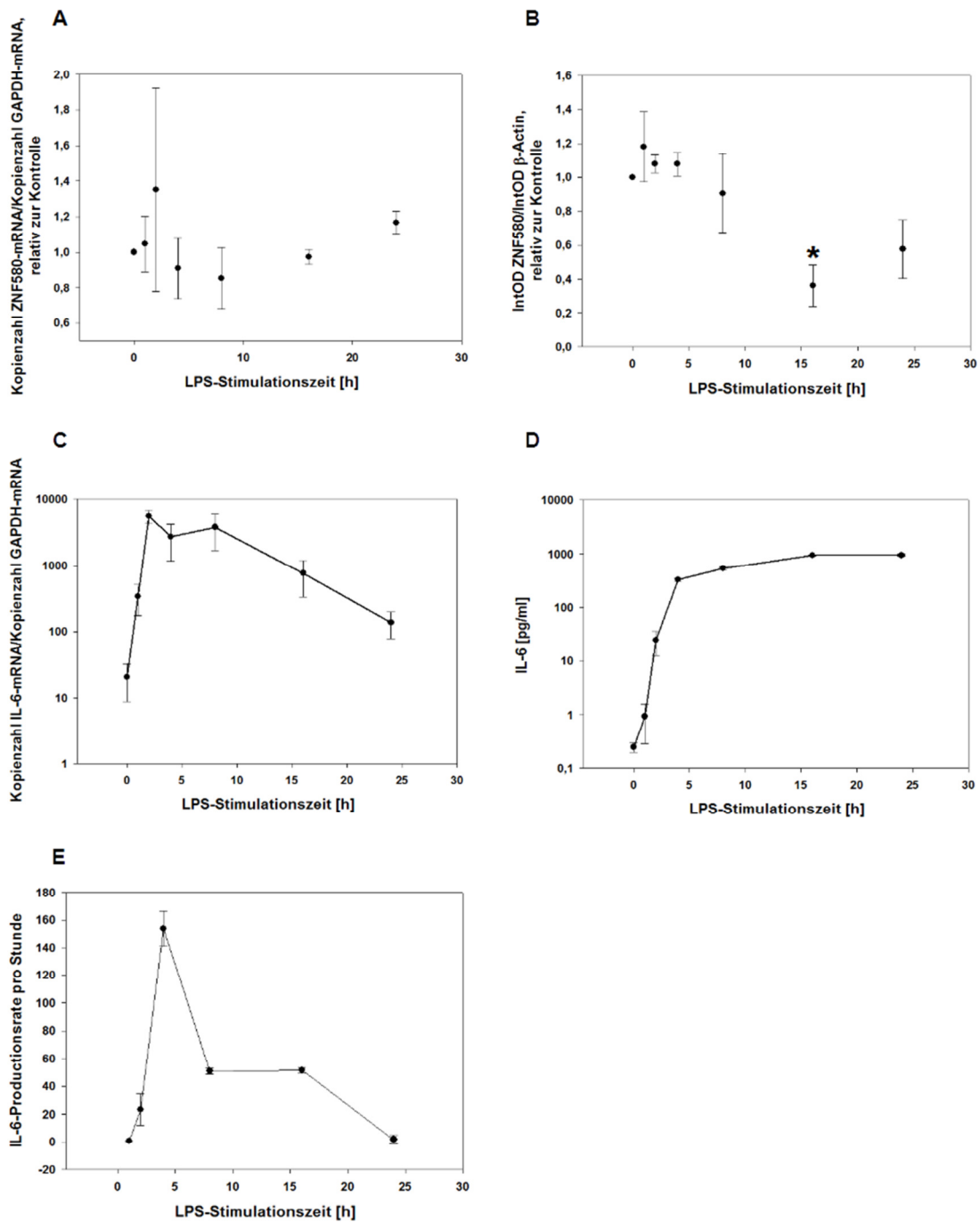


Abbildung 3.5: Anhaltende IL-6-Produktion nach verzögertem Abfall von ZNF580 nach LPS-Stimulation. Nach Stimulation von MonoMac6 mit LPS 10 ng/ml für 1 h bis 24 h waren die ZNF580-Expression (A) und ZNF580-Protein (B) initial zunächst hochreguliert, um im zeitlichen Verlauf unter Ausgangswerte abzufallen. Die LPS-abhängige IL-6-Expression (C) und -produktion (D) waren zeitabhängig erhöht. Die IL-6-Produktionsrate zeigte mit einer stark erhöhten IL-6-Produktion von 1 h bis 4 h und einer in geringerem Umfang erhaltenen Produktion von 8 h bis 16 h einen biphasischen Verlauf (E). ZNF580- und IL-6-Expression wurden per real-time RT-PCR gemessen, ZNF580-Protein per Immunoblotting und IL-6-Protein aus den Zellkulturüberständen per ELISA. Die IL-6-Produktionsrate wurde berechnet aus den zum Zeitpunkt T im korrespondierenden Zellkultur-Überstand gemessenen IL-6-Proteinwerten nach der Formel $(IL-6_{T2} - IL-6_{T1}) / (T2 - T1)$, wobei $T1 < T2$ ist. $n = \text{min}.3$, die Daten sind angegeben als Mittelwerte mit Standardfehler, *: $p \leq 0,05$.

4 Diskussion

4.1 Monozytenmodell

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob der putative Transkriptionsfaktor ZNF580 eine regulatorische Funktion bei Entzündungsreaktionen haben könnte. Dazu wurde die IL-6-Produktion von Monozyten untersucht. Als Modell für Monozyten diente die etablierte Zelllinie MonoMac6 (26). LPS-stimulierte MonoMac6 waren vital und zeigten nach LPS-Stimulation die vorbeschriebene Aggregation (52). Die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und IL-8 wurde dosisabhängig durch LPS induziert. Bei einer LPS-Konzentration von 0,1 ng/mL war die IL-6-Sekretion bereits drastisch erhöht und der Maximaleffekt wurde mit 3 ng/mL erreicht. Der Anstieg der für IL-6 kodierenden mRNA erfolgte innerhalb von 2 h, die höchste Produktions- bzw. Sekretionsrate wurde 4 h nach LPS-Stimulation erreicht. Dieses rapide Ansprechen auch auf kleinste LPS-Konzentrationen bestätigte, dass MonoMac6 ein gutes Monozytenmodell sind und mit LPS in spezifischer Weise reagieren.

4.2 ZNF580 in MonoMac6

Während die Expression von ZNF580 in Endothelzellen gut dokumentiert ist (7,8,10,11,13–19,22,23), war über das Vorkommen und die Funktion in Monozyten bislang nichts bekannt. In dieser Untersuchung konnte ZNF580 in der monozytischen Zelllinie MonoMac6 sowohl als Gentranskript (mRNA) mittels spezifischer real-time RT-PCR als auch als Protein mittels Immunoblotting nachgewiesen werden. In letzterem kam eine spezifische Proteinbande für ZNF580 mit der erwarteten Größe von 19 kDa zur Darstellung. Die Bande war in unstimulierten Zellen meistens so prominent wie die der β -Actin-Ladekontrolle, so dass nicht aktivierte MonoMac6 insgesamt recht viel ZNF580 enthalten. Darüber hinaus war ZNF580 fluoreszenzmikroskopisch in MonoMac6 nachweisbar. Die Expression von ZNF580 in MonoMac6 kann daher, mit drei Methoden bestätigt, als gesichert angesehen werden.

Durch das Übereinanderlegen von Fluoreszenzsignalen von ZNF580 und DAPI konnte ZNF580 in MonoMac6 genauso wie in Endothelzellen im Nukleus lokalisiert werden (22,23). Diese Lokalisation unterstützt die angenommene Funktion als DNA-bindender Transkriptionsfaktor in MonoMac6. In den meisten Zellen nahm das ZNF580-Signal jedoch nur einen Teil des DAPI-Signals ein und war relativ inhomogen, so dass ZNF580 nicht im gesamten Kern gleichmäßig verteilt zu sein scheint, sondern nur in bestimmten Bereichen vorkommt. Diese könnten den Lokalisationen von Chromosomen entsprechen, auf denen Zielgene von ZNF580 vorkommen. In dieser Studie konnte IL-6 als ein solches identifiziert werden, dennoch ist anzunehmen, dass ZNF580 Einfluss auf weitere Gene und deren Transkription hat, so dass die verstreute Verteilung gut zu erklären ist. Ergänzend könnten weitere, bislang noch nicht bekannte Funktionen einen umschriebenen Aufenthaltsort im Nukleus bedingen bzw. voraussetzen.

4.3 Wirkung von LPS auf ZNF580

Nach Inkubation mit verschiedenen LPS-Konzentrationen für 24 h waren ZNF580-mRNA und -Protein dosisabhängig reguliert. Dies spricht für einen LPS-spezifischen Effekt. Überraschenderweise zeigte sich eine Diskrepanz zwischen mRNA- und Proteinebene nach 24 h: Während durch LPS die mRNA-Konzentration dosisabhängig anstieg, war das Protein erniedrigt. Es könnte also einen „negative feedback“-Mechanismus geben, bei dem das ZNF580-Protein die Transkription von ZNF580 hemmt. Diese Hemmung entfällt nach LPS-Exposition durch die Absenkung der Proteinkonzentration von ZNF580. So könnten in MonoMac6 nach einer Entzündungsantwort und Produktion proinflammatorischer Zytokine wieder die basalen, relativ hohen ZNF580-Spiegel eingestellt werden.

Nach Inkubation mit den anderen untersuchten Entzündungsmediatoren, TNF- α und fMLP, war die Konzentration von ZNF580-mRNA nach 24 h nahezu unverändert. Dazu passend ist eine andere Studie zu dem Ergebnis gekommen, dass TNF- α keinen Effekt auf die ZNF580-Expression hat (22). Andererseits ist bekannt, dass ZNF580 nach Translokation von NF κ B in den Nukleus aktiv wird (23), deshalb müssten TNF- α und fMLP ebenfalls einen Effekt auf ZNF580 haben, da nach Stimulation mit diesen beiden

Mediatoren NF κ B aktiviert wird. Wahrscheinlich können diese Effekte zu anderen Zeitpunkten als den in dieser Studie untersuchten (24 h) beobachtet werden.

4.4 ZNF580-Knockdown führt zu einer erhöhten, LPS-induzierten IL-6-Produktion

In unstimulierten Zellen konnte nach Inkubation mit spezifischer siRNA gegen ZNF580 nach 24 h eine Reduktion der mRNA um etwa die Hälfte erreicht werden. Das basale Expressionsniveau von IL-6 blieb jedoch unverändert. Diese Befunde sprechen dagegen, dass ZNF580 die Transkription von IL-6 induzieren würde. Denn in diesem Fall hätte der Knockdown von ZNF580 zu einer Absenkung der basalen IL-6 Expression führen müssen.

Nach Knockdown von ZNF580 und anschließender kurzzeitiger LPS-Stimulation (1 h bis 4 h) war die IL-6-Produktion erhöht. Dadurch ist gezeigt, dass ZNF580, direkt oder indirekt, an der Suppression von IL-6 beteiligt ist. Die Absenkung der Proteinkonzentration von ZNF580 nach LPS-Stimulation entspräche daher einer Disinhibition der IL-6-Produktion. Mit dieser Interpretation in Einklang steht die bereits zuvor gefundene negative Korrelation zwischen sezerniertem IL-6 und der zellulären Konzentration von ZNF580.

4.5 ZNF580 im Zeitverlauf nach LPS-Stimulation

Im Zeitverlauf zeigte sich bei Stimulation durch LPS nach 1 h bis 8 h eine schwach ausgeprägte Induktion der ZNF580-Genexpression mit leicht erhöhter Proteinkonzentration. In diesem frühen Zeitraum der Stimulation der Monozyten mit LPS spielt ZNF580 folglich für die Disinhibition von IL-6 keine Rolle. Diese frühe Phase wird vielmehr durch die Aktivierung von NF κ B dominiert, denn es ist nachgewiesen, dass LPS über die Aktivierung von NF κ B in Monozyten wirkt (39). Bei Stimulation von Monozyten durch LPS konnte eine maximale NF κ B-Konzentration im Nukleus nach 2 h gezeigt werden (53,54). Ein Zusammenhang mit ZNF580 ist bisher nur in der endothelialen Zelllinie EA.hy926 gezeigt worden. In diesen Zellen transloziert NF κ B nach Stimulation mit H₂O₂ in den Nukleus, wo es eine signifikante Hochregulation von ZNF580 bewirkt (23). Ähnliche

Mechanismen in MonoMac6 vorausgesetzt, sind diese Zusammenhänge ein geeignetes Modell, um die leicht erhöhte ZNF580-Konzentration nach 1-8 h LPS-Stimulation zu erklären.

Der stärkste und sicherlich biologisch entscheidende Effekt von LPS auf die zeitabhängige Veränderung der Expression von ZNF580 in MonoMac6 war die Abnahme der mRNA-Konzentration nach 8 h, gefolgt von der des Proteins nach 16 h. Die mRNA stieg in der Zeit von 8 h bis 16 h wieder auf Ausgangsniveau und im Zeitraum von 16 h bis 24 h sogar darüber hinaus an, wodurch die erhöhte Genexpression nach dosisabhängiger LPS-Stimulation über 24 h bestätigt wurde. Auch die dort beobachtete Rückwärts-hemmung der Transkription durch das Protein ließ sich im Zeitverlauf nachvollziehen: Durch die sinkenden Proteinspiegel ab 8 h LPS-Stimulation mit dem Minimum nach 16 h fiel der hemmende Einfluss auf die Gentranskription weg, die mRNA-Spiegel stiegen wieder an und überschritten nach 24 h sogar die Ausgangswerte. Die Proteinspiegel haben zu dieser Zeit jedoch noch nicht wieder das basale Level erreicht und sind noch erniedrigt. Wahrscheinlich können zu späteren Zeitpunkten wieder normalisierte ZNF580-Proteinspiegel gemessen werden.

Die hier erstmals beschriebene Suppression von ZNF580 durch den Entzündungsstimulus LPS könnte grundsätzlich vergleichbar sein mit der Suppression von ZNF580 in Endothelzellen durch oxLDL (22). In Endothelzellen fehlt allerdings ein genauerer Zeitgang für die oxLDL-abhängige Suppression von ZNF580, sie ist lediglich für eine Inkubationsdauer von 24 h beschrieben.

Während der ersten acht Stunden nach Beginn der Stimulation von MonoMac6 mit LPS bleiben die ZNF580-Konzentrationen nahezu unverändert, daher spielt eine Disinhibition der IL-6 Expression durch eine verminderte ZNF580 Konzentration in diesem Zeitraum keine Rolle. Um einen Zeitraum um 16 h herum, wenn die initialen Effekte der Aktivierung von NF κ B bereits vorüber sind, könnte die Aufhebung der ZNF580-abhängigen Suppression von IL-6 zur Aufrechterhaltung der IL-6 Sekretion beitragen.

4.6 ZNF580 als Entzündungsmodulator durch IL-6-supprimierende Wirkung

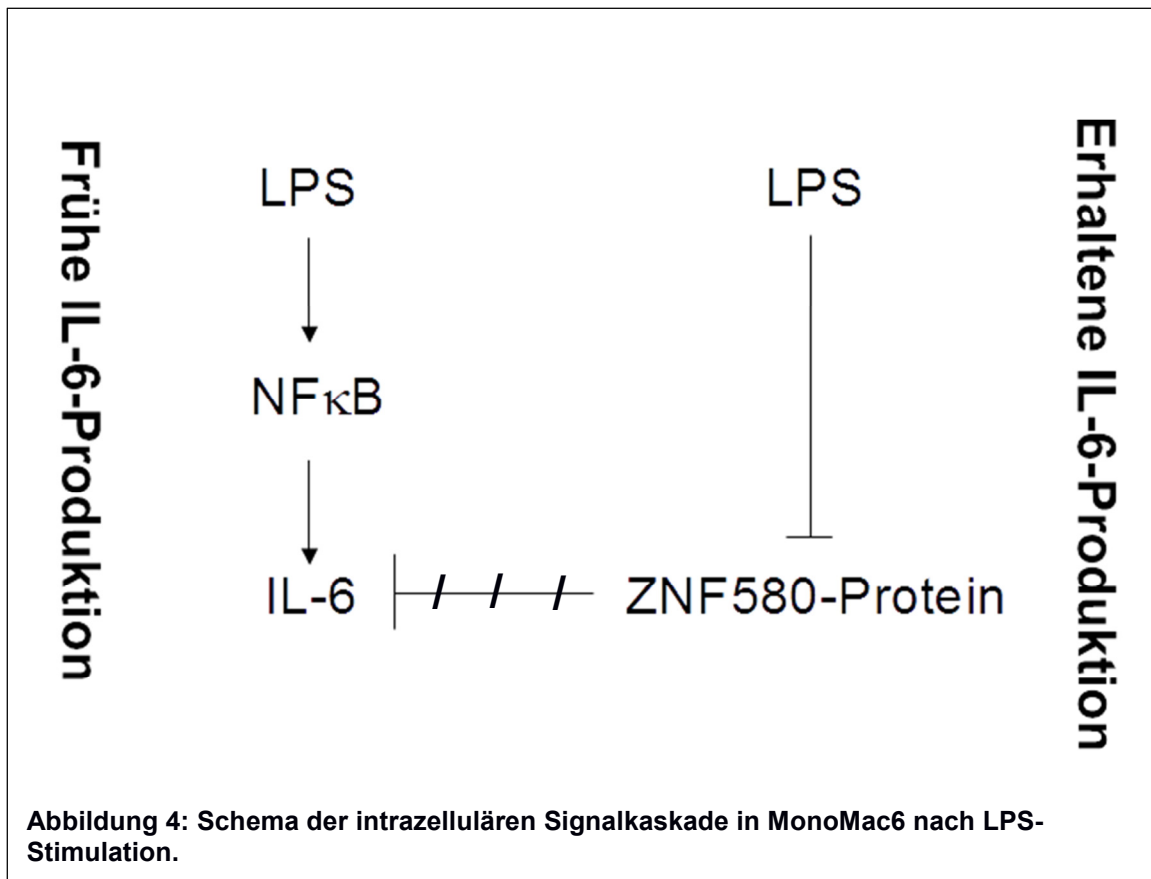
Die in dieser Studie erhobenen Daten lassen den Schluss zu, dass ZNF580 einen hemmenden Einfluss auf die IL-6-Produktion nach LPS-Stimulation hat. Neben der negativen Korrelation zwischen IL-6 und ZNF580 nach LPS-Stimulation wurde diese Annahme durch ZNF580-Knockdown verifiziert, der zu erhöhter IL-6-Sekretion nach LPS-Stimulation führte. C2H2-Zinkfingerproteine, zu denen auch ZNF580 gehört, wirken überwiegend als Suppressoren der Gentranskription (4) und speziell für ZNF580 ist eine solche Wirkung bereits bei der Suppression von IL-8 beschrieben worden (22). Dem scheinen die hier vorgelegten Daten zu entsprechen. Dagegen stehen Befunde, die eine Induktion von IL-8 durch ZNF580 zeigen (23). Jedoch ist in keiner dieser Studien die Interaktion von ZNF580 mit DNA und die Funktion dieser Interaktion direkt gezeigt worden.

Das Konzept einer Suppression von IL-6 durch ZNF580 wird auch durch die hier präsentierten, vollständigeren Zeitgänge beider Moleküle bestätigt. IL-6 wurde von Mono-Mac6 bereits nach relativ kurzer LPS-Stimulationszeit sezerniert. Nach 24 h konnten als Maximalwert etwa 1000 pg/mL im Überstand gemessen werden, was sich gut mit den in der Literatur beschriebenen IL-6-Werten unter gleichen experimentellen Bedingungen (Stimulation mit LPS 10 ng/mL für eine 24 h) deckt (27). Dabei zeigten sich über 24 h zwei Phasen der LPS-abhängigen IL-6-Produktion: Eine erste frühe Phase im Zeitraum von 1 h bis 4 h, in der schnell viel IL-6 produziert wurde, und eine zweite von 8 h bis 16 h, in der auf niedrigerem Niveau weiterhin IL-6 produziert wurde. Nach 24 h kehrte die Produktionsrate auf das Ausgangsniveau zurück. Die erste Phase ist nach Literaturangaben von NF κ B abhängig (53,54). Die zweite Phase war in dem in dieser Studie verwendeten Modellsystem abhängig von ZNF580: Die ausgeprägte Suppression von ZNF580 nach 16 h LPS-Stimulation (rund 0,4fache Menge des Ausgangsniveaus) fiel mit der zweiten Phase der IL-6-Produktion zusammen. Darüber hinaus war das Ansteigen von ZNF580 wiederum mit einem Abfall der IL-6-Produktion auf das Ausgangsniveau assoziiert, so dass auch dieser Zusammenhang den suppressiven Effekt von ZNF580 auf IL-6 bestätigte.

Mit diesem suppressiv-regulatorischen Einfluss auf IL-6 wirkt ZNF580 als ein Entzündungsmodulator: Auf der einen Seite könnte durch eine ZNF580-Induktion *post stimulationem* und eine dadurch erhöhte IL-6-Suppression als Gegenpol zu einem Entzündungsreiz eine überschießende inflammatorische Antwort von Monozyten verhindert werden. Auf der anderen Seite könnte - wie hier gezeigt - eine ZNF580-Abnahme zu einer protrahierten IL-6-Produktion führen, die mutmaßlich zu einer effektiveren Erregerbekämpfung beiträgt, da die inflammatorischen Vorgänge über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten werden.

4.7 Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigen die hier erhobenen Daten, dass ZNF580 ein im Kern von MonoMac6 lokalisiertes Protein ist und die Produktion von IL-6 supprimiert. Zudem reagiert es auf LPS-Stimulation, wodurch es die LPS-induzierte IL-6 Produktion moduliert. LPS-Stimulation führt in Monozyten zu einer schnellen IL-6-Produktion via NF κ B (1 h bis 8 h nach LPS-Stimulation: „Frühe IL-6-Produktion“). Im Verlauf von 8 h bis 24 h führt dieselbe LPS-Stimulation jedoch zu einem deutlichen Abfall von ZNF580, wodurch dessen Inhibition der IL-6-Produktion aufgehoben wird. Dies wiederum begünstigt die anhaltende IL-6-Produktion (8 h bis 24 h: „Erhaltene IL-6-Produktion“), obwohl die Aktivierung von NF κ B bereits abgeklungen ist (53,54) (Abbildung 4). Abschließend lassen die im Rahmen dieser Studie erhobenen Daten den Schluss zu, dass ZNF580 ein neuer Suppressor von IL-6 in MonoMac6 ist und dadurch im Rahmen von Entzündungsreaktionen eine modulierende Rolle einnimmt.



5 Ausblick

In dieser Studie konnte eine modulierende Funktion von ZNF580 aufgrund der IL-6-supprimierenden Wirkung demonstriert werden. In einem Arteriosklerose-Modell in einer anderen Studie konnte in ähnlicher Weise eine supprimierende Wirkung von ZNF580 auf IL-8 gezeigt werden, so dass ZNF580 zunächst als atheroprotektiv interpretiert wurde, insbesondere, weil es durch natives LDL induziert wird (22). Es wurde aber auch gezeigt, dass diese protektive Funktion bei erhöhten oxLDL/LDL-Quotienten aufgehoben wird. Interessant ist also die Frage, was in solchen Situationen passiert, in denen der Entzündungs-supprimierende Effekt von ZNF580 aufgehoben ist. Dies könnte z.B. bei der Sepsis, einer „Maximalvariante“ des in dieser Studie verwendeten Entzündungsmodells, der Fall sein, bei der u. a. LPS-stimulierte Monozyten IL-6 freisetzen. Es ist bislang nicht bekannt, wie ZNF580 zu den Entzündungsprozessen bei einer Sepsis beiträgt. Dies wäre sowohl für ein umfassenderes Verständnis zellulärer Entzündungs-

vorgänge als auch für die klinische Anwendung bedeutsam. Immerhin sind im Jahr 2015 in Deutschland 9.169 Menschen an einer Sepsis verstorben (55). ZNF580 könnte bei septischen Patienten ein prognostischer Marker für den Krankheitsverlauf und auch ein therapeutisches Ziel sein, mit dem es möglich ist, extreme Spitzen einer Entzündung abzumildern.

Die intrazellulären Signalwege, die in MonoMac6 nach LPS-Stimulation zu einer Aktivierung bzw. Inhibierung von ZNF580 führen, sind so gut wie unbekannt. Hierbei sollte das besondere Interesse der Interferenz zwischen NF κ B und ZNF580 nach LPS-Stimulation gelten. Auch die genauen Mechanismen, über die ZNF580 die Genexpression reguliert, müssen aufgeklärt werden. ZNF580 besitzt insgesamt drei Zinkfinger, so dass von einer DNA-Bindung auszugehen ist. Zudem gibt es Hinweise auf posttranslationale Modifikationen von ZNF580, v.a. Phosphorylierung und Sumoylierung, deren Bedeutung bislang nicht untersucht worden ist. Die Kenntnis dieser Signalwege könnte Anhaltspunkte für die therapeutische Beeinflussung des ZNF580-Systems liefern.

In Endothelzellen konnte eine Assoziation von ZNF580 zum TGF- β - (10, 11) und p38-MAP-Kinase-Signalweg (8) gezeigt werden. Beide Signalwege sind, genauso wie NF κ B, auch bei verschiedenen Krebserkrankungen von großer Bedeutung. IL-6 als Zielgen von ZNF580 trägt zudem zur Colitis-assoziierten Entstehung von Colonkarzinomen bei (43,46,47). Daher sollte auch die Assoziation von ZNF580 zu Krebserkrankungen untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Hall T. Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 2005;15(3):367–73.
2. Brayer KJ, Kulshreshtha S, Segal DJ. The protein-binding potential of C2H2 zinc finger domains. *Cell Biochem Biophys.* 2008;51(1):9–19.
3. <http://www.genenames.org/index.html>.
4. Razin S V., Borunova V V., Maksimenko OG, Kantidze OL. Cys2His2 Zinc Finger Protein Family: Classification, Functions, and Major Members. *Biochem.* 2012;77(3):217–26.
5. Iuchi S. Three classes of C2H2 zinc finger proteins. *Cell Mol life Sci.* 2001;58:625–35.
6. Wolfe SA, Nekludova L, Pabo CO. DNA Recognition By Cys2-His2-Zinc Finger Proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2000;3:183–212.
7. Zhang W, Chen B, Zeng W, Wu G XH. Cloning and tissue expression of a novel gene down-regulated by low density lipoprotein. *Basic Med Sci Clin.* 2003;23:279–282.
8. Sun H-Y, Wei S-P, Xu R-C, Xu P-X, Zhang W-C. Sphingosine-1-phosphate induces human endothelial VEGF and MMP-2 production via transcription factor ZNF580: novel insights into angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;395(3):361–6.
9. Zhu Y, Zhang W. Cloning and analyzing of the cDNA sequence of N-terminal region and C-terminal region of zinc finger protein (ZFP580) gene. *Life Sci J.* 2008;5(1):68–73.
10. Luo Y, Hu W, Xu R, Hou B, Zhang L, Zhang W. ZNF580, a novel C2H2 zinc-finger transcription factor, interacts with the TGF- β signal molecule Smad2. *Cell Biol Int.* 2011;35(11):1153–7.
11. Luo Y, Zhao Y, Li X, Zhao J, Zhang W. ZNF580 mediates eNOS expression and endothelial cell migration/proliferation via the TGF- β 1/ALK5/Smad2 pathway. *Mol Cell Biochem.* 2014;393(1):199–207.
12. Wei S, Huang J, Li Y, Zhao J, Luo Y, Meng X, Sun H, Zhou X, Zhang M, Zhang W. Novel zinc finger transcription factor ZFP580 promotes differentiation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into endothelial cells via eNOS/NO pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;87:17–26.

13. Shi C, Yao F, Li Q, Khan M, Ren X, Feng Y, Huang J, Zhang W. Regulation of the endothelialization by human vascular endothelial cells by ZNF580 gene complexed with biodegradable microparticles. *Biomaterials*. 2014;35(25):7133–45.
14. Li Q, Shi C, Zhang W, Behl M, Lendlein A, Feng Y. Nanoparticles complexed with gene vectors to promote proliferation of human vascular endothelial cells. *Adv Healthc Mater*. 2015;4(8):1225–35.
15. Hao X, Li Q, Lv J, Yu L, Ren X, Zhang L, Feng Y, Zhang W. CREDVW-Linked Polymeric Micelles As a Targeting Gene Transfer Vector for Selective Transfection and Proliferation of Endothelial Cells. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(22):12128–40.
16. Feng Y, Guo M, Liu W, Hao X, Lu W, Ren X, Shi C, Zhang W. Co-self-assembly of cationic microparticles to deliver pEGFP-ZNF580 for promoting the transfection and migration of endothelial cells. *Int J Nanomedicine*. 2017;Volume 12:137–49.
17. Lv J, Hao X, Li Q, Akpanyung M, Nejjari A, Neve AL, Ren X, Feng Y, Shi C, Zhang W. Star-shaped copolymer grafted PEI and REDV as a gene carrier to improve migration of endothelial cells. *Biomater Sci*. 2017;(3):511–22.
18. Yang J, Hao X, Li Q, Akpanyung M, Nejjari A, Neve AL, Ren X, Guo J, Feng Y, Shi C, Zhang W. CAGW Peptide- and PEG-Modified Gene Carrier for Selective Gene Delivery and Promotion of Angiogenesis in HUVECs in Vivo. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(5):4485–97.
19. Shi C, Li Q, Zhang W, Feng Y, Ren X. REDV peptide conjugated nanoparticles/pZNF580 complexes for actively targeting human vascular endothelial cells. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(36):20389–99.
20. Meng XY, Yu HL, Zhang WC, Wang TH, Mai X, Liu HT, Xu RC. ZFP580, a novel zinc-finger transcription factor, is involved in cardioprotection of intermittent high-altitude hypoxia against myocardial ischemia-reperfusion injury. *PLoS One*. 2014;9(4):1–9.
21. Mao S, Meng X, Xu Z, Zhang W, Jin X, Chen X, Zhou X, Li Y, Xu R. The role of ZFP580, a novel zinc finger protein, in TGF-mediated cytoprotection against chemical hypoxia-induced apoptosis in H9c2 cardiac myocytes. *Mol Med Rep*. 2017;15(4):2154–62.
22. Hoffmann CJ, Hohberg M, Chlench S, Maroski J, Drab M, Siegel G, Pries AR, Zakrzewicz A. Suppression of zinc finger protein 580 by high oxLDL/LDL-ratios is followed by enhanced expression of endothelial IL-8. *Atherosclerosis*. 2011;216(1):103–8.

23. Ren D, Wang H, Liu J, Zhang M, Zhang W. ROS-induced ZNF580 expression: a key role for H₂O₂/NF- κ B signaling pathway in vascular endothelial inflammation. *Mol Cell Biochem.* 2012;359(1):183–91.
24. Serbina N V, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:421–52.
25. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:762–74.
26. Ziegler-Heitbrock HW, Thiel E, Fütterer A, Herzog V, Wirtz A, Riethmüller G. Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer.* 1988;41(3):456–61.
27. Neustock P, Brand JM, Kruse A, Kirchner H. Cytokine production of the human monocytic cell line Mono Mac 6 in comparison to mature monocytes in peripheral blood mononuclear cells. Vol. 188, *Immunobiology.* 1993. p. 293–302.
28. Ziegler-Heitbrock HWL, Blumenstein M, Käfferlein E., Kieper D, Petersmann I, Endres S, Flegel WA, Northoff H, Riethmüller G, Haas J. In vitro desensitization to lipopolysaccharide suppresses tumour necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 gene expression in a similar fashion. *Immunology.* 1992;75:264–8.
29. Ziegler-Heitbrock HWL, Schraut W, Wendelgass P, Ströbel M, Sternsdorf T, Weber C, Aepfelbacher M, Ehlers M, Schütt C, Haas J. Distinct patterns of differentiation induced in the monocytic cell line Mono Mac 6. Vol. 55, *Journal of Leukocyte Biology.* 1994. p. 73–80.
30. Frankenberger M, Pforte A, Sternsdorf T, Passlick B, Baeuerle PA, Ziegler-Heitbrock HWL. Constitutive nuclear NF- κ B in cells of the monocyte lineage. *Biochem J.* 1994;304:87–94.
31. Eddy J-B. Care Medicine Cellular Mechanisms in Sepsis. *J Intensive Care Med.* 2007;22(2):63–72.
32. Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ, Hauschildt S. LPS-Induced Cytokine Production in Human Monocytes and Macrophages. *Crit Rev Immunol.* 2011;31(5):379–446.
33. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 2008;42(2):145–51.
34. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol.* 2004;16:3–9.
35. Gilmore TD. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene.* 2006;25(51):6680–4.

36. Baeuerle P. The inducible transcription activator NF- κ B : regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1072:63–80.
37. Baeuerle PA, Henkel T. Function And Activation Of NF- κ B In The Immune System. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:141–79.
38. Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF- κ B and the immune response. *Oncogene*. 2006;25(51):6758–80.
39. Müller JM, Ziegler-Heitbrock HWL, Baeuerle PA. Nuclear Factor kappa B, a Mediator of Lipopolysaccharide Effects. *Immunobiology*. 1993;187:233–56.
40. Liang Y, Zhou Y, Shen P. NF- κ B and Its Regulation on the Immune System. *Cell Mol Immunol*. 2004;1(5):343–50.
41. Libermann TA, Baltimore D. Activation of Interleukin-6 Gene Expression through the NF- κ B Transcription Factor. *Mol Cell Biol*. 1990;10(5):2327–34.
42. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol*. 2015;16(5):448–57.
43. Rath T, Billmeier U, Waldner MJ, Atreya R, Neurath MF. From physiology to disease and targeted therapy: interleukin-6 in inflammation and inflammation-associated carcinogenesis. *Arch Toxicol*. 2015;89(4):541–54.
44. Jones SA. Directing Transition from Innate to Acquired Immunity : Defining a Role for IL-6. *J Immunol*. 2014;175(6):3463–8.
45. Yao X, Huang J, Zhong H, Shen N, Faggioni R, Fung M, Yao Y. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. *Pharmacol Ther*. 2014;141(2):125–9.
46. Neurath MF, Finotto S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011;22(2):83–9.
47. Waldner MJ, Neurath MF. Master regulator of intestinal disease: IL-6 in chronic inflammation and cancer development. *Semin Immunol*. 2014;26(1):75–9.
48. Chaudhry H, Zhou J, Zhong Y, Ali MM, McGuire F, Nagarkatti PS, Mitzi N. Role of Cytokines as a Double-edged Sword in Sepsis. *In Vivo (Brooklyn)*. 2013;27(6):669–84.
49. Jekarl WD, Lee S, Lee J, Park Y-J, Kim Y, Park HJ, Wee JH, Choi SP. Procalcitonin as a diagnostic marker and IL-6 as a prognostic marker for sepsis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;75(4):342–7.
50. Uusitalo-Seppälä R, Koskinen P, Leino A, Peuravuori H, Vahlberg T, Rintala EM. Early detection of severe sepsis in the emergency room: Diagnostic value of

- plasma C-reactive protein, procalcitonin and interleukin-6. *Scand J Infect Dis.* 2011;43(11–12):883–90.
51. Naffaa M, Makhoul BF, Tobia A, Kaplan M, Aronson D, Saliba W, Azzam Z. Interleukin-6 at discharge predicts all-cause mortality in patients with sepsis. *Am J Emerg Med.* 2013;31(9):1361–4.
 52. http://www.monocytes.de/index.php?page=monomac6_cc.
 53. Roach JC, Smith KD, Strobe KL, Nissen SM, Haudenschild CD, Zhou D, Vasicek TJ, Held GA, Stolovitzky GA, Hood LE, Aderem A. Transcription factor expression in lipopolysaccharide- activated peripheral-blood-derived mononuclear cells. *PNAS.* 2007;104(41):16245–50.
 54. Cordle SR, Donald R, Read MA, Hawiger J. Lipopolysaccharide Induces Phosphorylation of MAD3 and Activation of c-Rel and Related NF-kB Proteins in Human Monocytic THP-1. *J Biol Chem.* 1993;268(16):11803–10.
 55. Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland. *Wirtsch Stat.* 2017;Fachserie(Reihe 4):1–44.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Philipp Stenzel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zum Einfluss von Zinkfinger-Protein 580 auf die LPS-induzierte Interleukin-6-Produktion in Monozyten“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich möchte den hier genannten sehr herzlich danken:

Professor Axel Pries für die Möglichkeit, im Institut für Physiologie zu promovieren,

Dr. Andreas Zakrzewicz für die Überlassung des Themas und die individuelle Betreuung in allen Phasen des Projekts,

meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meinen Eltern, für die Unterstützung und den Zuspruch,

und den Kolleg_innen aus dem Institut für Physiologie für die spannende Zeit und die vielen Tipps und Hilfestellungen.