

Frühe Mechanismen der Signaltransduktion  
in dendritischen Zellen während der Aktivierung  
durch Kontaktallergene

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt dem Fachbereich  
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

von  
ELKE VALK  
aus Bonn

Frankfurt, 2003  
(D F 1)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:	Prof. Dr. Müller
Gutachter:	Prof. Dr. Knop Prof. Dr. Steinhilber
Datum der Disputation:	22.10.2003

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden in der Zeit von Januar 2000 bis März 2003 an der Universitäts-Hautklinik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz erarbeitet und im Rahmen des Sonderforschungsbereiches "Analyse und Modulation allergischer und autoimmunologischer Krankheiten", SFB 548 (PD Dr. D. Becker) gefördert.

## Danksagung

Herrn Prof. Jürgen Knop sowie Herrn Prof. Dieter Steinhilber möchte ich für die Bereitschaft danken, diese Dissertation zu betreuen.

Herrn PD Dr. Detlef Becker sei gedankt für das Bereitstellen des Themas, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die kritische Durchsicht der Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Labors möchte ich für die freundliche Atmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft danken.

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Nawrath und Johanna Rupp für die freundliche und unkomplizierte Unterstützung bei den Calcium-Messungen,

Dr. Michael Stassen, der die Durchführung des RPAs ermöglicht hat, sowie Dr. Esther von Stebut und Katharina Moelle für ihre Hilfe bei der Durchführung,

Sabine Zahn und Steffi Bruchhausen für die sehr gute Zusammenarbeit und die Anmerkungen zur Arbeit,

Dr. Pia Brand für die Einarbeitung und die Hilfsbereitschaft in der ersten Phase der Arbeit,

Alexander Kupfer für die stetige Motivation und Unterstützung während aller Phasen der Promotion.

### **Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:**

BRUCHHAUSEN S., S. ZAHN, **E. VALK**, J. KNOP, D. BECKER, 2003. Thiol antioxidants block the activation of antigen-presenting cells by contact sensitizers. *J. Invest. Dermat.* im Druck

BECKER D, **E. VALK**, S. ZAHN, P. BRAND, J. KNOP, 2003. Coupling of contact sensitizers to thiol groups is a key event for the activation of monocytes and monocyte-derived dendritic cells. *J. Invest. Dermatol* 120(2): 233-8.

BRAND P, S. PLOCHMANN, **E. VALK**, S. ZAHN, J. SALOGA, J. KNOP, D. BECKER, 2002. Activation and translocation of p38 mitogen-activated protein kinase after stimulation of monocytes with contact sensitizers. *J. Invest. Dermatol.* 119(1): 99-106.

**VALK E.**, S. ZAHN, J. KNOP, D. BECKER, 2002. JAK/STAT pathways are not involved in the direct activation of antigen-presenting cells by contact sensitizers. *Arch. Dermatol. Res.* 294(4): 163-7.

### **Kongreßbeiträge:**

**VALK E**, ZAHN S, KNOP J, BECKER D: "Upstream signaling events of ERK activation in dendritic cells by contact sensitizers", 30. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, Frankfurt, 27.02.-01.03.2003, Poster und Abstrakt

**VALK E**, ZAHN S, KNOP J, BECKER D: "JAK/STAT pathways are not involved in the direct activation of antigen-presenting cells by contact sensitizers" 13. Mainzer Allergie-Workshop, 02.-03.03.2001, Vortrag und Abstrakt

**VALK E**, ZAHN S, KNOP J, BECKER D: "JAK/STAT pathways are not involved in the direct activation of antigen-presenting cells by contact sensitizers" 28. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung ng, Frankfurt, 15.-17.02.2001, Poster und Abstrakt

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Antigen-präsentierende Zellen	1
1.2	Die Kontaktallergie	4
1.3	Signaltransduktion	7
1.3.1	Jak/STAT-Signalwege	7
1.3.2	Die MAP Kinase-Kaskaden	9
1.3.3	Frühe Signaltransduktionselemente	11
1.3.4	Modelle der ERK-Aktivierung	18
1.3.5	Kontaktallergene und Signaltransduktion	21
1.4	Zielsetzung	23
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>25</b>
2.1	Material	25
2.1.1	Geräte	25
2.1.2	Reaktionsgefäße und Materialien	25
2.1.3	Chemikalien	25
2.1.4	Medien	28
2.1.5	Puffer und Lösungen	28
2.1.6	Antikörper	31
2.1.6.1	Antikörper für die Proteinbiochemie	31
2.1.6.2	Antikörper für Durchflußzytometrie und Immunhistochemie	32
2.2	Methoden	33
2.2.1	Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC)	33
2.2.2	Anreicherung von Monozyten aus PBMC	33
2.2.3	Anreicherung von dendritischen Zellen aus PBMC	34
2.2.4	Zellstimulation	34
2.2.5	Fluoreszenzmikroskopie	35
2.2.6	Durchflußzytometrie	35
2.2.6.1	Phänotypisierung der Zellen	35
2.2.6.2	Reaktivitäts-Messung	36
2.2.6.3	Messung der PKC-Translokation	37
2.2.6.4	Viabilitäts-Bestimmung	37
2.2.7	Proteinbiochemie	38
2.2.7.1	Zell-Lyse	38
2.2.7.2	Proteinbestimmung	38
2.2.7.3	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	38
2.2.7.4	Western Blotting	40
2.2.7.5	Detektion von Western Blots	41
2.2.8	Ras-Aktivierungsassay	42
2.2.9	Raf IP Kinase Assay	42
2.2.10	Messung der intrazellulären freien Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$	43
2.2.11	RNA-Isolierung	44
2.2.12	RNase-Protection Assay	44
2.2.13	Elispot	45
2.2.14	Statistische Auswertung	46

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>47</b>
3.1	Charakterisierung des Modellsystems	47
3.1.1	Phänotyp angereicherter Monocyten	47
3.1.2	Phänotyp von unreifen und reifen dendritischen Zellen	47
3.1.3	Tyrosinphosphorylierung	49
3.1.4	Cytokinexpression	50
3.1.5	TNF- $\alpha$ -Produktion	51
3.2	Aktivierung von Jak/STAT-Signalwegen	53
3.3	Aktivierung von MAP Kinasen durch Kontaktallergene	58
3.3.1	Aktivierungsmuster für verschiedene Kontaktallergene	58
3.3.2	Aktivierung von ERK und p38 in unreifen dendritischen Zellen	60
3.3.3	Dosisabhängigkeit der ERK-Aktivierung	61
3.3.4	Zeitkinetik der ERK-Aktivierung durch MCI/MI	63
3.3.5	Inhibition der TNF- $\alpha$ -Produktion durch MAPK-Inhibitoren	64
3.4	Upstream Mechanismen der ERK-Aktivierung: Die ERK-Core-Kaskade	66
3.4.1	Beteiligung der ERK-Core-Kaskade	66
3.4.2	Aktivität von c-Raf	69
3.5	Upstream Mechanismen der ERK-Aktivierung: Die GTPase Ras	71
3.6	Die Rolle von Calcium	73
3.6.1	Einfluß von Calcium auf die ERK-Aktivierung	73
3.6.2	Abhängigkeit der Tyrosinphosphorylierung von $[Ca^{2+}]_i$	76
3.6.3	Calcium-Mobilisierung durch MCI/MI	77
3.6.4	Beteiligung von Calmodulin an der Aktivierung von ERK durch MCI/MI	79
3.7	Proteinkinase C	81
3.8	PI <sub>3</sub> -Kinase	85
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>87</b>
4.1	Charakterisierung des Modellsystems	87
4.2	Jak / STAT	90
4.3	Aktivierung von MAP Kinasen durch Kontaktallergene	92
4.4	ERK-Core Kaskade	96
4.5	Ras	97
4.6	Calcium	99
4.7	Proteinkinase C	103
4.8	PI <sub>3</sub> -Kinase	105
4.9	Modell der ERK-Aktivierung durch Kontaktallergene	106
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>122</b>

## 1. Einleitung

Das Immunsystem hat eine Reihe von Mechanismen entwickelt, um den Körper vor Infektionen zu schützen. Die angeborene Immunität dient der ersten Abwehr. Sie kann Krankheitserreger jedoch nicht spezifisch erkennen und bietet auch keinen gezielten Schutz gegen eine erneute Infektion. Die angeborene Immunität wird zu einem großen Teil von den Granulocysten getragen, zu denen Makrophagen und andere Phagozyten gehören. Die adaptive (erworbene) Immunität basiert auf der klonalen Selektion von B- und T-Lymphocysten, die eine Vielzahl hochspezifischer Rezeptoren besitzen, die es dem Immunsystem ermöglichen, jedes beliebige fremde Antigen zu erkennen und gezielt zu bekämpfen. Die adaptive Immunität ermöglicht auch die Entstehung des immunologischen Gedächtnisses durch ausdifferenzierte spezifische Gedächtniszellen. Die angeborene und die erworbene Immunität bilden zusammen ein außerordentlich wirksames Abwehrsystem (Janeway & Travers 1997).

### 1.1 Antigen-präsentierende Zellen

Lange Zeit hat sich die Immunologie auf das Zusammenspiel von Antigen, B- und T-Lymphocysten bei der adaptiven Immunantwort konzentriert. Erst in den 1980er und 1990er Jahren wurde deutlich, daß eine dritte Gruppe eine wichtige Rolle spielt: die dendritischen Zellen als Antigen-präsentierende Zellen sind Initiatoren und Modulatoren von Immunantworten (Banchereau & Steinman 1998).

Dendritische Zellen sind effiziente Stimulatoren von B- und T-Lymphocysten. Während B-Zellen Antigen durch den B-Zell-Rezeptor direkt erkennen können, sind T-Zellen auf die Präsentation von Antigen durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen angewiesen. Die Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit den mit Antigenfragmenten beladenen MHC-Molekülen wird (major histocompatibility complex) durch kostimulatorische Moleküle wie B7, CD28, CD40, CD40-Ligand und CD4 bzw. CD8 unterstützt.

Dendritische Zellen exprimieren eine Reihe von Oberflächenmolekülen. Dazu zählen MHC I und MHC II, die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 (B7.1 und B7.2),

CD40, verschiedene Adhäsionsmoleküle wie CD50, CD54 (ICAM-1 und -3) und CD24 (HSA). Weiterhin sind Rezeptoren, die die Aufnahme von Antigen vermitteln, wie DEC205 und FcR, und verschiedene Cytokin-Rezeptoren, wie Rezeptoren für TNF, GM-CSF, IL-1, IL-4 oder TGF- $\beta$  bekannt. Einige dieser Oberflächenmarker können zur Charakterisierung des Ausreifungsgrades von dendritischen Zellen eingesetzt werden. So wird die Expression von MHC II, von CD80, CD86 und CD83 während der Ausreifung auf der Zelloberfläche verstärkt, während die Anzahl der Fc-Rezeptoren vermindert wird (Banchereau & Steinman 1998). Darin spiegeln sich die Aufgaben von reifen und unreifen dendritischen Zellen wider: Unreife dendritische Zellen nehmen Antigen im peripheren Gewebe auf und reifen dann zu potenten Antigen-präsentierenden Zellen. Unreife dendritische Zellen sind durch die Fähigkeit zur Endocytose gekennzeichnet, während reife dendritische Zellen durch hohe Mengen an MHC-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen optimal zur Aktivierung von T-Zellen geeignet sind (Romani et al. 1989, Jonuleit et al. 1996, McLellan et al. 1996, Steinman & Swanson 1995).

Zu den Aufgaben von dendritischen Zellen zählen die Aufnahme von Antigen im peripheren Gewebe, die Optimierung der klonalen Selektion von spezifischen CD4 - und CD8 - positiven T-Zellen, die Stimulation von ruhenden, naiven oder memory B- und T-Zellen und die Induktion von Toleranz oder Anergie in T-Zellen (Banchereau & Steinman 1998).

Dendritische Zellen können aus Monocyten aus dem peripherem Blut oder aus CD34-positiven Knochenmarkszellen generiert werden. Die Zellen differenzieren in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 zu dendritischen Zellen (Sallusto & Lanzavecchia 1994, Romani et al. 1994). Als Ausreifungsstimuli sind unter anderem verschiedene Cytokine wie TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , bakterielle Substanzen wie Lipopolysaccharid (LPS) oder auch Kontaktallergene bekannt (Sallusto et al. 1995, De Smedt et al. 1996, Verhasselt et al. 1997, Aiba et al. 1997, Manome et al. 1999). In vitro wird häufig ein Cytokin-Gemisch aus TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Prostaglandin und IL-6 eingesetzt (Jonuleit et al. 1997).



In vitro führt die Stimulation mit Kontaktallergenen zur Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen. So kann nach der Stimulation mit Kontaktallergenen bei unreifen aus Monocyten-generierten dendritischen Zellen die Hochregulation der Oberflächenmarker MHC II, CD86, CD80, CD83 und CD54 beobachtet werden (Aiba et al. 1997, Manome et al. 1999, Tuschl et al. 2000, Arrighi et al. 2001).

Die adaptive Immunantwort stellt einen wesentlichen Bestandteil der Abwehr gegen Infektionen dar. Sie ist damit zur Aufrechterhaltung der Gesundheit unerlässlich. Allerdings werden adaptive Immunreaktionen manchmal auch gegen harmlose Antigene hervorgerufen. So können Umweltantigene allergische Reaktionen auslösen oder es kommt zu Immunreaktionen gegen körpereigene Gewebsantigene, den sogenannten Autoimmunerkrankungen.

Als Allergien werden Erkrankungen bezeichnet, bei denen das Immunsystem mit einer Entzündungsreaktion auf eigentlich unschädliche Umweltfaktoren reagiert. Allergien zählen zu den häufigsten Erkrankungen in den Industrienationen und gehören zu einer Klasse von Immunreaktionen, die man als Hypersensibilität oder Überempfindlichkeit bezeichnet. Coombs & Gell (1963, 1975) haben die hypersensiblen Reaktionen nach immunologischen Kriterien in vier Gruppen eingeteilt. Zur Typ I Allergie („Soforttyp“) zählen die allergische Rhinitis, allergisches Asthma und die systemische Anaphylaxie (z.B. gegen Wespengift). Hypersensibilitätsreaktionen der Typen I, II und III werden durch Antikörper vermittelt. Bei Typ I handelt es sich um IgE-Antikörper, bei Typ II und III (z.B. Medikamentenallergien, Transfusionsreaktionen, Serumkrankheit) hauptsächlich um IgG-Antikörper. Typ IV Reaktionen dagegen sind in erster Linie Zell-vermittelt und treten verzögert auf. Die Gewebsschädigung beruht entweder auf einer TH1-vermittelten Entzündungsreaktion und der Infiltration von Makrophagen, oder die Schädigung wird durch cytotoxische T-Zellen verursacht.

## 1.2 Die Kontaktallergie

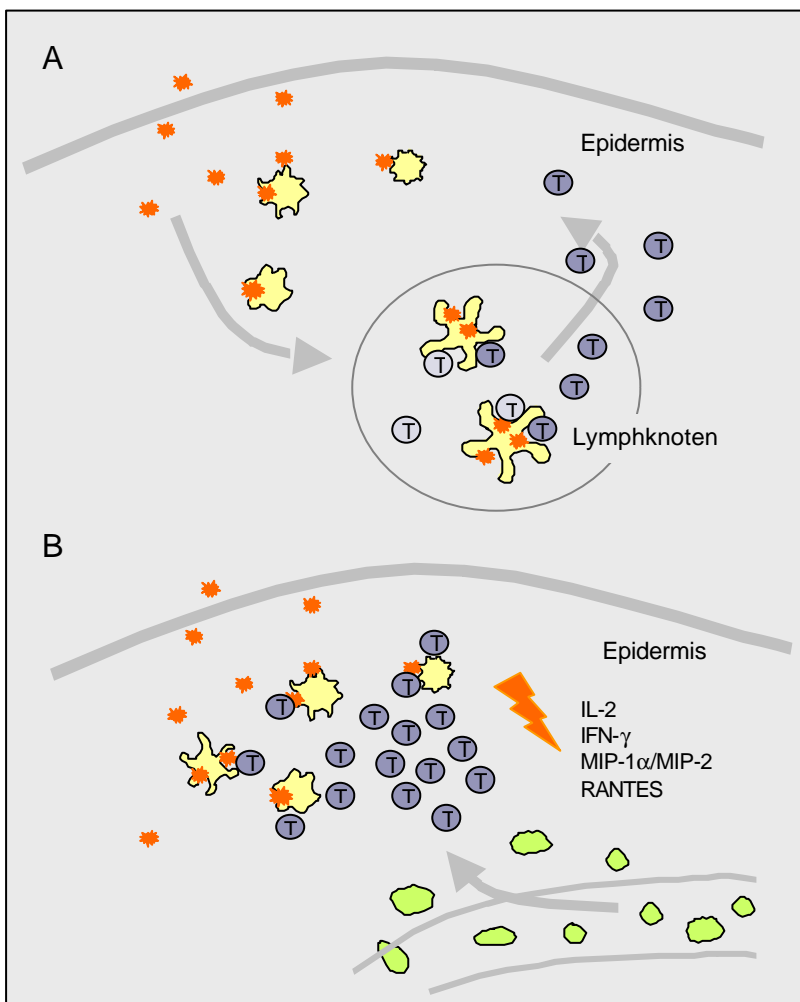
Die Kontaktallergie gehört zu den Typ IV Reaktionen nach Coombs und Gell (1975). Sie wird zu den Hypersensibilitätsreaktionen vom verzögerten Typ gezählt, da die klinische Reaktion bei einer sensibilisierten Person erst 24-72 Stunden nach Kontakt mit dem Allergen sichtbar wird. Kontaktallergene sind in der Regel niedermolekulare (<1kD), lipophile Substanzen, die auch als Haptene bezeichnet werden (Landsteiner 1936). Haptene werden vom Immunsystem erst als Antigen erkannt, wenn sie an körpereigene Proteine über freie Thiol- oder Aminogruppen koppeln (Basketter et al. 1995, Roberts & Lepoittevin 1998). Sie können auch an Zellmembranassoziierte Moleküle binden. Dies gilt vor allem für Metallionen wie Nickel, die direkt mit Peptiden in der Bindungsregion des MHC-Klasse II-Komplexes reagieren können (Frosch et al. 1996a).

Kontaktallergene sind Bestandteile von Modeschmuck (Nickel, Kobalt, Palladium, Chrom) (Ikarashi et al. 1996), Duftstoffe in Parfum, wie z. B. Eugenol (Bertrand et al. 1997). Auch Konservierungsmittel in Arzneimitteln wie Thiomersal, Formaldehyd in Holzschutzmitteln oder Chlormethylisothiazolon in Kosmetika können Auslöser einer Kontaktallergie sein (de Groot & Herxheimer 1989, Aguirre Martin-Falero et al. 1990, Elferink 1999, Zissu 2002). Chlormethylisothiazolon wird unter verschiedenen Produktbezeichnungen als Gemisch aus Chlormethylisothiazolon (MCI) und Methylisothiazolon (MI) eingesetzt. Dazu zählt Kathon mit einem Mischungsverhältnis von 3:1 Chlormethylisothiazolon zu Methylisothiazolon. Als eigentlich sensibilisierende Komponente wird Chlormethylisothiazolon angesehen (Alexander 2002). Kathon wird seit den 1980er Jahren als Konservierungsstoff in kosmetischen und industriellen Produkten eingesetzt. MCI/MI gehört noch immer zu den häufigen Kontaktallergenen mit einer Sensibilisierungsrate von 0,7 bis 8,4% (Bohn et al. 2000). Als experimentelle Kontaktallergene werden TNCB (Trinitrochlorbenzol), DNFB (Dinitrofluorbenzol) und DNCB (Dinitrochlorbenzol) eingesetzt. Im Gegensatz zu den klinisch relevanten Kontaktallergenen ist das Sensibilisierungspotential der experimentellen Kontaktallergene

höher. Mit diesen Allergenen z.B. DNFB ist es möglich bei jedem Probanden eine Kontaktallergie auszulösen (Frosch et al. 1996a).

Die Kontaktallergie ist eine T-Zell-vermittelte Immunreaktion bei deren Entstehung dendritische Zellen eine wichtige Rolle spielen, in der Epidermis vor allem Langerhanszellen (Teunissen 1992). Man unterscheidet bei der Entstehung einer Kontaktallergie zwei Phasen: Die Sensibilisierungs- und die Auslösephase (Abb. 1, nach Frosch et al. 1996a/b, Scheynius 1998).

Während der Sensibilisierungsphase kommt es zum initiierenden Kontakt mit dem Allergen. Haptene können durch die Hornhautbarriere in die Epidermis eindringen und binden an epidermale Proteine (Basketter et al. 1995). Diese Protein-Hapten-Komplexe



**Abb. 1: Sensibilisierungs- und Auslösephase bei der Entstehung einer Kontaktallergie (nach Frosch et al. 1996a/b, Scheynius 1998)**

werden von den dendritischen Zellen der Epidermis (Romani et al. 1989a/b), internalisiert, prozessiert und über MHC II-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert. Der Kontakt mit Haptenen bewirkt die Aktivierung der Zellen und induziert die Produktion von inflammatorischen Cytokinen wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  (Enk & Katz 1992).

Aktivierete Langerhans Zellen wandern aus der Epidermis über die afferenten Lymphbahnen in die lokalen Lymphknoten ein. Im Laufe dieser Wanderung reifen sie zu potenten Antigen-präsentierenden Zellen aus (Wang et al. 1997, Weinlich et al. 1998, Antonopoulos et al. 2001).

In den lokalen Lymphknoten wird das prozessierte Allergen naiven T-Zellen präsentiert. Die Aktivierung und klonale Expansion von Hapten-spezifischen T-Lymphocyten ist das entscheidende Ereignis bei der Sensibilisierung (Kimber & Dearman 2002). Allergen-spezifische T-Zellen wandern aus den Lymphknoten aus und zirkulieren in den peripheren Geweben.

Während der Sensibilisierungsphase kommt es in der Regel noch nicht zu einer klinischen Reaktion. Bei erneutem Kontakt mit dem Allergen – in der Auslösephase – werden die im Gewebe patrouillierenden spezifischen T-Zellen aktiviert. Es kommt zur Produktion von TH1 typischen Cytokinen wie IL-2 und IFN- $\gamma$ , zur Proliferation der T-Zellen und zur Freisetzung von Chemokinen wie MIP-1 $\alpha$ , MIP-2, RANTES, IP-10 und IL-8, die die Einwanderung von Makrophagen, Eosinophilen und anderer nicht antigenspezifischen Zellen bewirken (Frosch et al. 1996a, 1996b). Die lokale Entzündungsreaktion führt zur Zerstörung epidermalen Gewebes und manifestiert sich innerhalb von 24-72 Stunden nach Kontakt mit dem Allergen als Ekzem. Man nahm lange an, daß die Kontaktallergie hauptsächlich durch CD4-positive TH1-Zellen vermittelt wird. Heute geht man davon aus, daß es sich um eine „gemischte“ Reaktion handelt, bei der cytotoxische CD8-positive T-Zellen mit Tc1 Phänotyp eine entscheidende Rolle spielen und CD4-positive Zellen regulatorische Funktion übernehmen (Grabbe & Scharz 1998, Kimber & Dearman 2002).

Während die zellulären Prozesse bei der Entstehung einer Kontaktallergie relativ gut beschrieben sind, ist wenig bekannt über die molekularen Mechanismen, die der Aktivierung durch Kontaktallergene zugrunde liegen. So stellt sich die Frage welche Signalmechanismen in der Zelle die Aktivierung durch Kontaktallergene vermitteln können.

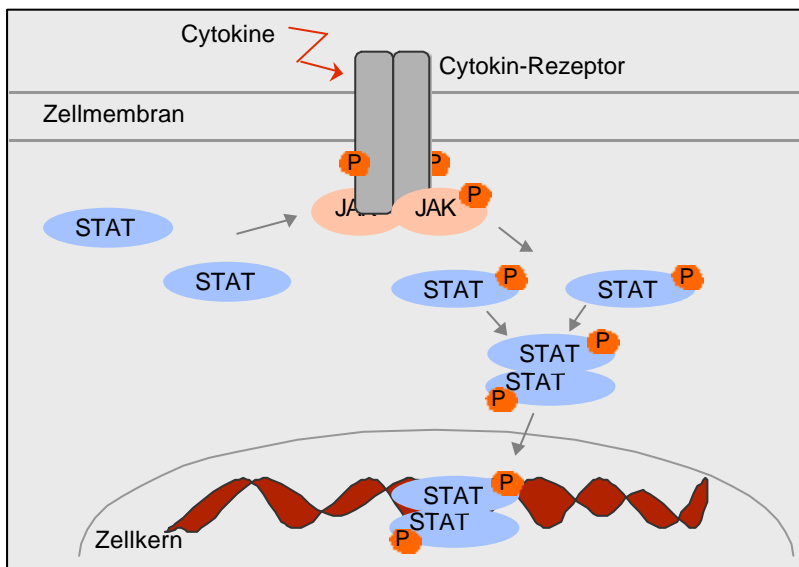
### 1.3 Signaltransduktion

In der Zelle existieren eine Reihe von Signalübertragungssystemen, die an der Umsetzung eines an der Zelloberfläche eingehenden Signals beteiligt sind. In den folgenden Kapiteln sollen einige solcher Systeme kurz vorgestellt werden. Dazu zählen das Jak/STAT System (1.3.1), die MAP Kinasen ERK, p38 und JNK (1.3.2) sowie einige frühe Signalmechanismen, die der Aktivierung der MAP Kinasen (1.3.3) vorausgehen.

#### 1.3.1 Jak/STAT-Signalwege

Jak/STAT-Signalwege (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) gehören zu den wichtigsten Mechanismen der Signalübertragung von Cytokin-Rezeptoren zum Zellkern (Liu 1998). Bisher wurden sieben STAT-Moleküle beschrieben: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6 (Liu et al. 1998, Wurster et al. 2000, Ihle 2001).

Die Aktivierung einer Zelle durch Cytokine über Jak/STAT-Signalwege erklärt man mit dem in Abbildung 2 dargestellten Modell. Die Bindung eines Cytokins an den spezifischen



Rezeptor führt zur Aktivierung des Rezeptors. STAT-Monomere assoziieren an den cytoplasmatischen Rest von aktivierten Cytokin-Rezeptoren. Nach der Bindung an den Rezeptorkomplex über ihre SH2-Domänen,

**Abb. 2: Modell der Signalübertragung durch Jak/STAT-Signalwege**

werden die STAT-Moleküle von Rezeptor-assoziierten Janus Kinasen (Jak) an bestimmten Tyrosin-Resten phosphoryliert. Die Phosphorylierung der STAT-Moleküle ermöglicht die Bildung von Homo- oder Hetero-Dimeren, die in den Zellkern einwandern und als Transkriptionsfaktoren an die DNA binden (Darnell 1997, Liu et al. 1998, Wurster et al.

2000, Ihle 2001). Tabelle 1 ist zu entnehmen, welche STAT-Moleküle durch welche Cytokine aktiviert werden.

Tab. 1: Aktivierung von STAT-Molekülen durch Cytokine (nach Liu et al. 1998, Ihle 2001)

<b>STAT - Isoform</b>	<b>aktivierende Cytokine</b>
STAT1	IFN- $\alpha/\beta$ , IL-6
STAT2	IFN- $\alpha$
STAT3	IL-10, IFN- $\alpha$ ,
STAT4	IL-12, IFN- $\alpha$
STAT5a, b	GM-CSF, G-CSF, IFN- $\alpha$ , IL-10, IL-2, u.a.
STAT6	IL-4, IL-13

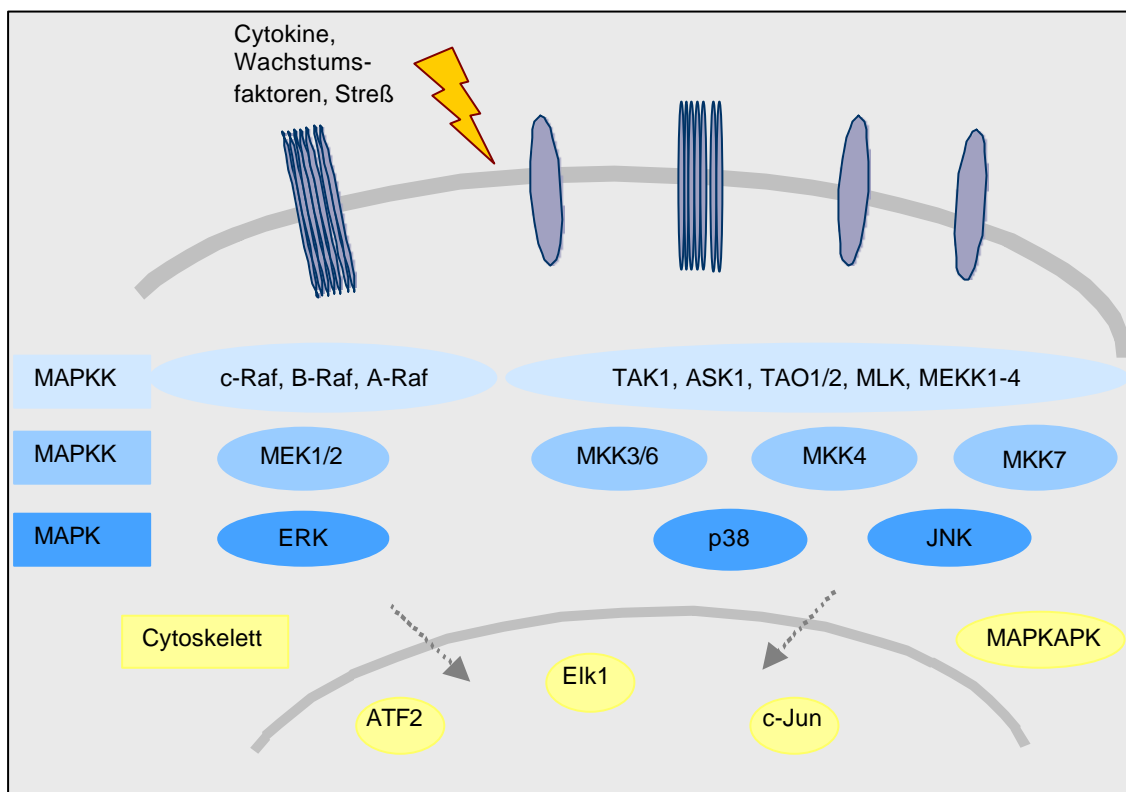
Yokozeki et al. konnten zeigen, daß STAT6 eine wichtige Rolle bei der Induktion einer Kontaktallergie in der Maus spielt. STAT6 defiziente Mäuse zeigen eine verminderte Reaktion auf Kontaktallergene (Yokozeki et al. 2000). Unklar ist, ob STAT6 an der Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen durch Kontaktallergene beteiligt ist.

Die Aktivierung von Jak/STAT-Signalwegen ist wichtig für die Differenzierung von myeloiden Zellen (Smithgall et al. 2000). Cytokine kontrollieren die Aktivierung von Langerhans-Zellen während inflammatorischer Prozesse, regulieren die Expression von kostimulatorischen Molekülen und induzieren die Auswanderung von Langerhanszellen aus der Epidermis (Jonuleit et al. 1996, Kimber & Cumberbatch 1992). Cytokine wie IL-4 und GM-CSF und deren Signalmechanismen in der Zelle sind somit essentiell für die Ausreifung und Aktivierung von dendritischen Zellen. In vitro konnte gezeigt werden, daß auch Kontaktallergene die Ausreifung von dendritischen Zellen auslösen können, die Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen bewirken und die T-Zell-Stimulations-Kapazität von dendritischen Zellen erhöhen (Aiba et al. 1997, Manome et al. 1999, Arrighi et al. 2001).

Neben der direkten Umsetzung von Signalen vom Rezeptor zum Zellkern werden auch viele Schnittstellen des Jak/STAT-Systems mit anderen Signalwegen beschrieben.

### 1.3.2 Die MAP Kinase-Kaskaden

Die MAP (mitogen-activated protein) Kinase-Signalwege stellen ein ursprüngliches Signalweiterleitungssystem dar, das innerhalb der Evolution eukaryotischer Zellen hoch konserviert ist (Kyriakis 1997). Die drei bekanntesten MAP Kinase Kaskaden sind nach den zentralen MAP Kinasen ERK (extracellular signal-regulated kinase), p38 und JNK (c-Jun N-terminal Kinase) benannt. Zu diesen MAP kinase-Gruppen gehören ERK1 und 2, JNK1, 2 und 3 sowie p38 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ . ERK5 wird keiner dieser Gruppen zugeordnet (Chang & Karin 2001).



**Abb. 3: Klassische MAP Kinase Signalwege (nach Herlaar & Brown 1999, Kyriakis & Avruch 2001)**

Jede MAPK-Kaskade ist in 3 Ebenen organisiert (Abb. 3). Die Signalweiterleitung beruht auf einer Abfolge von Phosphorylierungsschritten. So werden die MAP Kinasen selbst durch duale Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosinresten in dem Motiv Thr-x-Tyr von den vorgeschalteten MAPK Kinasen (MAPKK) aktiviert. Die MAPK Kinasen der ERK-Kaskade werden als MEK1/2 bezeichnet, für JNK und p38 sind MKK3/6 sowie MKK4 und MKK7 bekannt (Herlaar & Brown 1999, Hagemann & Blank 2001). Während die Anzahl der MAPKK relativ überschaubar ist, gibt es eine Vielzahl von Kinasen auf

MAPKKK Ebene (Kyriakis & Avruch 2001). Am besten untersucht ist die Kaskade von ERK. Hier sind als MAPKKK die Mitglieder der Raf-Familie zu nennen (c-Raf, B-Raf und A-Raf), wobei c-Raf als klassische MAPKKK für ERK beschrieben wird (Hagemann & Rapp 1999). Man nimmt an, daß sowohl B-Raf als auch c-Raf in myeloiden und lymphoiden haematopoetischen Zellen an der Regulation von Proliferation und Differenzierung beteiligt sind (Eychene et al. 1995). Raf-Moleküle besitzen ein komplexes System von aktivierenden und deaktivierenden Phosphorylierungsstellen. Die Aktivität von Raf wird durch eine Reihe von Proteinkinasen und Phosphatasen (PP2A) kontrolliert (Kolch 2000, Chong et al. 2001, Dhillon & Kolch 2002). Neben den Kinasen der Raf-Familie fanden Zhang et al. (2000) in dendritischen Zellen ein Protein, DPK (dendritic cell-derived protein kinase), das sowohl an der Aktivierung von ERK1/2 als auch JNK beteiligt ist und den MAPKKK zugeordnet wird.

Die Organisation in Kaskaden mit mehreren Ebenen erlaubt nicht nur die Weiterleitung von Signalen sondern auch die Koordination von Informationen, die Signalverstärkung, die Bildung von Schwellenwerten, die Kontrolle der subzellulären Lokalisation sowie eine Vielzahl von Inaktivierungsmechanismen (Cobb 1999, Chang & Karin 2001).

Die MAP Kinasen selbst sind Serin-Threonin-Kinasen. Aktivierte MAPK können in den Zellkern einwandern und sind an der Regulation verschiedener Transkriptionsfaktoren beteiligt wie z.B. c-Jun (+c-fos = AP-1), Elk-1, ATF-2 (Raingeaud et al. 1996). Eine wichtige Rolle spielen MAP Kinasen beispielsweise bei der Expression von Cytokinen wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-12p40 sowie Chemokinen wie IL-8 (Aicher et al. 1999, Hippenstiel et al. 2000, Kurosawa et al. 2000, Zhang & Kaplan 2000, Arrighi et al. 2001).

Nur ein Teil der aktivierten MAPK jedoch wandert in den Zellkern ein, der Rest verbleibt im Cytoplasma und anderen subzellulären Kompartimenten. Zu den Aufgaben im Cytoplasma gehört die Stabilisierung von mRNA, die Aktivierung von MAP Kinase-aktivierten Protein Kinasen (z.B. MAPKAPK-2) und Hitzeschockproteinen sowie die Reorganisation des Cytoskeletts (Cuenda et al. 1995, Raingeaud et al. 1995, Herlaar &



Brown 1999, Brook et al. 2000, Lee et al. 2001, Hagemann & Blank 2001, Andoh et al. 2002, Esnault & Malter 2002).

Die Diversität der Kinasen mit MAPKKK-Aktivität spiegelt die Spannweite von extrazellulären Stimuli wider, die MAPK-Netzwerke aktivieren können (Kyriakis 1997). JNK und p38 werden vor allem mit Streß-assoziierten Reaktionen in Verbindung gebracht. Sie können durch UV-Strahlung, Hitzeschock, oxidativen Streß und osmotischen Schock, aber auch durch einige proinflammatorische Cytokine aktiviert werden (Kyriakis 1997, Heerlar & Brown 1999). ERK dagegen wird hauptsächlich durch Wachstumsfaktoren sowie durch einige Cytokine und durch Phorbol-Ester stimuliert (Dong et al. 2002).

Während die Komponenten der Kern-Kaskaden relativ gut bekannt sind, ist vergleichbar wenig bekannt darüber, wie diese mit den Geschehen an der Zellmembran verknüpft sind (Kyriakis 1997). An der Signalweiterleitung von der Zellmembran bzw. den spezifischen Rezeptoren zu den MAPK-Kaskaden können eine Reihe von Signaltransduktionselementen beteiligt sein. In den folgenden Abschnitten sollen einige davon kurz vorgestellt werden.

### 1.3.3 Frühe Signaltransduktionselemente

Die meisten Stimuli setzen die intrazelluläre Signalweiterleitung durch die Aktivierung von spezifischen **Rezeptoren** in der Zellmembran in Gang. Die chemische Information, die an der Zelloberfläche über Hormone, Cytokine oder Neurotransmitter eintrifft, wird von spezifischen Transmembran-Rezeptorproteinen erkannt. Die Bindung von Agonisten verursacht eine strukturelle Veränderung des intrazellulären Bereichs des Rezeptors. Die Signalweiterleitung erfolgt über eine Reihe von Mechanismen. Dazu zählen Konformationsänderung durch Ligandenbindung, Zusammenlagerung von aktivierten Rezeptormonomeren, Autophosphorylierung intrazellulärer Ketten sowie Phosphorylierung von Effektormolekülen und die Assoziation von Signalmolekülen zu aktivierten Rezeptorkomplexen. Die Informationsweiterleitung über eine Folge von weiteren Reaktionen ermöglicht die Modifikation oder Integration verschiedener Signale. Ausnahme sind Steroid-, Thyroid- und Retinsäure-Rezeptoren, die ihre Agonisten im Zellinnern binden und direkt auf das eigentliche Zielmolekül einwirken (Michal 1999).

Ein häufiges frühes Ereignis der Signaltransduktion ist der Anstieg der intrazellulären **Tyrosinphosphorylierung**. Dieser Schritt kann schon durch die **Rezeptoren** selbst erfolgen durch Rezeptoren mit intrinsischer Kinase-Aktivität (Rezeptortyrosinkinasen) wie z.B. dem EGF-Rezeptor oder durch Assoziation von Tyrosinkinasen an den intrazellulären Teil eines Rezeptors wie bei B- und T-Zell-Rezeptor-Komplexen. Man unterscheidet zwei wichtige Familien von Protein-Tyrosin-Kinasen, die für die Signalweiterleitung dieser Rezeptoren verantwortlich sind: Die src-Familie umfaßt sieben Mitglieder (Src, Hck, Lck, Lyn, Fyn, Yes und Blk) mit gemeinsamer Grundstruktur (Sicheri et al. 1997, Xu et al. 1997). Die zweite wichtige Familie der Rezeptor-gekoppelten Tyrosinkinasen sind die Janus-Kinasen JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2 (Schindler & Darnell 1995), die die Aktivierung von STAT-Molekülen vermitteln (siehe 1.3.1).

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bilden eine weitere Gruppe von Rezeptoren. **G-Proteine** (Guanin-Nukleotid-Binde-Proteine) oder GTPasen spielen eine zentrale Rolle bei der Umsetzung von rezeptorvermittelten Signalen und der Weiterleitung zu verschiedenen Signalwegen. G-Proteine sind durch die Fähigkeit charakterisiert, GTP zu binden und im Laufe ihrer Aktivierung unter Freisetzung eines Phosphatrestes zu GDP zu hydrolysieren. Sie besitzen intrinsische GTPase Aktivität. Der aktive Zustand von G-Proteinen ist durch die Bindung von GTP gekennzeichnet. Aktivierte G-Proteine sind in der Lage über Effektor-Moleküle verschiedene Signalwege in Gang zu setzen. (Henning & Cantrell 1998, Gutkind 1998). Man unterscheidet drei Familien von G-Proteinen: heterotrimere G-Proteine, heterodimere G-Proteine und kleine G-Proteine.

**Heterotrimere G-Proteine** bestehen aus 3 Untereinheiten:  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ .  $G\alpha$  bildet die Guanin-Nukleotid-bindende Untereinheit. Im inaktiven Zustand, solange  $G\alpha$  GDP bindet, liegen  $G\alpha$  und  $G\beta\gamma$  assoziiert vor. Der inaktive  $G\alpha\beta\gamma$ -Komplex assoziiert an die intrazelluläre Domäne eines aktivierten Rezeptors. Nun kann GDP freigesetzt und gegen GTP ausgetauscht werden. Die  $G\alpha$ - und  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten trennen sich und dissoziieren vom Rezeptor. Beide G-Protein-Untereinheiten wirken als Aktivatoren oder Inhibitoren auf verschiedene Zellbestandteile. Man unterscheidet vier Gruppen von  $G\alpha$ -Untereinheiten:

$G\alpha_q$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_s$  und  $G\alpha_{12}$ , die verschiedene Signalmechanismen in der Zelle beeinflussen wie z.B. die Adenylatzyklase, kleine G-Proteine, Phospholipasen und src-Kinasen (Gutkind 1998, 2000, Liebmann 2001).

Weniger bekannt ist über die Familie der **heterodimeren G-Proteine**. Sie bestehen aus einer  $G\alpha$ - und einer  $G\beta$ -Untereinheit. Auch die Untereinheiten heterodimerer G-Proteine dissoziieren nach GTP-Bindung und sowohl  $G\alpha$  als auch  $G\beta$  können an der Signalweiterleitung beteiligt sein. Zu den heterodimeren G-Proteinen zählt die Gewebstransglutaminase (tTG), ein  $G_h$ -Protein. Neben der G-Protein-Funktion besitzt die tTG auch enzymatische Transamidase-Aktivität (Folk 1980). Die tTG wird mit der Aktivierung der Phospholipase C durch den  $\alpha_1$ -adrenergen Rezeptor in Verbindung gebracht (Nakaoka et al. 1994, Gill et al. 1998). Adrenerge Rezeptoren gehören zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Franke et al, 1992, Wong & Ross, 1994).

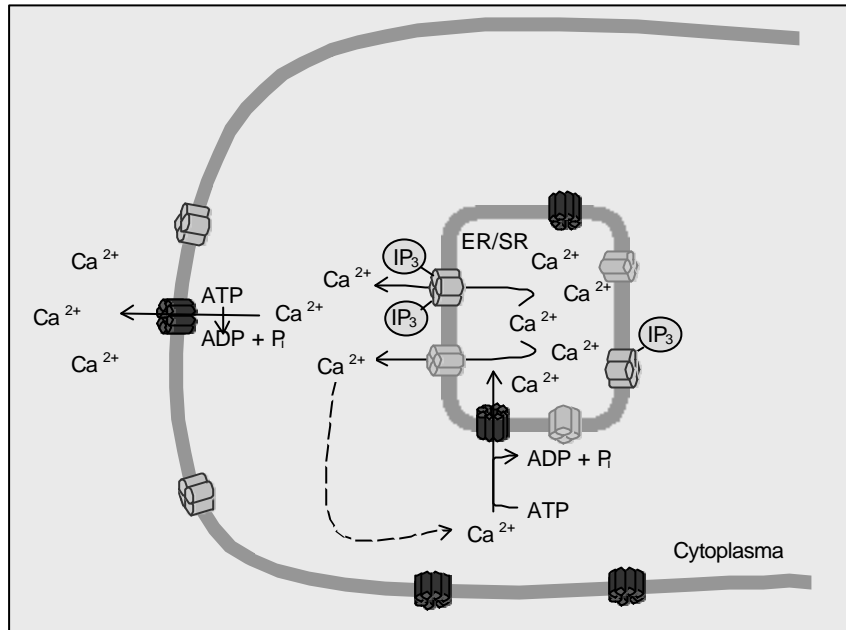
Zu den Effektoren heterotrimerer G-Proteine zählen u.a. **kleine G-Proteine**, deren Aktivität ebenfalls auf der Bindung und Hydrolyse von GTP beruht. Dazu zählen die GTPasen der Ras- und Rho-Familien, welche aus nur einer Untereinheit bestehen. Sie werden in Folge der Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen aktiviert (Rap über  $G\alpha_s$ ) oder sind über eine Reihe von Adaptermolekülen (z.B. Shc, Grb2) mit Rezeptoren in der Zellmembran verknüpft. Den kleinen G-Proteinen ist gemeinsam, daß sie auf Guanin Nukleotid Austauschfaktoren (z. B. SOS) angewiesen sind (Satoh et al. 1992, Henning & Cantrell 1998, Peterson et al. 1998).

Ein weiteres Grundprinzip der Signaltransduktion ist die Amplifikation des ursprünglichen Stimulus durch die Bildung von kleinen zytoplasmatischen Signalmolekülen, den sogenannten „second Messenger“ Molekülen. Dazu zählen zyklisches AMP (cAMP), zyklisches GMP (cGMP), Stickstoffmonoxid (NO), Inositol-3-Phosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerin (DAG). Gebildet wird cAMP aus ATP durch das integrale Membranprotein Adenylatzyklase, dessen Aktivität durch heterotrimere G-Proteine reguliert wird (Gutkind 2000).

Auch **Calcium-Ionen** gehören zu den second messenger Molekülen. Die Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration ist ein vielseitiger Signalmechanismus und an einer Reihe von zellulären Vorgängen beteiligt wie z.B. Proliferation, Differenzierung, Sekretion und Kontraktion (Røttingen & Iversen 2000). Während Calcium lange Zeit in erster Linie mit der Erregungsleitung und Aktivierung von Muskel- und Nervenzellen in Verbindung gebracht wurde, konnte die Rolle von Calcium als Signalmolekül 1983 durch Entdeckung der IP<sub>3</sub> vermittelten Calcium-Mobilisierung aus intrazellulären Speichern bewiesen werden (Streb et al. 1983). Die Signalwirkung von Calcium beruht darauf, daß die Calciumkonzentration im Cytosol im Vergleich zum extrazellulären Raum stark reduziert ist. Die Calcium-Konzentration liegt im Cytosol bei nur 100nM im Vergleich zu etwa 1mM extrazellulär (Røttingen & Iversen 2000). Das endoplasmatische Reticulum, das sarcoplasmatische Reticulum in Muskelzellen und die Mitochondrien dienen als intrazelluläre Calciumspeicher, in denen die Calcium-Konzentration durch Calcium-Pumpen deutlich über der des Cytoplasmas gehalten wird.

Verschiedene Stimuli bewirken die Öffnung von Calcium-Kanälen (IP<sub>3</sub>-Rezeptor-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, Ryanodin-Rezeptor-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, Spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle) in der Cytoplasma-Membran und/oder den Membranen der intrazellulären Speicher (Nadif Kasri et al. 2002) (Abb. 4).

Dadurch kommt es zum Calcium Einstrom in das Cytoplasma und zum Anstieg der cytoplasmatischen Calcium Konzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Dieses Calcium-Signal wird durch Calcium-bindende Proteine, die als Calcium-Sensoren fungieren, in biochemische und zelluläre Signale umgesetzt (Ikura 1996, Agell et al. 2002).



**Abb. 4: Mechanismen der Calcium-Mobilisierung** (nach Michal 1999)  
ER/SR: Endo-/Sarcoplasmatisches Retikulum, IP<sub>3</sub>: Inositol (1,4,5)-P<sub>3</sub>

Es werden drei Gruppen von Calcium-bindenden Proteinen beschrieben: **Calcium-Speicherproteine** wie Calsequestrin und Calreticulin, die vor allem im Endo- oder Sarcoplasmatischen Retikulum eine Rolle spielen, **EF-Hand-Motiv-haltige Proteine** wie z.B. Calmodulin und **Calcium-Phospholipid-bindende Proteine** wie z.B. Annexin oder Proteinkinase C (PKC). Proteine der letzteren Gruppe binden Phospholipide in Calcium-abhängiger Weise und ermöglichen dadurch ihre Translokation an die Membran bei Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration (Røttingen & Iversen 2000).

**Calcium-Calmodulin** ist das am besten untersuchte Calcium-Sensor-Molekül und wird in allen eukariotischen Zellen exprimiert. Calmodulin ist ein kleines hoch konserviertes Protein von etwa 16kDalton. Es ist in der Lage über EF-Motive (Helix-Loop-Helix) vier Calcium-Moleküle zu binden (Chin & Means 2000). Durch die Bindung verändert sich die Konformation derart, daß hydrophobe Bereiche des Proteins freigelegt werden, die mit Calmodulin-bindenden Proteinen interagieren können. Über Calmodulin-bindende Proteine (CaMBP) werden viele Aspekte der Zell-Regulation beeinflusst (Agell et al. 2002). Zu den CaMBP gehören z.B. die CaM-abhängige Guanylat-Cyclase, CaM-abhängige Adenylat-Cyclase, Stickoxid-Synthase (NO-Synthase), Calcineurin (CaM-abhängige Protein-Phosphatase 2B) und auch eine Reihe von Proteinkinasen, die CaM-abhängigen Protein

Kinasen I-V (CaMKI-V). Weiterhin ist Calmodulin an der Beendigung des Calciumsignals durch die Aktivierung von Calcium-Pumpen beteiligt (Klee et al. 1998, Soderling 1999, Santini et al. 2001). Durch den Einsatz von Calmodulin-Antagonisten konnte gezeigt werden, daß Calmodulin eine wichtige Rolle bei der Calcium-abhängigen Aktivierung von MAP Kinase-Signalwegen und bei der Differenzierung von myeloiden Zellen spielt (Lee et al. 2000, Koski et al. 1999).

Neben der Vermittlung durch Calcium-Sensoren wie Calmodulin kann Calcium auch direkt auf verschiedene Bestandteile von Signaltransduktionskaskaden einwirken. Dazu zählt die **Proteinkinase C**, eine durch Calcium aktivierte Phospholipid-abhängige Serin-Threonin-Kinase (Mitev & Miteva 1999).

Proteinkinase C gehört zur Proteinkinase-Superfamilie und ist nah verwandt mit den Proteinkinase A und Proteinkinase B (auch als AKT bezeichnet). Die **ABC-Kinasen** haben eine konservierte Kinase-Domäne gemeinsam, die allosterisch durch eine regulatorische Domäne kontrolliert wird. Diese regulatorische Domäne hat zwei Funktionen: Sie bestimmt die zelluläre Lokalisation und sie reguliert die Kinase Aktivität durch sterische Blockade des aktiven Zentrums (Pseudosubstrat-Sequenz bei PKC und PKA). Die Bindung von spezifischen Cofaktoren (cAMP für PKA, PIP<sub>3</sub> für PKB, DAG für PKC) führt zur Änderung der Konformation und ermöglichen die Bindung und Phosphorylierung des Substrats.

Die PKC-Familie umfaßt 10 bekannte Isoformen, die in 3 Gruppen eingeteilt werden:

Klassische PKC (cPKC): PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$

Neue PKC (nPKC): PKC  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$

Atypische PKC (aPKC): PKC  $\zeta$ ,  $\iota/\lambda$ .

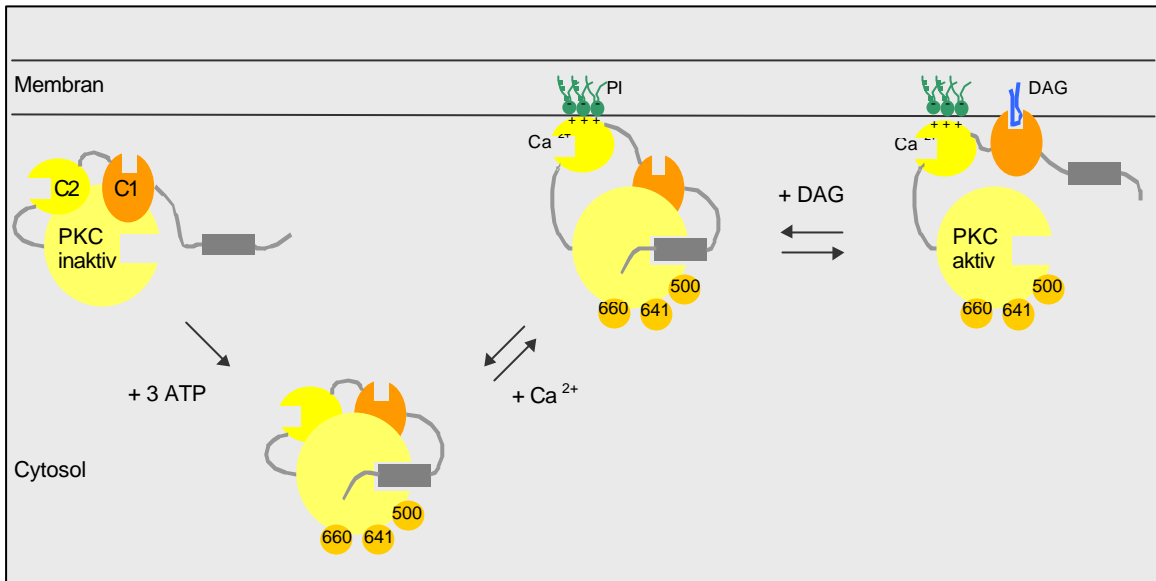
Dazu kommen die neu beschriebenen Isoformen PKC  $\mu$  und  $\nu$  (Dempsey et al. 2000).

Die drei Untergruppen unterscheiden sich im Hinblick auf ihre regulatorische Untereinheit. So ist die Aktivierung der klassischen PKC-Isoformen von Calcium und von Diacylglycerin abhängig, die der neuen PKC-Isoformen dagegen lediglich von DAG. Die atypischen PKC-Isoformen sind unabhängig von Calcium und Diacylglycerin (Newton 2001).

Eine Vielzahl von Signalen führt zur Aktivierung der PKC durch die Produktion von second messengern und verschiedene Signaltransduktionsmechanismen können zur Bildung von Diacylglycerol, dem Aktivator der PKC, führen. Die Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, Tyrosin-Kinase Rezeptoren oder nicht Rezeptor-Tyrosinkinasen kann die Bildung von DAG bewirken, das entweder schnell über Phospholipase C (PLC) oder langsamer durch Phospholipase D (PLD) gebildet wird. (Newton 1995, Melendez & Allen 2002).

Die Aktivität der Proteinkinase C wird durch mehrere Mechanismen reguliert. Dazu zählen Phosphorylierung, second messenger und die Lokalisierung innerhalb der Zelle. Im Folgenden wird beispielhaft für konventionelle PKCs die Aktivierung der Proteinkinase C - Isoform PKC $\beta$ II dargestellt (Abb. 5).

Neu synthetisierte PKC assoziiert lose an die Membran. Eine Abfolge von drei Phosphorylierungsschritten ist Voraussetzung für die Aktivierbarkeit der Kinase (Keranen et al. 1995). Eine erste Phosphorylierung, bei PKC  $\beta$ II an Thr 500 („activation loop phosphorylation“) durch PDK-1 (3-phosphoinositid-dependent kinase-1), läßt die Kinase katalytisch kompetent werden. Zwei Autophosphorylierungsschritte – bei PKC $\beta$ II an Thr641 und Ser660 – dienen der Stabilisierung der aktivierbaren Konformation und führen zur Translokation ins Cytosol. Die dreifach phosphorylierte Form stellt die „reife“ Form der PKC dar. Diese ist jedoch weiterhin inaktiv, da das Pseudosubstrat die Substratbindungsstelle blockiert.



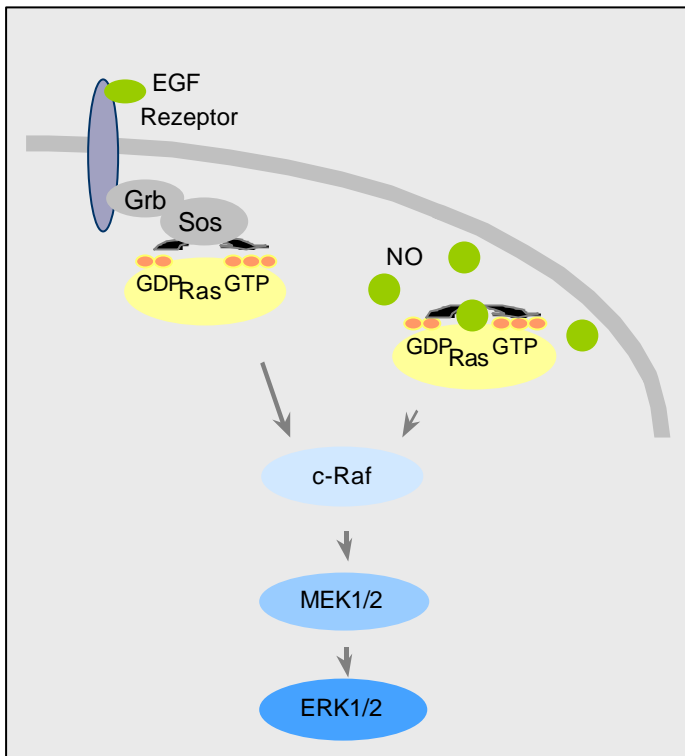
**Abb. 5: Modell der Aktivierung der Proteinkinase C am Beispiel der cPKC bII,**  
nach Newton 2003, 1995; PI: Phosphatidylserin, DAG: Diacylglycerin

Die Bindung von Calcium an die C2 Domäne der regulatorischen Untereinheit erhöht die Affinität der PKC für negativ geladene Lipide (Phosphatidylserin) und führt zur Translokation an die Membran. Diacylglycerin dient als hydrophober Anker und ermöglicht eine stabile Assoziation mit der Membran. Durch einen Anstieg der Calcium Konzentration und Generation von DAG wird PKC an die Membran rekrutiert und gebunden. Die Membran-Interaktion liefert die Energie zur Freisetzung des Pseudosubstrates und ermöglicht die Bindung und Phosphorylierung nachgeschalteter Signalmoleküle (Newton 1995, 1997, 2001, 2003, Dempsey et al. 2000).

### 1.3.4 Modelle der ERK-Aktivierung

Alle der im vorhergehenden Kapitel beschriebenen frühen Signaltransduktionsmechanismen sind an der Aktivierung von MAP Kinasen durch verschiedene Stimuli beteiligt. Welche Mechanismen bei der Aktivierung von ERK eine Rolle spielen, ist abhängig vom Stimulus selbst, von der Beteiligung spezifischer Rezeptoren und von der zelltypspezifischen und differenzierungsabhängigen Expression der Signaltransduktionskomponenten. Im Folgenden sollen kurz einige Beispiele der ERK-Aktivierung vorgestellt werden.





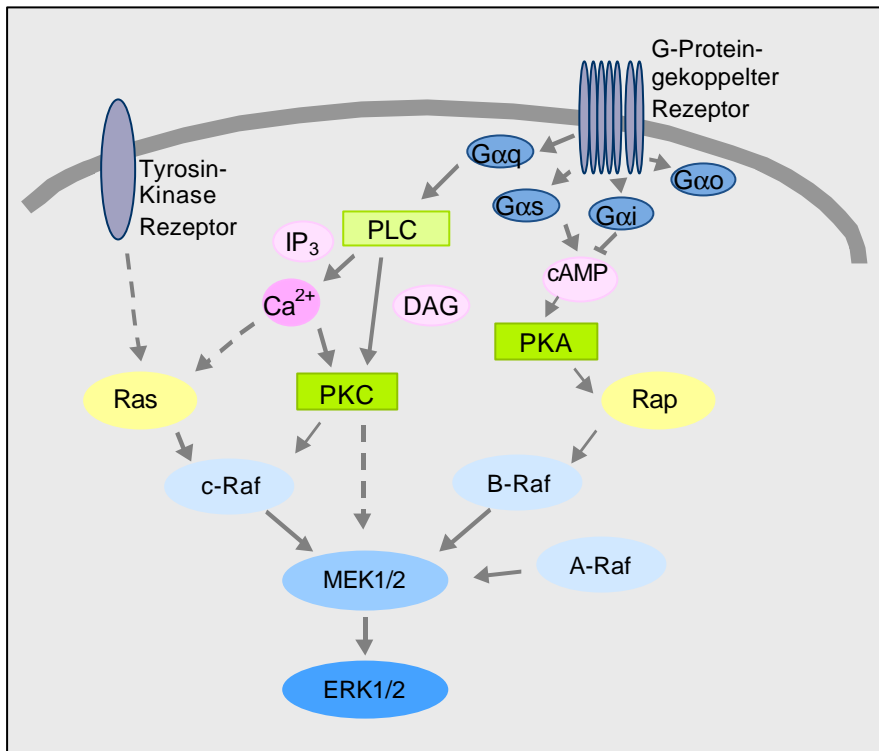
**Abb. 6: Aktivierung der Ras/c-Raf/MEK/ERK-Kaskade durch EGF oder NO** (nach Deora et al. 2000, Liebmann 2001)

Der klassische Weg der ERK-Aktivierung durch Wachstumsfaktoren wie EGF (Epidermal Growth Factor) wird über das kleine G-Protein Ras vermittelt (Abb. 6). Die Bindung eines Liganden führt zu Aktivierung und Autophosphorylierung von Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität. Daraufhin assoziieren das Adapterprotein Grb und der Guanin-Nukleotidaustauschfaktor

Sos an den intrazellulären Teil des Rezeptors. Es kommt zur Aktivierung von Ras, Rekrutierung von c-Raf an die Plasmamembran und schließlich zur Aktivierung von MEK1/2 und ERK (Daub et al. 1994, Kyriakis 1997, Hagemann & Blank 2001, Liebman 2001).

Neben der Rezeptor-vermittelten Aktivierung des Ras/c-Raf/MEK/ERK Signalweges wurde von Deora et al. (2000) die Rezeptor-unabhängige Aktivierung durch den second messenger Stickstoffmonoxid (NO) beschrieben. Dieser Mechanismus ist in Abbildung 6 dargestellt. Die Aktivierung von ERK durch NO erfolgt über die Bindung von NO an einen Cysteinrest (Cys<sup>118</sup>) von Ras. Dadurch wird der Austausch von GDP zu GTP unabhängig von Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren und die Aktivierung von Ras ausgelöst. Über c-Raf und MEK1/2 kommt es zur Phosphorylierung von ERK1/2 (Lander et al. 1995, 1997, Lander 1996, Deora et al. 2000).

Neben der klassischen Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade wurden viele alternative Wege der ERK-Aktivierung beschrieben. In Abbildung 7 sind einige Mechanismen zusammengefasst, die zur Aktivierung der MAP Kinase ERK führen können.



**Abb. 7: ERK-Aktivierung durch Tyrosinkinase- oder G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren**  
(nach Gutkind 2000, 1998)

Über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren werden Signale durch verschiedene  $G\alpha$  - Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine weitergegeben.  $G\alpha_q$  kontrolliert die Aktivität von Phosphatidylinositol spezifischen Phospholipasen z.B. Phospholipase C (PLC), welche Phosphatidyl 4,5-bisphosphat zu den second messengern  $IP_3$  und DAG hydrolysiert (Rhee & Bae 1997). Dadurch wird über Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern u.a. die Proteinkinase C aktiviert (Gutkind 2000). Verschiedene Proteinkinase C-Isoformen können entweder über c-Raf oder MEK1/2 in die ERK-Kaskade eingreifen (Cai et al. 1997, Schonwasser et al. 1998, Bhalla & Iyengar 1999).  $G\alpha_s$  und  $G\alpha_i$  kontrollieren durch die Adenylatzyklase die intrazelluläre cAMP Konzentration. Zyklisches AMP ist ein Cofaktor der Proteinkinase A, deren Aktivität über das kleine G-Protein Rap und B-Raf Einfluß auf ERK hat (Schmitt & Stork 2000, Liebmann 2001). Auch  $G\beta\gamma$  Untereinheiten sind an der Aktivierung von MAP Kinasen durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren beteiligt. Durch  $G\beta\gamma$ ,  $G\alpha_i$  oder  $G\alpha_q$  werden Signale von G-Protein gekoppelten Rezeptoren durch src-Kinasen über den klassischen Ras-Raf-MEK-ERK-Weg

weitergeleitet. Dabei kommt es auch zur Transaktivierung von Rezeptortyrosinkinasen beispielsweise des EGF-Rezeptors (Gutkind 1998, Liebmann 2001, Daub et al. 1997).

Bei der Analyse spezifischer Signaltransduktionsmechanismen ist zu bedenken, daß alle geschilderten Signalwege Bestandteil von intrazellulären Protein-Netzwerken sind. Durch diese Vernetzungen werden Verbindungen zwischen verschiedenen Signalwegen ermöglicht, welche die Integration, Verstärkung oder auch Abschwächung von Signalen bewirken. Um komplexe zelluläre Funktionen zu verstehen, ist es wichtig, die Eigenschaften und Möglichkeiten von Signalnetzwerken zu identifizieren (Bhalla & Iyengar 1999, Jordan et al. 2000).

### **1.3.5 Kontaktallergene und Signaltransduktion**

Welche Signalwege durch Kontaktallergene aktiviert werden, ist bislang wenig untersucht. In Langerhanszellen wurde eine erhöhte Rezeptor-vermittelte Endocytose von Membranzellen (Becker 1992, 1995) nach Stimulation mit Kontaktallergenen beschrieben. Kühn et al. (1998) beobachtete in MCH II-positiven Zellen verstärkte Tyrosinphosphorylierung. Die Aktivierung von MAP Kinasen durch Kontaktallergene konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden. Arrighi et al. (2001) konnten nachweisen, daß die MAP Kinase in unreifen dendritischen Zellen durch Stimulation mit den Kontaktallergenen Nickel ( $\text{NiSO}_4$ ) und DNFB aktiviert wird. In Monocyten wurde die Aktivierung und Translokation von p38 und des Transkriptionsfaktors Elk-1 nach Stimulation mit MCI/MI, Thiomersal, Formaldehyd und DNFB beobachtet (Brand et al. 2002). Weitere Arbeiten haben gezeigt, daß das experimentelle Kontaktallergen TNCB an das heterodimere G-Protein Gewebstransglutaminase koppeln kann, welches mit der Aktivierung von ERK in Zusammenhang gebracht wird (Zahn 2002).

Sowohl die Entwicklung einer Hypersensibilisierungsreaktion durch TNCB in Mäusen als auch die Aktivierung von humanen Monocyten und dendritischen Zellen (Tyrosinphosphorylierung und ERK-Aktivierung) kann durch die Präinkubation mit Cystein bzw. N-Acetylcystein signifikant vermindert werden (Senaldi 1994, Bruchhausen 2003). Für die Aktivierung von Monocyten und dendritischen Zellen und für die Sensibilisierung im murinen Modell ist die Thiolgruppen-Spezifität von Haptenen

essentiell (Becker et al. 2003). Die Bedeutung der MAP Kinase p38 für die Kontaktallergie wurde von Takanami-Ohnishi et al. (2002) untersucht. Es stellte sich heraus, daß p38 eine wichtige Rolle in der Auslösephase der Kontaktallergie spielt durch die Regulation der lokalen Cytokin- und Chemokin-Produktion.

## 1.4 Zielsetzung

Antigen-präsentierende Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Kontaktallergie. Es ist wenig bekannt über die molekularen Mechanismen, die an der Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen durch Kontaktallergene beteiligt sind. Ziel dieser Arbeit war es, frühe Signaltransduktionselemente zu ermitteln, die von Kontaktallergenen in Antigen-präsentierenden Zellen aktiviert werden.

- Da Langerhans-Zellen, die wichtigsten Antigen-präsentierenden Zellen der Haut, nur in geringen Mengen aus der Epidermis gewonnen werden können, sollten humane Monocyten und aus Monocyten generierte dendritische Zellen als Modell für epidermale Antigen-präsentierende Zellen eingesetzt werden. Die funktionelle Bedeutung der Aktivierung von dendritischen Zellen als Modellzellen durch Kontaktallergene sollte durch die Darstellung des **Cytokinprofils** nach Stimulation mit Kontaktallergenen überprüft werden.
- Ausgehend von der Bedeutung von Cytokinen für die Differenzierung von myeloiden Zellen stellte sich die Frage, ob die Stimulation von dendritischen Zellen mit Kontaktallergenen die Aktivierung von Cytokin-Rezeptor-assoziierten Signalwegen bewirkt. Um diese Frage zu klären, sollte die Aktivierung der **STAT** Moleküle STAT1, STAT3, STAT4, STAT5 und STAT6 durch verschiedene Kontaktallergene überprüft werden.
- Die Aktivierung von **MAP Kinasen** durch verschiedene Kontaktallergene wurde bereits beschrieben. Die Aktivierung von ERK und p38 durch die Kontaktallergene MCI/MI, TNCB, Thiomersal und Formaldehyd sollte in unserem Modell-System charakterisiert werden.
- Daraufhin sollte ermittelt werden, welche **upstream-Elemente** an der Aktivierung der MAP Kinase ERK durch Kontaktallergene beteiligt sind. Ein wesentlicher Aspekt war die Zusammenstellung der Signalmechanismen, die in verschiedenen Zelltypen durch unterschiedliche Stimuli zur Aktivierung der MAP Kinase ERK beitragen (s.1.3). Ausgewählte Signaltransduktionselemente sollten entweder auf ihre Aktivierung hin

untersucht oder durch Inhibitoren gezielt ausgeschaltet werden. Zuerst sollten die zur ERK-core-Kaskade zählenden Kinasen MEK1/2 und c-Raf untersucht werden. Interessant war weiterhin die Aktivierung von Ras als erstem Element des klassischen **Ras/c-Raf/MEK/ERK-Weges**. Durch den Einsatz von Inhibitoren sollte die Beteiligung der PI<sub>3</sub>-Kinase geklärt werden.

- Viele Signalwege, die zu ERK-Aktivierung führen, werden als Calcium-abhängig beschrieben. Daher sollte die Rolle des second messengers **Calcium** geklärt werden. Zentrale Fragen dieses Kapitels waren, ob Calcium für die Aktivierung von ERK erforderlich ist, ob es zu einer Calcium-Mobilisierung durch Kontaktallergene kommt und ob Calcium-abhängige Signalelemente identifiziert werden können, die die Aktivierung von ERK durch Kontaktallergene vermitteln.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

- Elektrophorese-Kammer: für SDS-PAGE, Fa. Phase
- Eppendorffzentrifuge, Biofuge fresco, Fa. Heraeus
- FACScalibur, Fa. Becton Dickinson
- Fluoreszenzmikroskop für Cytochemie, Diaplan, Fa. Leica
- Laborzentrifuge, Megafuge 10, Fa. Heraeus
- Megafuge 1.0R, Fa. Heraeus
- Semi Dry Blotapparatur, Trans-Blot SD, Fa. Bio-Rad
- Mikroskop für Calcium-Messung, IMT-1, Olympus
- FACS Calibur, Becton Dickinson

#### 2.1.2 Reaktionsgefäße und Materialien

- 6-Wellplatten, Fa. Greiner
- 24-Wellplatten, Fa. Greiner
- 96-Wellplatten, Fa. Greiner
- Eppendorffreaktionsgefäße, Fa. Eppendorf
- FACS-Röhrchen, Fa. Becton Dickinson
- Gewebekulturschalen 150 cm<sup>2</sup>, Fa. Greiner
- Polyvenylidendifluorid (PVDF)-Membran, Immobilon-P, Fa. Millipore
- Filterpapier 3MM, Whatman, Maidstone
- Röntgenfilm, Hyperfilm-ECL, # 1674, Fa. Amersham
- Zentrifugenröhrchen, 15 ml und 50 ml, Fa. Greiner

#### 2.1.3 Chemikalien

##### AMERSHAM

ECL Plus Detektionssystem, # RPN2132

[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-UTP, # PB10203

##### BAYER

Trasylol<sup>®</sup> 500 000 KIE (Aprotinin )

##### BD BIOSCIENCE

RPA, #556134 (#45032P modifiziert)

##### BOEHRINGER

EDTA Natriumsalz, # 808 261

Phenylmethylsulfonylfluorid, # 837 091

##### CALBIOCHEM

Fura-2-AM, # 344905

Protein G PLUS-Agarose, # IP04

##### DAKO

DAKO Fluorescent mounting Medium

##### DIACLONE

Human TNF- $\alpha$  Elispot, PVDF - Enzymatic

##### GIBCO/INVITROGENE

Penicillin-Streptomycin, # 15140,122

##### MERCK

2-Mercaptoethanol, # 15433

di-Na-hydrogenphosphat, # 106586.500

Natriumdodecylsulfat (SDS), # 8.22050

Isopropanol, # 1040.2500

Kaliumchlorid, # 1.04936.0500

Magnesiumchlorid, # 1.05833.0250

Methanol, # 1.06007.2500

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, # 6586.2500

NaHCO<sub>3</sub>, # 6329.0500E  
Natriumacetat, # 1.01539.0500  
Na-dihydrogenphosphat, # 106346.1000  
Natriumhydroxyd-Plätzchen, # 106498  
Salzsäure, # 1.00316.1000  
Tris, # 101549  
Tris/HCl, # 101547.100  
**ROCHE**  
High Pure RNA Isolation Kit, # 1828665  
Leupeptin, #1017101  
**ROTH**  
Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung;  
Rotiphorese Gel 30, # 3029.1  
Ammoniumperoxodisulfat, # 9592  
Ammoniumsulfat, # 9212.1  
Borsäure, # 6843  
Dimethylsulfoxid, # 4720.1  
Glycerin, # 3783.1  
Glycin, # 3908.2  
NaCl, # 3957.2  
Natrium-Hydrogen-Carbonat, # 8551.1  
Saponin, # 9622.1  
TEMED, # 2367  
Urea, # 2317  
**SANTA CRUZ**  
Glutathion-Agarose, # sc-2009  
**SEROMED-BIOCHROM**  
Ficoll Separating Solution 1,077, # L6115  
HEPES, # L1603  
**SIGMA**  
Acrylamid-Bisacrylamid 40% (19:1),  
# A2917  
EGTA, # E4378  
DEPC, # D5758  
Fötale Kälberserum (FCS), # 9605.23  
Na-glycerophosphat (Na<sub>2</sub>C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O<sub>6</sub>), # G6251  
Natrium-Orthovanadat, # S6508  
Natriumpyrophosphat (Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), # S6422  
Natrium-Fluorid (NaF), # S6521  
Pepstatin, # P5318  
Phorbol-Myristat-Acetat (PMA), # P8139  
Tween 20, # P1379  
Prestained SDS MW Marker, # MWM-105A  
Propidium Iodid, # P4170

Rinderserumalbumin (BSA), # A6793  
Triton X-100, # X-100  
**SANDOZ**  
Leucomax<sup>®</sup> 300/GM-CSF  
**STRATHMANN**  
IL-1β, # 9511180  
IL-4, # 9511230  
TNF-α, # 9511510  
**UPJOHN**  
Prostaglandin E<sub>2</sub>  
**UPSTATE**  
c-Raf-IP-Kinase Assay, #17-173  
Ras-Aktivierungs Assay, #17-218



**Tab. 2: Kontaktallergene und sonstige Zellaktivatoren**

<b>Substanz</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Hersteller</b>
MCI/MI (Chlor-/Methylisothiazolon 3:1)	0,01% in H <sub>2</sub> O	Hermal # D0115
Thiomersal	10mg/ml in RPMI	Sigma # T-8784
TNCB	10mg/ml in DMSO	Polyscience
Formaldehyd	5mg/ml in RPMI	Roth # 4979
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	10mM in DMSO	Sigma # P8139
Benzalkoniumchlorid	16mg/ml in RPMI	Sigma # B-1383
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	300mM in RPMI	Roth # 8070

**Tab. 3: Inhibitoren**

<b>Substanz</b>	<b>Inhibition von:</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Hersteller</b>
BAPTA-AM	Ca <sup>2+</sup> -abhängigen Prozessen	50mM in DMSO	Calbiochem # 196419
Calphostin C	PKC	0,5mM in DMSO	Calbiochem # 208725
EGTA	Ca <sup>2+</sup> extrazellulär	0,4M in PBS	Sigma # E-4378
LY294002	PI <sub>3</sub> -Kinase	50mM in DMSO	NEB # 9901
PD 98059	MEK1/2	50mM in DMSO	Calbiochem # 513000
Ro31-8425	PKC $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$	10mM in DMSO	Calbiochem # 557514
SB203580	p38	50mM in DMSO	Calbiochem # 559389
TFP	Ca <sup>2+</sup> -Calmodulin	10mM in DMSO	Calbiochem # 642150
TMB-8	intrazellulärem Ca <sup>2+</sup> -Release	50mM in RPMI	Calbiochem # 613546
W13	Ca <sup>2+</sup> -Calmodulin	5mM in RPMI	Calbiochem # 681636
Wortmannin	PI <sub>3</sub> -Kinase	1mM in DMSO	Calbiochem # 681675

### 2.1.4 Medien

#### RPMI 1640

RPMI 1640 Pulver wurde in 10l Aqua bidest gelöst. Dabei wurden HEPES (15mM), Mercaptoethanol (50nM), Natriumhydrogencarbonat (24mM), Natrium-Pyruvat (1mM) und Penicillin/Streptomycin (100µg/ml) zugegeben. Der pH-Wert wurde überprüft, das Medium sterilfiltriert (Vacu-Top, 500ml, 0,2µm, membraPure, Bodenheim, Deutschland) und bei 4°C gelagert. Für die Kultur und Ausreifung der dendritischen Zellen wurde RPMI mit 5% autologem Serum, GM-CSF, IL-4 bzw. zusätzlich IL-1β, TNF-α und Prostaglandin E<sub>2</sub> versetzt.

#### X-VIVO15

Fertiges Flüssigmedium (Biowhittaker, Walkerville, USA) wurde für das Aliquotieren der Cytokine verwendet.

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

#### PBS

10x PBS, pH7,2

NaCl 1,4M (80,4g/l)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1mM

#### PBS-Heparin

0,25% (v/v) Heparin (Liquemin N25000) in PBS

#### PBS-EDTA

5 mM EDTA in PBS

#### Trypanblau

0,1% (w/v) Trypanblau in PBS

#### Lysepuffer für Western Blot

Hepes	50mM, pH 7,2	Proteaseinhibitoren:	Aprotinin	10µg/ml
NaCl	150mM		PMSF	2mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5mM	Phosphataseinhibitor:	Na-Orthovanadat	2mM
EDTA	1mM			
Glycerol	10% (v/v)			
Triton X-100	1% (v/v) in Aqua dest.			

**Lysepuffer für Ras-Aktivierungs Assay**

HEPES	25mM, pH7,5	Proteaseinhibitoren:	Leupeptin	10µg/ml
NaCl	150mM		Aprotinin	10µg/ml
MgCl <sub>2</sub>	10mM	Phosphataseinhibitor:	Na-Orthovanadat	2mM
EDTA	1mM			
Igepal Ca-630	1%			
Glycerol	2%			

**Lysepuffer für Raf-Kinase-Assay**

Tris	50mM, pH7,5	Proteaseinhibitoren:	Leupeptin	1µg/ml
EDTA	1mM		Aprotinin	1µg/ml
EGTA	1mM		PMSF	0,1mM
Na-Pyrophosphat	5mM		Pepstatin	1µg/ml
Glycerophosphat	10mM	Phosphataseinhibitor:	Na-Orthovanadat	0,5mM
NaF	50mM			
Triton x-100	1%			

Zugabe von 0,1% 2-Mercaptoethanol nach Proteinbestimmung

**Aktiviertes Natrium-Orthovanadat**

Stammlösung: 200mM Natrium-Orthovanadat in PBS gelöst, pH 10

gelbliche Lösung kochen bis sie farblos wird, pH 10 einstellen, Vorgang wiederholen, bis die Lösung bei pH 10 farblos bleibt.

Alle Inhibitoren werden unmittelbar vor Verwendung des Lysepuffers zugegeben.

**Lösungen für Acrylamid-Gele für die SDS-PAGE:****Lösung A**

Tris	3M (366 g/l)
1 N HCl	48% (v/v)
TEMED	0,23% (v/v)

mit entgastem Aqua bidest. ansetzen, pH 8,5

**Lösung D**

1 M Tris-HCl	95,75% (v/v)
20% SDS	4% (v/v)
TEMED	0,25% (v/v)

mit entgastem Aqua bidest. ansetzen

**APS-Lösung**

Ammoniumperoxodisulfat 10% (w/v)

mit entgastem Aqua bidest. ansetzen

**Elektrophorese-Puffer 4-fach**

Tris-HCl	100mM
Glycin	767mM
SDS	13,7mM

in Aqua dest., pH 8,5

**Probenaufbereitungspuffer**

Roti-Load 4x konzentriert, Fa. Roth

**Blot-Puffer**

Roti-Blot A (Anodenpuffer) 10x konzentriert, Fa. Roth

Roti-Blot K (Kathodenpuffer) 10x konzentriert, Fa. Roth

**Waschpuffer: TPBS**

0,1% Tween-20 in PBS

**Blocking Puffer und Puffer für Antikörper**

5% Magermilchpulver in TPBS

**Stripping Puffer**

Tris-HCl	62mM
SDS	2%
2-Mercaptoethanol	100mM

**Reaktionspuffer für Raf-Kinase-Assay (Assay Dilution Buffer ADB I)**

MOPS	20mM, pH7,2	Phosphataseinhibitor: Na-Orthovanadat	1mM
Glycerophosphat	25mM		
EGTA	5mM		
DTT	1mM		

**Puffer für RNase-Protection Assay:****10x TBE**

Tris	0.89M, pH 8,3
Borsäure	0,89M
EDTA	20mM

**DEPC / Aqua dest.**

1ml Diethylpyrocarbonat auf 1l Aqua dest. wird 1h gerührt, 1h bei 37°C inkubiert und anschließend autoklaviert.

**Puffer für Durchflußzytometrie und Fluoreszenzmikroskopie:****Saponin für die Permeabilisierung**

Saponin 0,25% in PBS/1% FCS

**Waschpuffer**

2% FCS in PBS

**PFA-Fixierungslösung**

4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS

**2.1.6 Antikörper**

## 2.1.6.1 Antikörper für die Proteinbiochemie

**Tab. 4: Primärantikörper für die Proteinbiochemie**

<b>Spezifität</b>	<b>Ak-Klasse</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Pospho-STAT1	Kaninchen IgG, polyclonal	1:1000	NEB # 9171
Pospho-STAT3	Kaninchen IgG, polyclonal	1:1000	NEB # 9131
Pospho-STAT4	Kaninchen IgG, polyclonal	1:250	Zymed # 71-7900
Pospho-STAT5a/b	Kaninchen IgG, polyclonal	1:1000	NEB # 9351
Pospho-STAT6	Kaninchen IgG, polyclonal	1:1000	NEB # 9361
Lyn	Kaninchen IgG, polyclonal	1:1000	Santa Cruz # sc-15
Phospho-ERK1/2	Maus IgG2a, monoklonal	1:1000	Santa Cruz # sc-7383
ERK2	Kaninchen IgG, polyclonal	1:1000	Santa Cruz # sc-154
Phospho-p38	Kaninchen IgG, polyclonal	1:1000	NEB # 9211
p38	Kaninchen IgG, polyclonal	1:1000	Santa Cruz # sc-535
Phospho-MEK1/2	Kaninchen IgG, polyclonal	1:1000	NEB # 9121
Ras	Maus IgG2a, monoklonal	1:1000	Upstate # 05-516
Phospho-c-Raf (Ser259)	Kaninchen IgG, polyclonal	1:1000	NEB # 9421
c-Raf für Western Blot	Kaninchen IgG, polyclonal	1:1000	Santa Cruz # sc-133
c-Raf für c-Raf-IP	Schaf IgG, polyclonal	-	Upstate # 06-393
Phospho-PKC $\alpha$ / $\beta$ II	Kaninchen IgG, polyclonal	1:1000	NEB # 9375
Phospho-PKCpan	Kaninchen IgG, polyclonal	1:1000	NEB # 9371
PKC- $\alpha$	Maus IgG2b, monoklonal	1:1000	Santa Cruz # sc-8393
PKC- $\beta$ I	Kaninchen IgG, polyclonal	1:1000	Santa Cruz #sc-209
PKC- $\beta$ II	Kaninchen IgG, polyclonal	1:1000	Santa Cuz #sc-210
PKC- $\gamma$	Kaninchen IgG, polyclonal	1:1000	Santa Cruz # sc-211
Phosphotyrosin, 4G10	Maus IgG2b	1:1000	Upstate, # 05-321
Phospho-AKT	Kaninchen IgG, polyclonal	1:1000	NEB # 9271
Trinitrophenyl	Hamster IgG	1:2000	Pharm./BD # 11121D

**Tab. 5: Sekundärantikörper für die Färbung von Western Blots**

<b>Spezifität</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Ziege anti-Maus IgG (H+L)	HRP	1:5000	Dianova # 115-035-100
Ziege anti-Kaninchen IgG	HRP	1:1000	Santa Cruz # sc-2004
Ziege anti-Hamster IgG	HRP	1:2000	Santa Cruz # sc-2443

### 2.1.6.2 Antikörper für Durchflußzytometrie und Immunhistochemie

**Tab. 6: Primärantikörper für FACS-Färbungen und Immuncytochemie**

<b>Spezifität</b>	<b>Ak-Klasse</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Human CD3 (OKT 3)	Maus IgG2b	1:10	ATCC
Human CD14 (3C10)	Maus IgG2b	1:10	ATCC
Human CD19 (J4.119)	Maus IgG1	1:50	Immunotech # 1313
Human CD 83 (HB15A)	Maus IgG2b	1:100	Immunotech # 2069
Human CD 86 (BU63)	Maus IgG1	1:200	Serotec # MCA 1118
HLA-DR (YE2/36HLK)	Ratte IgG2a	1:10	Serotec # MCA71S
Phosphotyrosin-FITC (PY20)	Maus IgG2b	1:10	Leinco # P113
PKC $\alpha$	Maus	1:200	Santa Cruz # sc-8393
PKC $\beta$ II	Kaninchen IgG	1:200	Santa Cruz # sc-210
P-PKC $\alpha$ / $\beta$ II	Kaninchen IgG	1:200	NEB # 9375
Pospho-STAT3	Kaninchen IgG	1:200	NEB # 9131
Pospho-STAT4	Kaninchen IgG	1:100	Zymed # 71-7900
Isotyp Kanninchen	Kanninchen IgG		Santa Cruz #
Isotyp Maus MKD6	Maus IgG	-	Kulturüberstand
Isotyp Ratte 4F7	Ratte IgG	-	Kulturüberstand

**Tab. 7: Sekundärantikörper für FACS und Immunhistochemie**

<b>Spezifität</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Ziege anti-Maus IgG (H+L)	DTAF	1:150	Dianova # 115-015-100
Ziege anti-Ratte IgG (H+L)	DTAF	1:150	Dianova # 112-015-102
Esel anti-Maus	PE	1:100	Dianova # 715-116-151
Anti-Kaninchen	Rhodamin	1:100	Dianova # 111-295-144
Anti-Kaninchen	DTAF	1:100	Dianova # 111-015-144

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Die Isolation humaner dendritischer Zellen erfolgte aus „Buffy Coat“ Präparationen, die bei der Aufreinigung von Blutkonserven in Blutbanken anfallen. Diese Leukozyten angereicherte Fraktion enthält neben Erythrozyten und Thrombozyten auch mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC, „peripheral blood mononuclear cells“). Die verschiedenen Zellpopulationen lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichten durch Ficoll-Hypaque 1,077 Dichtezentrifugation separieren. Zellen mit einer Dichte über 1,077g/ml, wie z.B. Erythrozyten, Neutrophile, Eosinophile und Basophile, befinden sich nach diesem Zentrifugationsschritt unterhalb der Ficoll-Schicht, während PBMC und Thrombozyten als Interphase auf der Ficoll-Schicht aufliegen. Zur weiteren Aufreinigung der PBMC wurde die Interphase abgenommen und die Thrombozyten durch mehrfaches Waschen entfernt.

In sterile Zentrifugenröhrchen wurde 20ml PBS/Heparin vorgelegt und mit 20ml „Buffy Coat“ Blut vermischt. Danach wurde das Heparin-Blut mit 10ml Ficoll-Hypaque 1.077 Lösung unterschichtet. Nach Dichtezentrifugation (20min, 900g, RT, ohne Bremse) wurde das Serum/Plasma abgenommen, hitzeinaktiviert (45min, 56°C), durch hochoourige Zentrifugation (1630xg, 10min, RT) von ausgefallten Proteinen befreit und für die Kultivierung der Monozyten und DC aufbewahrt (siehe 3.1.2, 3.1.3).

Die Interphase wurde in neue Zentrifugenröhrchen abgenommen und auf 50ml mit PBS aufgefüllt. Die PBMC wurden pelletiert (5min, 654xg, 4°C) und der thrombozytenhaltige Überstand entfernt. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt (5min, 523xg, 4°C und 5min, 400xg, 4°C). Die isolierten PBMC wurden in RPMI mit 3% autologem Plasma resuspendiert und gezählt.

### 2.2.2 Anreicherung von Monozyten aus PBMC

Um die Monozyten zu separieren, wurde ihre Adhärenzfähigkeit auf Polystyrol-Platten ausgenutzt. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  der aufgereinigten PBMC pro  $\text{cm}^2$  in Gewebekulturschalen ( $150\text{cm}^2$ ) pipettiert und 45min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die

nicht-adhärenenten Zellen durch mehrfaches, vorsichtiges Abspülen mit vorgewärmten PBS (37°C) entfernt. Um ein möglichst schonendes Ablösen der Monozyten aus den Kulturschalen zu erreichen, wurden die Monozyten über Nacht in autologem Plasma/RPMI (1:1) kultiviert.

### **2.2.3 Anreicherung von dendritischen Zellen aus PBMC**

Um die DC zu separieren wurden  $12 \times 10^6$  /well der aufgereinigten PBMC in 6-well-Platten pipettiert und 45min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die nicht-adhärenenten Zellen durch mehrfaches, vorsichtiges Abspülen mit vorgewärmten PBS (37°C) entfernt. Für die Kultur der Zellen wurde RPMI mit 5% autologem Serum/Plasma, GM-CSF (800U/ml), IL-4 (1000U/ml) versetzt. Die Zellen wurden alle 3 Tage mit frischem Medium versorgt. Um reife DC zu generieren wurde das Medium an Tag 6 zusätzlich mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml), TNF- $\alpha$  (10ng/ml) und Prostaglandin E<sub>2</sub> (1 $\mu$ g/ml) versetzt. Die Zellen wurden für zwei weitere Tage kultiviert und an Tag 8 geerntet (Jonuleit et al. 1997).

### **2.2.4 Zellstimulation**

Humane Monozyten und dendritische Zellen wurden mit fünf verschiedenen Stimulatoren in subtoxischen Konzentrationen behandelt.

- MCI/MI            1 $\mu$ g-2,5  $\mu$ g/ml
- TNCB             1 $\mu$ g-2,5  $\mu$ g/ml
- Thiomersal      2 $\mu$ g/ml
- Formaldehyd    200 $\mu$ g/ml
- PMA               30nM

Die Zellen wurden auf  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml Medium eingestellt und 1h bei 37°C präinkubiert. Danach wurde die Haptenisierung durch Zugabe der Kontaktallergene und Aktivatoren gestartet.

Zur Inhibition spezifischer Signalelemente wurden die Zellen vor der Haptenisierung mit den entsprechenden Inhibitoren vorinkubiert. Die Inhibition der Proteinkinase C mit Calphostin C wurde unter Beleuchtung durchgeführt (Bruns et al. 1991). Die Stammlösungen einiger Inhibitoren und die von TNCB wurden in DMSO angesetzt. Dabei



wurde beachtet, daß die Endkonzentration von DMSO im Stimulationsansatz unter 1% lag. In diesen Konzentrationen hatte DMSO keinen Einfluß auf Viabilität und Reaktivität der Zellen sowie die Aktivierung von MAP Kinasen.

### **2.2.5 Fluoreszenzmikroskopie**

Der Nachweis von STAT-Transkriptionsfaktoren im Zellkern wurde auf Einzelzellebene in immunocytochemischen Präparaten im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Zellen wurden nach der Stimulation mit eiskaltem Methanol (-20°C) resuspendiert und durch mehrfaches aufpipettieren permeabilisiert und fixiert. Danach wurden sie zweimal mit PBS/FCS/Triton-x100 (0,1%) gewaschen und anschließend mit P-STAT3- oder P-STAT4-Antikörpern für 60min bei 4°C gefärbt. Die Sekundärfärbung erfolgte mit anti-Kaninchen-Rhodamin Antikörpern für 30min bei 4°C. Die gefärbten Zellen wurden im Cytospin bei 500Upm auf Objektträger aufgeschleudert und mit glycerolhaltigen Medium eingedeckt. Die Präparate wurden im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und fotografiert.

### **2.2.6 Durchflußzytometrie**

Die Durchflußzytometrie ermöglicht die Identifizierung und Untersuchung verschiedener Zelltypen in gemischten Suspensionen. Die Unterscheidung der Zellpopulationen erfolgt durch Detektion ihrer Oberflächenmarker.

Die Zellen wurden in Suspension mit fluorochromkonjugierten Antikörpern markiert, die spezifisch für ein bestimmtes Oberflächenmolekül sind, und im FACS („fluorescence activated cell sorter“) ausgewertet. Der Laser bestrahlt die Zellen mit monochromatischem Licht von 488nm und 635nm Wellenlänge. Dadurch werden die gebundenen Fluorochrome zur Emission von Licht angeregt. Die Intensität des ausgestrahlten Lichts ist proportional zur Dichte der detektierten Antigene. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit Hilfe der Cell Quest Pro Software.

#### **2.2.6.1 Phänotypisierung der Zellen**

Um die Zusammensetzung der PBMC und die Reinheit der isolierten Monozyten bzw. der kultivierten DC zu ermitteln, wurden die Zellen einer Doppelmarkierung zur

Phänotypisierung und anschließender FACS-Analyse unterzogen. Dazu wurden je  $1 \times 10^5$  Zellen eingesetzt und nach folgendem Schema gefärbt:

**Tab. 8: Phänotypisierung von dendritischen Zellen und Monozyten**

(alle Antikörper wurden in FACS-Puffer verdünnt)

	Primär-Antikörper		Sekundär-Antikörper	
Isotypkontrolle	Isotyp Maus (MKD6) KÜ	Isotyp Ratte (4F7) KÜ	$\alpha$ -Ms DTAF	$\alpha$ -Rt-PE
Kompensation	Isotyp Maus KÜ	$\alpha$ -HLA-DR (34 $\mu$ g/ml)	$\alpha$ -Ms DTAF	$\alpha$ -Rt-PE
T-Zellen	$\alpha$ -CD3 KÜ	$\alpha$ -HLA-DR (34 $\mu$ g/ml)	$\alpha$ -Ms DTAF	$\alpha$ -Rt-PE
Monozyten	$\alpha$ -CD14 KÜ	$\alpha$ -HLA-DR (34 $\mu$ g/ml)	$\alpha$ -Ms DTAF	$\alpha$ -Rt-PE
B-Zellen	$\alpha$ -CD19 (1:50)	$\alpha$ -HLA-DR (34 $\mu$ g/ml)	$\alpha$ -Ms DTAF	$\alpha$ -Rt-PE
Reife DC	$\alpha$ -CD83 (1:100)	$\alpha$ -HLA-DR (34 $\mu$ g/ml)	$\alpha$ -Ms DTAF	$\alpha$ -Rt-PE
DC gesamt	$\alpha$ -CD86 (1:200)	$\alpha$ -HLA-DR (34 $\mu$ g/ml)	$\alpha$ -Ms DTAF	$\alpha$ -Rt-PE

Die Zellen wurden mit je 25 $\mu$ l der Primärantikörper für 20min bei 4°C inkubiert. Danach wurden alle Ansätze in 500 $\mu$ l FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert (3min, 400g, 4°C), in je 25 $\mu$ l Sekundärantikörper ( $\alpha$ -Maus-DTAF 8 $\mu$ g/ml,  $\alpha$ -Ratte-PE 5 $\mu$ g/ml) aufgenommen und für weitere 15min bei 4°C inkubiert. Überschüssige Sekundärantikörper wurden durch erneutes Waschen mit 500 $\mu$ l FACS-Puffer entfernt und die Zellen schließlich zur Messung in 250 $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen.

Im FACS wurden HLA-DR positive Zellen (B-Zellen, Monozyten, dendritische Zellen) im FL-2-Kanal dargestellt, während CD3<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup> Zellen im FL-1-Kanal sichtbar wurden. Zur Auswertung wurden die Zellen im „Dot-Blot“ (FL-2 gegen FL-1) dargestellt und mit Quadrantenstatistik der Prozentsatz der einzelnen Zellpopulationen bestimmt.

### 2.2.6.2 Reaktivitäts-Messung

Nach der Stimulation wurde in Monozyten und dendritischen Zellen die intrazelluläre Tyrosinphosphorylierung durch Anfärbung von Phosphotyrosinresten mit einem FITC-gekoppelten Antikörper (PY-20) untersucht. Für jeden FACS-Ansatz wurden  $1 \times 10^5$  Zellen eingesetzt. Diese wurden in 500 $\mu$ l Saponin-Puffer permeabilisiert und abzentrifugiert (3min, 400xg, 4°C). Die Inkubation mit PY-20 FITC in Saponin-Puffer (25 $\mu$ l je Ansatz) erfolgte für 20min bei 4°C. Danach wurden die Zellen mit Saponin-Puffer gewaschen und

in 250µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität wurde im FACS gemessen.

### **2.2.6.3 Messung der PKC-Translokation**

Die Translokation der PKC-Isoformen PKC $\alpha$ ,  $\beta$ II und P-PKC $\alpha$ / $\beta$ II wurde ebenfalls in Saponin-behandelten DC dargestellt. Die Zellen wurden mit Saponin-Puffer permeabilisiert und zweimal gewaschen, um nicht-membrangebundene Cytosol-Bestandteile auszuwaschen. Anschließend wurden die Zellen nacheinander mit anti-PKC-Antikörpern (30min, 4°C) und mit DTAF-gekoppelten Sekundärantikörpern (20min, 4°C) inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und in 250µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität wurde im FACS gemessen.

### **2.2.6.4 Viabilitäts-Bestimmung**

Die Viabilität der Zellen wurde durchflußzytometrisch mit Hilfe des roten Fluorochroms Propidiumjodid (PI) gemessen. Nekrotische oder beschädigte Zellen nehmen diesen Stoff auf, während die Membranen vitaler Zellen für PI undurchlässig sind. PI interkaliert in den DNA-Doppelsträngen der toten Zellen, die sich im FACS durch eine Verschiebung im FL-2-Kanal von vitalen Zellen abgrenzen lassen.

Für jeden FACS-Ansatz wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in PBS/FCS verwendet. Die Zellen wurden pelletiert (5min, 400xg, 4°C) und in 250µl PBS/FCS resuspendiert. Zu diesem Volumen wurden 2,5µl PI-Lösung (100µg/ml) gegeben (Endkonzentration 1µg/ml) und kurz resuspendiert. Nach 45sec wurden die Ansätze mit 750µl PBS/FCS abgestoppt, abzentrifugiert, in 250µl FACS-Puffer aufgenommen und sofort im FACS (FL-2-Kanal) gemessen.

In den Versuchen mit Calphostin C und Ro31-8425 wurde die Viabilität aufgrund der Eigenfluoreszenz dieser Inhibitoren durch Ausschluß von Trypanblau-gefärbten Zellen im Mikroskop bestimmt.

## 2.2.7 Proteinbiochemie

### 2.2.7.1 Zell-Lyse

Zur Proteingewinnung wurden pro Stimulationsbedingung  $1 \times 10^6$  dendritische Zellen oder  $8 \times 10^6$  Monozyten eingesetzt. Die Zellen wurden nach der Haptenisierung in Medium gewaschen. Nach Zentrifugation (5min, 1500U/min, 4°C) wurde der Überstand komplett entfernt, die Zellpellets in 50µl Lysepuffer resuspendiert und für 1h auf Eis inkubiert. Da bei diesem Zellaufschluß die in den Zellen vorhandene Proteasen und Phosphatasen freigesetzt werden, waren dem Lysepuffer Protease- und Phosphatase-Inhibitoren zugesetzt und alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Nach 60min Lyse wurden die Zelltrümmer durch hochtouriges zentrifugieren (10min, 13000U/min, 4°C) pelletiert und das klare, proteinhaltige Lysat (ca. 50µl) in ein Eppendorfgesäß überführt. Für die Proteinbestimmung wurde 1µl Lysat entnommen und der Rest bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.2.7.2 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Lysate wurde mit der Biuret-Reaktion ermittelt (BCA Protein Assay, Pierce, Rockford, USA). Grundlegendes Prinzip dieser Reaktion ist die Reduktion von  $\text{Cu}^+$ -Ionen, die mit Bicinchoninsäure (BCA) einen wasserlöslichen Komplex bilden, der eine starke Lichtabsorption bei 562nm aufweist. Für die Proteingehaltsbestimmung wurden 10µl Standardlösung bzw. eine 1:10 Verdünnung des Lysats in einer Mikrotiterplatte vorgelegt. Danach wurden 200µl Reaktionsmix zugegeben und für 30min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nachdem die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurde die Absorption mit einem Microplate Reader bei 562nm bestimmt. Der Standard diente zur Berechnung einer linearen Regressionsgeraden, mit der der Proteingehalt der Lysate bestimmt wurde.

### 2.2.7.3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Proteine lassen sich unter denaturierenden Bedingungen entsprechend ihres Molekulargewichtes in einem Gel elektrophoretisch auftrennen. Die Auftrennung ist dabei abhängig von der Porengröße der Gelmatrix, die sich durch die Konzentration an Acrylamid und Bisacrylamid variieren läßt. Um die Auftrennung der Proteine nach ihrem

Molekulargewicht zu ermöglichen, werden die Tertiär- und Sekundärstrukturen der Proteine vor der Elektrophorese aufgebrochen. Dazu wurden die Zellysate mit einem SDS- und mercaptoethanolhaltigen Puffer aufgeköcht. Das SDS lagert sich an die Proteine an und verleiht ihnen eine negative Gesamtladung, die größer ist als die Ladung der nativen Proteine. Durch diese negative Gesamtladung wird die Migrationsrichtung der Proteine im elektrischen Feld zur Anode hin festgelegt.

### **Anfertigung von Polyacrylamid-Maxi-Gelen**

Zwei Glasplatten wurden entfettet und die Seiten mit einem Streifen Vaseline und jeweils einem Abstandhalter (1,5mm) versehen. Danach wurden die Platten aufeinander gelegt und in eine Gelapparatur gestellt, die für ein dichtes Abschließen des Gelaufbaus sorgte. Die Gellösung für das Trenngel wurde nach folgendem Rezept mit entgastem Aqua bidest. angesetzt:

**Tab. 9: Trenngel**

	<b>8%ig</b>	<b>10%ig</b>	<b>12%ig</b>
Lösung A	3,1ml	3,1ml	3,1ml
entgastes Aqua bidest.	15,3ml	13,5ml	11,7ml
SDS 20%	120µl	120µl	120µl
Acrylamid Gel 30	6,9ml	8,7ml	10,2ml
APS 10%	100µl	100µl	100µl
TEMED	8µl	8µl	8µl

Die Gellösung wurde in den vorbereiteten Gelaufbau gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Die Polymerisierungsreaktion des Trenngels war nach etwa 30min abgeschlossen. Danach wurde das Isopropanol abgesaugt und durch Aqua dest. ersetzt.

**Tab. 10: Sammelgel**

Lösung D	1ml
Aqua bidest.	5,93ml
Acrylamid Gel 30	990µl
TEMED	25µl
APS 10%	80µl

Die Lösungen wurden gemischt und das Sammelgel auf das polymerisierte Trenngel gegossen. Danach wurde ein Probenkamm in das noch flüssige Sammelgel gesteckt. Die Polymerisation des Gels war nach 15min abgeschlossen.

### **Probenaufbereitung**

Die Lysate wurden auf Eis aufgetaut und die Proteinkonzentration jeder Probe auf 100µg/40µl eingestellt. Die Lysate wurden mit 1/3 Volumen 4-fach SDS-Probenpuffer gemischt und für 5min gekocht. Danach wurden die Proben mit einer Hamiltonspritze in das für die Elektrophorese vorbereitete Gel pipettiert. Zusätzlich wurde 10µl eines Molekulargewichtsmarkers (Bluestain) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 45mA für 3h durchgeführt.

#### 2.2.7.4 Western Blotting

Als Western Blotting bezeichnet man den Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen aus einem Polyacrylamid Gel auf eine Membran. Dieses Prinzip ermöglicht den immunologischen Nachweis der immobilisierten Proteine durch spezifische Antikörper (Renart et al. 1979). Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrotransfer unter Verwendung der sogenannten „semidry“ Methode auf eine PVDF-Membran übertragen.

Der Blotaufbau erfolgte sofort nach Beendigung der Elektrophorese. Die PVDF-Membran und 8 Stücke Whatmanpapier wurden in Gelgröße zurecht geschnitten. Die Membran wurde mit Methanol benetzt, mit Aqua dest. abgespült und in Anodenpuffer mit 10% Methanol für 5min äquilibriert. Whatmanpapier, Membran und Gel wurden luftblasenfrei aufgelegt. Der Elektrotransfer wurde bei 250mA für 55min durchgeführt. Die im Gel aufgetrennten, negativ geladenen Proteine wanderten mit dem Stromfluß zur Anode, wo sie auf der PVDF-Membran fixiert wurden. Die Effizienz des Transfers ließ sich mit Hilfe des gefärbten Molekulargewichtsmarkers abschätzen. Die Membran wurde in TPBS-Puffer überführt.

### 2.2.7.5 Detektion von Western Blots

#### **Blocken unspezifischer Bindungsstellen der PVDF-Membran**

Die Detektion von Signaltransduktionselementen auf Western Blots erfolgte durch Färbung mit spezifischen Antikörpern. Das Blocken der Membran dient zur Absättigung der unspezifischen Bindestellen der Membran. Dazu wurde „Blotto“ verwendet (5% w/v Magermilchpulver in TPBS, pH 7,4) mit dem die Membran für 1h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert wurde. Anschließend wurde das Blocking Reagenz durch Waschen mit TPBS-Puffer entfernt.

#### **Chemiluminescence-Detektion**

Die eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper und deren Verdünnungen sind in Tabelle 4 und 5 angegeben. Die Primärantikörper wurden in 2ml TPBS mit Blocking-Puffer verdünnt, mit der Membran in eine Plastikfolie eingeschweißt und 2h bei RT oder über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Überschüssige Antikörpermoleküle wurden durch 15min Waschen in TPBS entfernt. Anschließend wurde die Membran mit Sekundärantikörper in Blocking-Reagenz für 60min bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran erneut in TPBS gewaschen.

Alle Sekundärantikörper waren mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase („horseradish peroxidase“, HRP) konjugiert. Die PVDF-Membran wurde mit Substrat-Lösung (ECL-Kit) gleichmäßig benetzt. Anschließend wurde die Membran in eine Plastikfolie eingeschweißt. An den Bereichen der Membran, an denen Antikörper binden konnten, wurde das Substrat zur Lichtemission angeregt, die als Schwärzung auf einem Röntgenfilm detektierbar war.

#### **Stripping und erneute Antikörperfärbung von Membranen**

Das vollständige Entfernen gebundener Antikörper (Stripping) von einer Western Blot Membran ermöglicht ein mehrmaliges Detektieren von Antigenen (Reprobing). Obwohl die Behandlung der Membranen mit dieser Methode zu einer Abnahme des Signals führt, ist die erneute Detektion von spezifischen Antigenen mehrmals möglich. Die Membranen wurden dreimal in TPBS-Puffer gewaschen und anschließend für 40min bei 50°C in Stripping Puffer inkubiert. Die Membran wurde fünfmal gründlich gewaschen und anschließend erneut geblockt, gefärbt und detektiert.

### 2.2.8 Ras-Aktivierungsassay

Das Prinzip des Ras-Aktivierungs-Assays beruht darauf, aktiviertes Ras aus den Zell-Lysaten zu präzipitieren. Dazu wird ein an Agarose-gekoppeltes Peptid eingesetzt, das der Ras-Binde-Domäne (RBD) von c-Raf entspricht. An diese Sequenz assoziiert Ras nur in aktiviertem also GTP-gebundenem Zustand.

Für jeden Ansatz wurden 750-1000µg Protein eingesetzt. Die Lysate wurden mit 20µl Glutathion-Agarose 30min bei 4°C vorinkubiert, um unspezifisch an Agarose bindende Proteine aus den Lysaten herauszulösen („preclearing“). Die vorgereinigten Lysate wurden in ein neues Eppendorf-Gefäß mit 10µl c-Raf-RBD-Agarose überführt und 45min bei 4°C unter Head-over-end-Rotation inkubiert. Danach wurde das Pellet dreimal mit Lysepuffer gewaschen, zweimal mit je 20µl Laemmli-Puffer abgelöst und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western Blot wird Ras detektiert.

Die Agarose-Pellets wurden mit zweimal 20µl Laemmli-Puffer (Laemmli 1970) für je 15min bei RT inkubiert, um präzipitiertes Ras zu lösen. Die Präzipitate wurden in einem 12%igen Acrylamid-Gel aufgetrennt und Ras wurde im Western Blot nachgewiesen.

### 2.2.9 Raf IP Kinase Assay

Dem eigentlichen Kinase Assay ging die Immunpräzipitation von c-Raf voraus. Die Methode der Immunpräzipitation eignet sich zur Isolierung spezifischer Proteine aus Gesamtzelllysat. Präzipitiertes c-Raf wurde mit inaktivem, nicht-phosphoryliertem MEK und ATP inkubiert. Als Maß für die Aktivität von c-Raf wurde anschließend die Phosphorylierung von MEK im Western-Blot detektiert.

2µg anti-c-Raf-Antikörper, und 50µl Protein G-Agarose wurden zwei Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert. Das Pellet wurde zweimal mit Lysepuffer gewaschen. Aus 500µg Protein pro Ansatz wurde c-Raf mit der c-Raf-Antikörper/G-Protein-Agarose für 2 Stunden bei 4°C präzipitiert. Das Pellet wurde zweimal mit Lysepuffer und einmal mit Reaktionspuffer gewaschen. Für die eigentliche Kinase-Reaktion wurde präzipitiertes Raf mit 20µl Reaktionspuffer, 10µl  $Mg^{2+}$  (75mM)/ATP(500µM) und 0,4µg inaktivem MEK1 für 30min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde der Überstand in



einer SDS-PAGE aufgetrennt. Präzipitiertes c-Raf wurde mit zweimal 20 $\mu$ l Laemmli-Puffer abgelöst und ebenfalls als Kontrolle für die Immunpräzipitation in einer SDS-PAGE aufgetrennt. P-MEK1 und c-Raf wurden im Western Blot nachgewiesen.

### **2.2.10 Messung der intrazellulären freien Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$**

Die Methodik der Calcium-Messung mit Fura-2 beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Fluoreszenzfarbstoffes bei Bildung eines Chelat-Komplexes mit  $Ca^{2+}$  von etwa 380 ( $Ca^{2+}$ -frei) zu 340nm ( $Ca^{2+}$ -gebunden). So nimmt die Emission<sub>510nm</sub> unter Anregung bei 340nm durch Calcium-Bindung zu, gleichzeitig nimmt die Emission<sub>510nm</sub> bei 380nm ab. Alternierende Anregung bei 340 und 380nm ermöglicht die parallele Detektion von Calcium-gebundenem und freiem Fura-2. Durch den Quotienten (Ratio) der Fluoreszenzintensitäten bei diesen beiden Exzitationswellenlängen läßt sich das Verhältnis von Calcium-gebundenem zu freiem Fura-2 darstellen. Veränderungen dieses Quotienten entsprechen den Veränderungen der Calciumkonzentration (Grynkiewicz, 1985).

Dendritische Zellen (ca.  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml) wurden 30min mit 1 $\mu$ M Fura-2-AM in PBS lichtgeschützt aufgeladen. Fura-2-AM ist ein zellpermeabler Acetoxymethylester und kann in dieser Form kein Calcium binden. Erst nach Aufnahme in die Zelle und enzymatischer Hydrolyse liegt Fura-2 in der Calcium-bindenden Form vor. Überschüssiges Fura-2-AM wurde mit PBS ausgewaschen.

Anschließend wurden 200 $\mu$ l der Zellsuspension in ein Kulturschälchen mit integriertem Deckgläschen auf dem Objektisch eines Invertmikroskopes, das für Epifluoreszenz ausgerüstet war, gegeben. Nach Adhärenz der Zellen, wurde mit 37°C warmem PBS kontinuierlich gespült. Zur Stimulation wurde die Lösung durch 2,5 $\mu$ g/ml MCI/MI in PBS ersetzt. Durch zwei Monochromatoren mit einer Wechselfrequenz von 100Hz wurden die Zellen mit Licht der Wellenlängen 340 und 380nm angeregt. Die Emission mit einer Wellenlänge von 510nm wurde auf einen Photodetektor fokussiert, digitalisiert und gespeichert. Das Verhältnis (Ratio) der Fluoreszenzintensitäten bei 510nm unter Anregung durch 340 bzw. 380nm ermöglichte eine relative Messung von  $[Ca^{2+}]_i$ . Der zeitliche

Verlauf der Fluoreszenzintensität wurde aufgezeichnet und die Ratio vor und nach Stimulation mit MCI/MI dargestellt.

### **2.2.11 RNA-Isolierung**

Die Isolierung der RNA erfolgte mit einem RNA-Isolierungs Kit der Firma Roche. Die Aufarbeitung der Proben wurde exakt nach Protokoll durchgeführt. Gesamt-RNA aus  $1 \times 10^6$  Zellen wurde mit  $75 \mu\text{l}$  RNase-freiem Aqua bidest. eluiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Zur Bestimmung der RNA-Menge wurde  $1 \mu\text{l}$  RNA-Probe 1:25 verdünnt und im Photometer die Extinktion bei 260nm gemessen. Der erhaltene Wert wurde mit 40 multipliziert und die Konzentration in  $\mu\text{g RNA/ml}$  berechnet unter Berücksichtigung der Verdünnung.

### **2.2.12 RNase-Protection Assay**

Der Rnase-Protection Assay (RPA) ermöglicht die Analyse der Expression der mRNA für mehrere Proteine in einer Probe. Das Prinzip des RPA beruht darauf, daß die Gesamt-RNA einer Probe mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert wird. Die Sonde enthält ein Gemisch spezifischer Sequenzen für die Cytokine, die analysiert werden sollen. Anschließend wird einzelsträngige RNA enzymatisch abgebaut. Erhalten bleiben die „geschützten“ Bereiche, in denen die Sonde an RNA der Probe binden konnte. Diese Fragmente werden in einem Acrylamid Gel aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. Die Sondenfragmente wurden so konzipiert, daß anhand der Größe der Fragmente (Laufstrecke im Gel) die verschiedenen Sondenfragmente identifiziert werden können.

Die Herstellung der Sonde anhand des im RPA-Kit enthaltenen templates (#556134) wurde exakt nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Radioaktivität der Sonde wurde im Scintillations Zähler ermittelt. Weiter verwendet wurde die Sonde nur bei einer Strahlung von mehr als  $10^5$  Cherenkov counts/ $\mu\text{l}$ . Für die Hybridisierung wurde 2-4  $\mu\text{g}$  gesamt RNA verwendet. Die RNA wurde ca. 30min im Vakuum-Evaporator getrocknet, in  $8 \mu\text{l}$  Hybridisierungspuffer aufgenommen, mit  $2 \mu\text{l}$  radioaktiv markierter Sonde versetzt und für 12-16h bei  $56^\circ\text{C}$  inkubiert. Auch der anschließende RNA-Verdau wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, die verbliebene RNA wurde gefällt, das Pellet getrocknet und in

Ladepuffer aufgenommen. Für das Acrylamid-Gel wurden Sequenziergelplatten verwendet. Die Glasplatten wurden silanisiert, mit Spacern versehen und aufeinander gelegt. Anschließend wurde das Gel nach der in Tabelle x.x aufgeführten Zusammensetzung gegossen.

**Tab. 11: Acrylamid-Gel für RPA**

	<b>5%ig</b>
Acrylamid/Bis-Acrylamid 19:1	12ml
10x TBE	10ml
Urea	47,76g
Aq. dest. mit DEPC	ad 100ml
APS 10%	600µl
TEMED	80µl

Die Proben wurden auf das Harnstoff-Acrylamid-Gel aufgetragen und bei 1600Volt ca. 1,5h aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gelplatten so getrennt, daß das Gel auf einer Platte festgehalten wurde. Das Gel wurde 30min in 1M Essigsäure gelegt, um den Harnstoff zu entfernen. Danach wurde es bei 60°C über Nacht im Brutschrank getrocknet. Auf das getrocknete Gel wurde ein Röntgenfilm für ca. 2 Tage aufgelegt und anschließend entwickelt.

### **2.2.13 Elispot**

Der Elispot Assay erlaubt die Bestimmung der Anzahl von Cytokin-produzierenden Zellen in einer Zellsuspension. Das Prinzip beruht darauf, daß lokal produzierte Cytokine an Antikörper binden, die auf einer PVDF-Membran immobilisiert sind. Nach Inkubation in PVDF/Antikörper-wells wird die Zellsuspension abgewaschen und gebundene Cytokinmoleküle von einem zweiten biotinyliertem Antikörper erkannt. Durch Streptavidin-gekoppelte Alkalische Phosphatase und Inkubation mit dem Phosphatase-Substrat BCIP/NBT werden die Stellen, an denen Cytokin-Moleküle gebunden haben, als violette Flecken auf der Membran sichtbar.

Der Elispot Assay wurde mit den mitgelieferten Reagenzien nach Protokoll durchgeführt. DC wurden 30min mit PD98059 oder/und SB203580 vorinkubiert, mit Kontaktallergenen stimuliert, 1h inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und in RPMI resuspendiert. Es

wurden  $1 \times 10^4$  Zellen pro well in Dreifach-Bestimmung in mit anti-TNF- $\alpha$ -Antikörpern gecoatete und mit 2% Milchpulver in PBS geblockten ELISPOT -Platten gegeben und 24h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS-Tween 20 (0,1%) lysiert und ausgewaschen. Die Platten wurden 90min bei 37°C mit Biotin-gekoppeltem Antikörper inkubiert, gewaschen, 60min mit Streptavidin-gekoppelter Alkalischer Phosphatase behandelt und nach weiteren Waschschritten mit Phosphatase-Substrat versetzt. Die Reaktion wurde nach Ausbildung der Spots durch Waschen mit Aqua dest. beendet. Die Spots wurden im ELISPOT Reader automatisch ausgezählt.

#### **2.2.14 Statistische Auswertung**

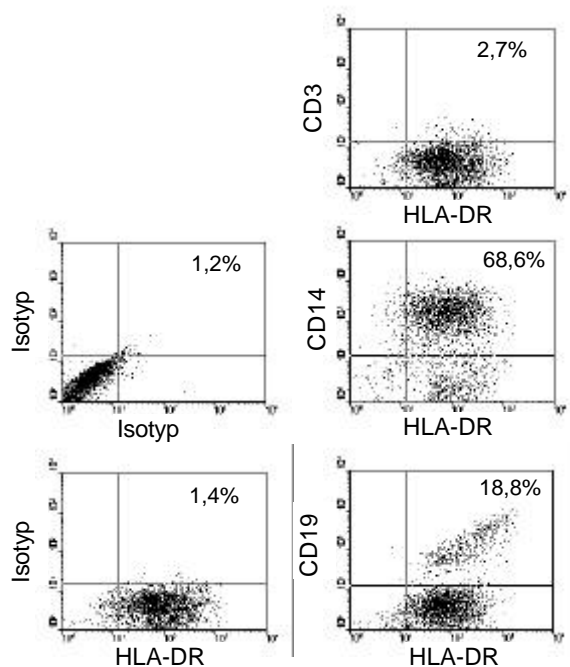
Allen Experimenten lagen Zellen von jeweils anderen Blutspendern zugrunde, wodurch die Unabhängigkeit der Experimente gewährleistet war. Die Auswertung der Versuche erfolgte mit Hilfe des Software Programms Microsoft Excel '97 und StatView '92-'98. Zur Analyse der Messung von  $[Ca^{2+}]_i$  wurde Oscar-Software (Photon Technology International) und GraphPad Prism Software eingesetzt. Die in den Graphiken dargestellten Fehlerbalken entsprechen den Mittelwertabweichungen der Experimente.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung des Modellsystems

##### 3.1.1 Phänotyp angereicherter Monocyten

Der Phänotyp der angereicherten Monocyten wurde bei jeder Aufreinigung durchflußcytometrisch analysiert. Die Expression der Zelltyp-spezifischen Oberflächenmarker CD-3 (T-Zellen), CD14 (Monocyten) und CD19 (B-Zellen) und des MHCII-Moleküls HLA-DR wurde dargestellt (Abb. 8).



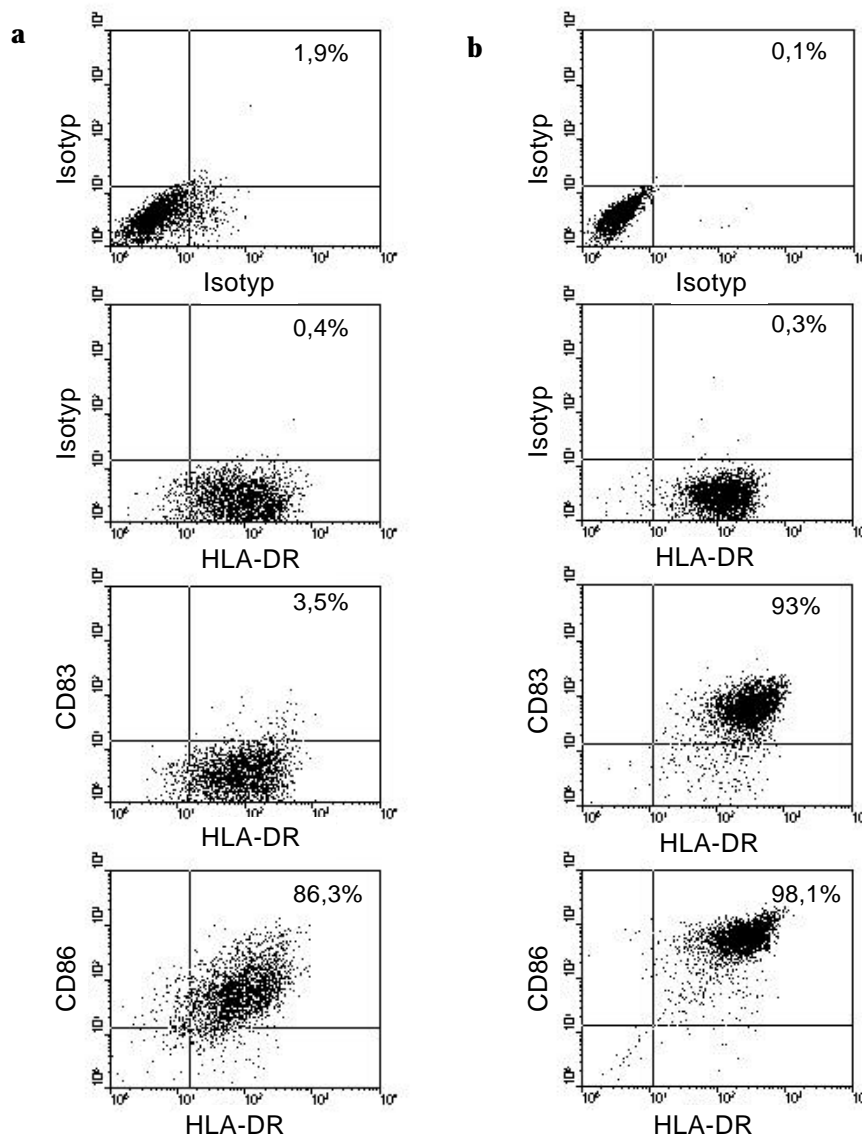
**Abb. 8: Phänotyp der angereicherten Monocyten**

Aus PBMC wurden adhärenente Zellen durch Kurzzeitadhärenz isoliert. Adhärenente Zellen wurden über Nacht in autologem Plasma kultiviert und anschließend geerntet. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmarker gefärbt und durchflußcytometrisch analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis.

Die Aufreinigungen ergaben eine Anreicherung von etwa 70% CD14- und HLA-DR-positiver Monocyten sowie einen Anteil von 5-20% B-Zellen und eine minimale Verunreinigung durch T-Zellen (<3%).

##### 3.1.2 Phänotyp von unreifen und reifen dendritischen Zellen

Der Phänotyp der aus Monocyten generierten dendritischen Zellen wurde durch durchflußcytometrische Darstellung der für dendritische Zellen typischen Oberflächenmarker CD86 und CD83 charakterisiert (Abb. 9).



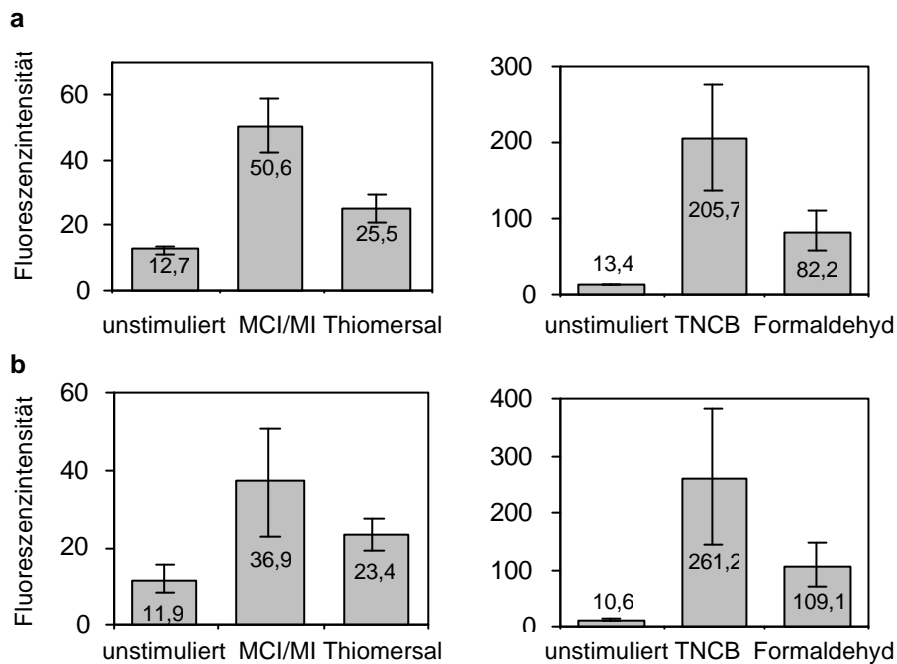
**Abb. 9: Phänotyp von unreifen (a) und reifen (b) DC**

Aus PBMC wurden adhärenente Zellen durch Kurzzeitadhärenenz isoliert. Adhärenente Zellen wurden mit GM-CSF und IL-4 kultiviert (a und b) und mit IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und PGE2 ausgereift (nur b). Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmarker gefärbt und durchflußcytometrisch analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis.

Unreife dendritische Zellen waren CD83-negativ. CD86 war auf über 80% der Zellen detektierbar. Reife dendritische Zellen waren durch die Expression von CD83 (>80%) und CD86 (>90%) gekennzeichnet.

### 3.1.3 Tyrosinphosphorylierung

Die Stärke der intrazellulären Tyrosinphosphorylierung nach Stimulation mit Kontaktallergenen variierte von Spender zu Spender. Im Mittel mehrerer Experimente konnte jedoch die Fähigkeit der Kontaktallergene in den verwendeten Konzentrationen einen Anstieg der intrazellulären Tyrosinphosphorylierung zu induzieren, wie schon von



**Abb. 10: intrazelluläre Tyrosinphosphorylierung nach Stimulation mit Kontaktallergenen**

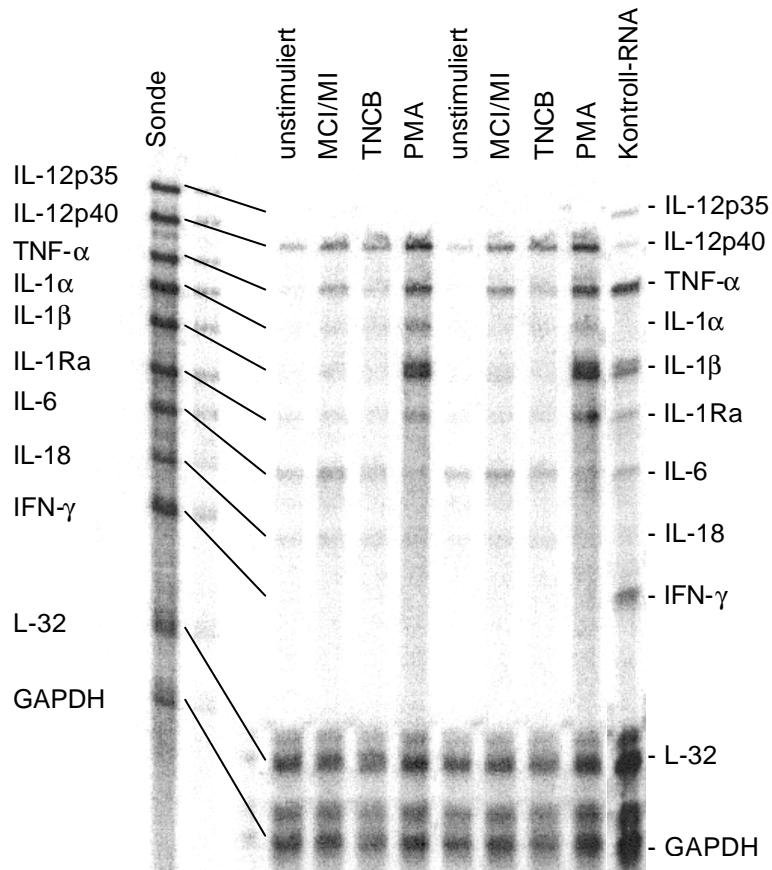
Reife DC (a) oder Monocyten (b) wurden mit MCI/MI (1,5 µg/ml), Thiomersal (2 µg/ml), TNCB (1 µg/ml) oder Formaldehyd (200 µg/ml) 20min bei 37°C stimuliert. Die Zellen wurden permeabilisiert, mit FITC gekoppeltem anti-Phosphotyrosin-Antikörper gefärbt und im FACScan analysiert. a: n=12, b: n=8

Kühn et al. gezeigt, bestätigt werden (Abb. 10).

Sowohl in reifen dendritischen Zellen (Abb.10a) als auch in Monocyten (Abb. 10b) konnte nach Stimulation mit den Kontaktallergenen MCI/MI, Thiomersal, TNCB oder Formaldehyd ein in der Intensität schwankender aber deutlicher Anstieg der Tyrosinphosphorylierung detektiert werden.

### 3.1.4 Cytokinexpression

Als Parameter für die funktionelle Relevanz der Aktivierung von dendritischen Zellen durch Kontaktallergene, wurde die Produktion von Cytokinen nach Stimulation mit Kontaktallergenen untersucht.



**Abb. 11: Muster der Cytokin-RNA nach Stimulation mit MCI/MI oder TNCB**

DC wurden mit MCI/MI (2,5µg/ml), TNCB (1,5µg/ml) oder PMA (20nM) stimuliert. Drei und fünf Stunden nach Stimulation wurde die RNA isoliert und in den RNase-Protection Assay eingesetzt. Durch Hybridisierung mit Cytokin-mRNA geschützte  $P^{32}$ -markierte Fragmente der RNA-Sonde wurden in einem Acrylamid-Gel aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus vier Versuchen.

Mit Hilfe eines RNase-Protection-Assays konnte die Hochregulation der RNA mehrerer Cytokine gleichzeitig bestimmt werden. Der ausgewählte Assay umfaßte die proinflammatorischen Cytokine IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-12p35 und p40, IL-18 sowie den IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1RA), IL-6 und IFN- $\gamma$ . Als Kontrolle für äquivalente RNA-Mengen wurden die Haushaltsgene L32 und Glycerinaldehyd-Dehydrogenase (GAPDH) detektiert.

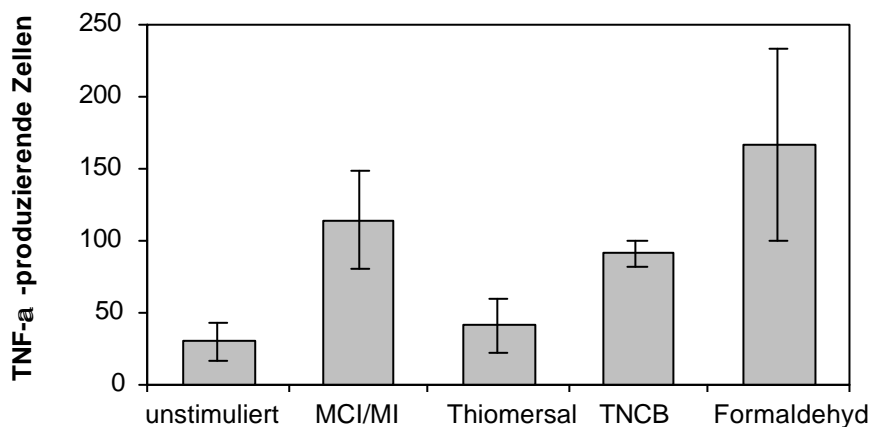


Dendritische Zellen wurden mit den Kontaktallergenen MCI/MI und TNCB sowie mit PMA als Positivkontrolle stimuliert. In Abbildung 11 ist das Muster der Cytokin-RNA drei und fünf Stunden nach Stimulation dargestellt.

Eine deutliche Hochregulation von Cytokin-RNA ist nach Stimulation mit dem als Positivkontrolle eingesetzten Tumorpromoter PMA zu erkennen. PMA-Stimulation führt zu einer starken Hochregulation der RNA für IL-1 $\beta$  und in absteigender Ausprägung von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  und IL-1-Rezeptor-Antagonist. In fünf Versuchen konnte nach Stimulation mit den Kontaktallergenen MCI/MI und TNCB reproduzierbar nur für TNF- $\alpha$  ein Anstieg der RNA sowohl drei als auch fünf Stunden nach Stimulation detektiert werden.

### 3.1.5 TNF- $\alpha$ -Produktion

Der Anstieg der TNF- $\alpha$ -mRNA führte zu der Frage, ob TNF- $\alpha$ -Produktion auf Proteinebene nachzuweisen war. In ersten Versuchen des TNF- $\alpha$ -Nachweises im ELISA stellte sich heraus, daß zwar TNF- $\alpha$ -produktion meßbar ist, jedoch in sehr niedrigen Mengen von wenigen Nanogramm, die an der Nachweisgrenze der Messung lagen. Daher wurde auf die Methode des Elispot zurückgegriffen, bei dem Cytokin-produzierende Zellen dargestellt werden.



**Abb. 12: TNF- $\alpha$ -Produktion von DC nach Stimulation mit Kontaktallergenen**

DC wurden mit den Kontaktallergenen MCI/MI (2,5  $\mu$ g/ml), Thiomersal (2  $\mu$ g/ml), TNCB (1,5  $\mu$ g/ml) und Formaldehyd (200  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach 48 Stunden wurde die Anzahl TNF- $\alpha$ -produzierender Zellen im Elispot bestimmt. n=3

In Abbildung 12 ist die Anzahl von TNF- $\alpha$ -produzierenden dendritischen Zellen 24 Stunden nach Stimulation mit den Kontaktallergenen MCI/MI, Thiomersal, TNCB und Formaldehyd dargestellt.

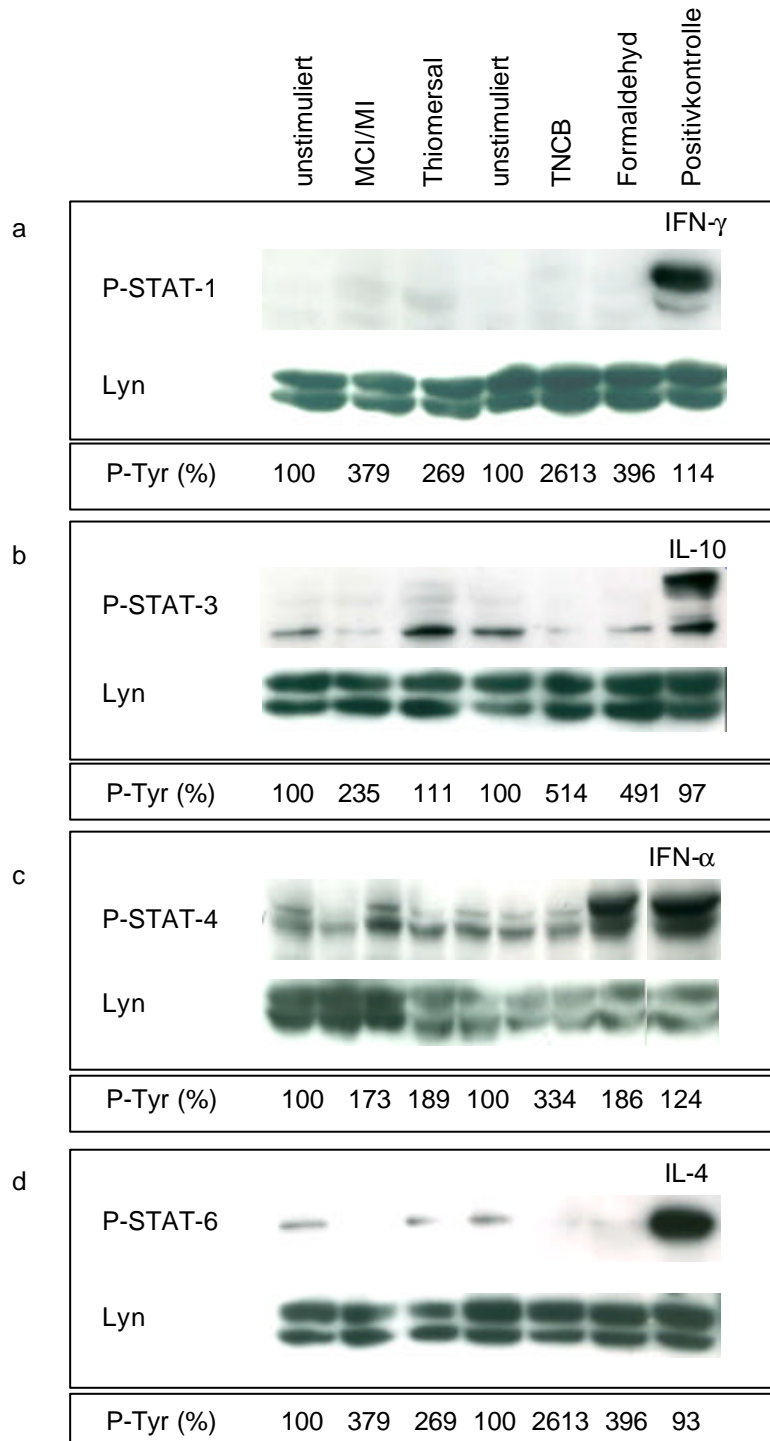
Nach Stimulation mit den Kontaktallergenen MCI/MI, TNCB und Formaldehyd konnte ein deutlicher Anstieg an TNF- $\alpha$ -produzierenden Zellen im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrollgruppe detektiert werden. Insbesondere für die Stimulation mit Formaldehyd aber auch mit MCI/MI sind große Schwankungen in der Anzahl der TNF- $\alpha$ -produzierenden Zellen zu beobachten. Aktivierung mit Thiomersal bewirkt keinen deutlichen Anstieg der TNF- $\alpha$ -Produktion im Vergleich zu nicht stimulierten dendritischen Zellen.

### 3.2 Aktivierung von Jak/STAT-Signalwegen

Dendritische Zellen und Monocyten wurden mit den Kontaktallergenen MCI/MI, Thiomersal, TNCB und Formaldehyd in nicht toxischen aber aktivierenden Konzentrationen behandelt. Die Phosphorylierung der STAT-Moleküle STAT1, STAT3, STAT4, STAT5 und STAT6 als Zeichen für die Aktivierung eines Jak/STAT-Signalweges wurde im Western-Blot mit phospho-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Parallel wurde die intrazelluläre Tyrosinphosphorylierung als Kontrolle für die Reaktion der Zellen auf die Stimulation mit Kontaktallergenen durchflußcytometrisch bestimmt.

In den Abbildungen 13 und 14 sind die Ergebnisse der proteinbiochemischen Untersuchungen zur Aktivierung von Jak/STAT-Signalwegen durch Kontaktallergene zusammengestellt. Gezeigt wird jeweils der Nachweis von phosphorylierten STAT-Molekülen im Western Blot nach Stimulation von dendritischen Zellen (Abb. 13) bzw. Monocyten (Abb. 14) mit Kontaktallergenen oder Cytokinen als Positivkontrollen. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus drei Wiederholungsexperimenten. Als Kontrolle für die Aktivierung der für die Western Blots verwendeten Zellen ist die durchflußcytometrisch ermittelte intrazelluläre Tyrosinphosphorylierung für den jeweiligen Versuch aufgeführt.

Die Zellen wurden mit Cytokinen stimuliert, um zu zeigen, daß die Aktivierung der untersuchten Jak/STAT-Signalwege in Monocyten und dendritischen Zellen unter den gewählten Bedingungen möglich war. Bei Monocyten und dendritischen Zellen konnte die Phosphorylierung von STAT1 durch Stimulation mit IFN- $\gamma$ , von STAT3 mit IL-10 sowie STAT6 mit IL-4 gezeigt werden (Abb. 13 und 14). Dabei wurde für den Nachweis von phosphoryliertem STAT6 in reifen dendritischen Zellen eine zehnfach höhere IL-4-Konzentration benötigt als bei Monocyten. STAT4 wurde in dendritischen Zellen nicht durch IL-12 sondern nur durch IFN- $\alpha$  aktiviert.



**Abb. 13: Aktivierung von Jak/STAT-Signalwegen in dendritischen Zellen**

$1 \times 10^6$  dendritische Zellen wurden für 20min mit den Kontaktallergenen MCI/MI, Thiomersal, TNCB, Formaldehyd oder mit Cytokinen als Positivkontrolle stimuliert.

Die Zellysate wurden im Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern analysiert.

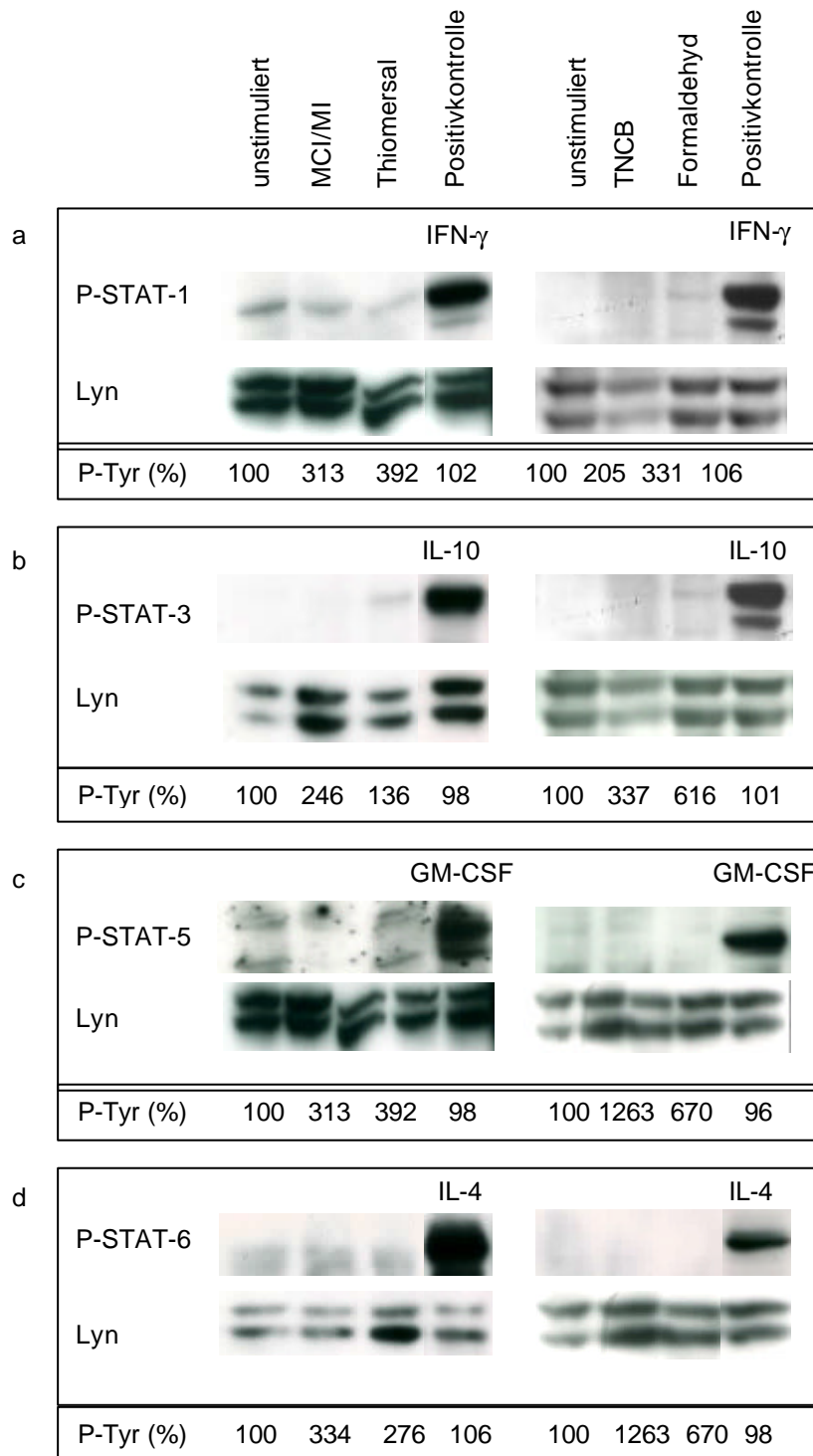
a Nachweis von P-STAT1, Positivkontrolle mit IFN- $\gamma$  (100U/ml)

b Nachweis von P-STAT3, Positivkontrolle mit IL-10 (10ng/ml)

c Nachweis von P-STAT4, Positivkontrolle mit IFN- $\alpha$  (1000U/ml)

d Nachweis von P-STAT6, Positivkontrolle mit IL-4 (100ng/ml)

Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.



**Abb. 14: Aktivierung von Jak/STAT-Signalwegen in Monocyten**

Monocyten wurden für 20min mit den Kontaktallergenen MCI/MI, Thiomersal, TNCB, Formaldehyd oder mit Cytokinen als Positivkontrolle stimuliert.

Die Zellsate wurden im Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern analysiert.

a Nachweis von P-STAT1, Positivkontrolle mit IFN- $\gamma$  (100U/ml)

b Nachweis von P-STAT3, Positivkontrolle mit IL-10 (10ng/ml)

c Nachweis von P-STAT5, Positivkontrolle mit GM-CSF (100U/ml)

d Nachweis von P-STAT6, Positivkontrolle mit IL-4 (10ng/ml)

Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

In Monocyten konnte STAT4 nicht nachgewiesen werden. Die Aktivierung von STAT5 gelang nur in Monocyten nicht jedoch in dendritischen Zellen durch Stimulation mit GM-CSF.

Mit zwei Ausnahmen war die Aktivierung der untersuchten Jak/STAT-Signalwege durch Stimulation mit den Cytokinen IFN- $\gamma$ , IL-10, IFN- $\alpha$ , GM-CSF und IL-4 induzierbar. In dendritischen Zellen war STAT5 nicht durch GM-CSF aktivierbar und in Monocyten war STAT4 nicht exprimiert. Die Stimulation der Zellen mit den Kontaktallergenen MCI/MI, Thiomersal, TNCB und Formaldehyd führte weder in dendritischen Zellen (Abb. 13a) noch in Monocyten (Abb. 14a) zu einem signifikanten Anstieg der Phosphorylierung von STAT1. Folglich scheint STAT1 nicht durch diese Kontaktallergene aktiviert zu werden.

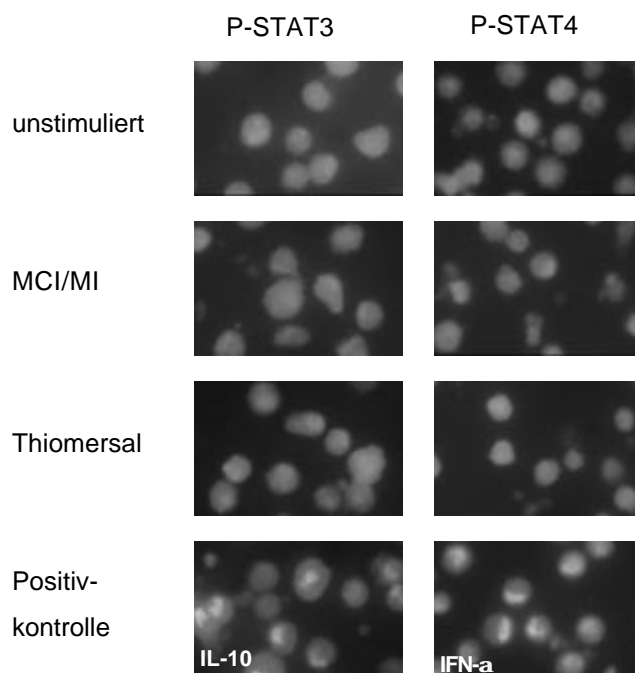
Im Vergleich zur Positivkontrolle mit IL-10 konnte auch für STAT3 keine Aktivierung durch die Kontaktallergene MCI/MI, TNCB und Formaldehyd in dendritischen Zellen (Abb. 13b) und Thiomersal in Monocyten (Abb. 14b) beobachtet werden. In dendritischen Zellen führt die Stimulation mit Thiomersal zu einem im Vergleich zur Positivkontrolle mit IL-10 leichten Anstieg der Phosphorylierung von STAT3.

Die Aktivierung von STAT4 konnte nur in dendritischen Zellen durch Stimulation mit IFN- $\alpha$  gezeigt werden. In allen Zellsaten konnte ein geringer Anteil an phosphoryliertem STAT4 detektiert werden, ein deutlicher Anstieg der Phosphorylierung war jedoch nur nach Stimulation mit IFN- $\alpha$  sichtbar. Thiomersal induzierte als einziges Kontaktallergen einen leichten Anstieg der Phosphorylierung von STAT4 (Abb. 13c).

Phosphoryliertes STAT5 konnte nur in Monocyten nach GM-CSF-Stimulation detektiert werden, während die Aktivierung der Zellen mit Kontaktallergenen keinen Anstieg der STAT5-Phosphorylierung verursachte (Abb. 14c).

Die Aktivierung von STAT6 konnte sowohl in Monocyten (Abb. 14d) als auch in dendritischen Zellen (Abb. 13d) durch Stimulation mit IL-4 gezeigt werden. Nach Aktivierung mit den Kontaktallergenen MCI/MI, Thiomersal, TNCB oder Formaldehyd konnte jedoch kein Anstieg der Phosphorylierung von STAT6 detektiert werden. Ein diskreter Anstieg der Phosphorylierung von STAT-Molekülen konnte also nur nach Stimulation von dendritischen Zellen mit Thiomersal bei STAT3 und STAT4 in je zwei

von vier Experimenten beobachtet werden. Im Vergleich zur Positivkontrolle waren dies jedoch nur geringe Unterschiede zum Anteil an phosphoryliertem STAT in nicht stimulierten Zellen, die nicht in jedem Experiment nachzuvollziehen waren. Dennoch wurden zur weiteren Klärung immunocytochemische Präparate von dendritischen Zellen angefertigt, die die intrazelluläre Verteilung der phosphorylierten STAT3- bzw. STAT4-Molekülen nach Stimulation mit MCI/MI, Thiomersal, IL-10 oder IFN- $\alpha$  zeigen (Abb. 15).



**Abb. 15: Nachweis von P-STAT3 und P-STAT4 im Zellkern von dendritischen Zellen**

Reife dendritische Zellen wurden mit MCI/MI (1,5  $\mu$ g/ml), Thiomersal (2  $\mu$ g/ml), IL-10 (10ng/ml) oder IFN- $\alpha$  (1000U/ml) stimuliert, mit Methanol permeabilisiert und mit Antikörpern gegen P-STAT3 oder P-STAT4 und DTAF-markiertem Sekundär-Antikörper gefärbt. Die Präparate wurden im Fluoreszenzmikroskop (1000x) analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Versuchen.

Die Stimulation mit IL-10 führt zu einer Translokation von P-STAT3 in den Zellkern der dendritischen Zellen. Nach Stimulation mit MCI/MI oder Thiomersal ist jedoch keine Färbung des Zellkerns zu erkennen. Auch die P-STAT4 Färbung zeigt nur für die Positivkontrolle mit IFN- $\alpha$ -stimulierten Zellen eine eindeutige Translokation von P-STAT4 in den Zellkern. In MCI/MI- bzw. Thiomersal-stimulierten Zellen ist keine verstärkte Fluoreszenz im Zellkern zu beobachten.

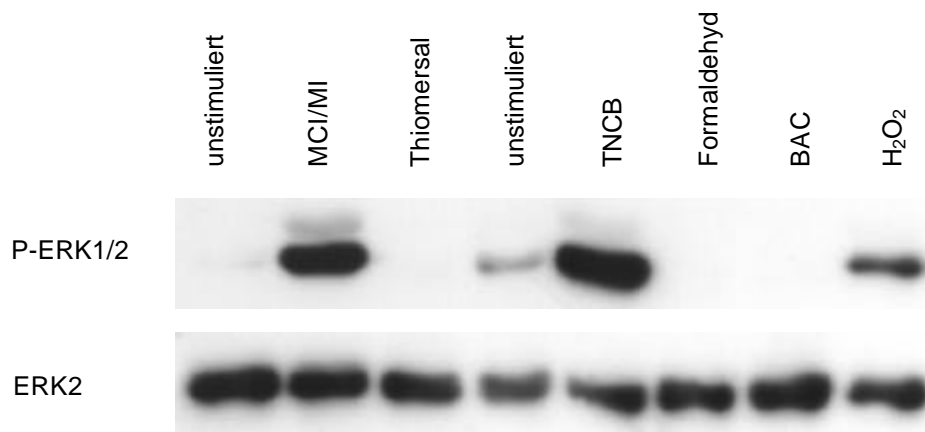
### 3.3 Aktivierung von MAP Kinasen durch Kontaktallergene

Die Aktivierung der MAP Kinasen ERK und p38 durch verschiedene Kontaktallergene sollte in reifen und unreifen dendritischen Zellen als Modell für epidermale Langerhans-Zellen charakterisiert werden.

#### 3.3.1 Aktivierungsmuster für verschiedene Kontaktallergene

Dendritische Zellen wurden mit den Kontaktallergenen MCI/MI, Thiomersal, TNCB und Formaldehyd stimuliert und auf die Aktivierung der MAP Kinasen ERK und p38 hin untersucht. Als Vergleichssubstanzen wurden das Irritanz Benzalkoniumchlorid eingesetzt sowie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), um die Zellen oxidativem Streß auszusetzen. Der Nachweis der Aktivierung von ERK und p38 wurde durch den Einsatz von phosphospezifischen Antikörpern erbracht, die gegen die aktivierten Formen der Kinasen gerichtet sind (Yung et al. 1997).

#### Aktivierung der MAP Kinase ERK



**Abb. 16: ERK-Phosphorylierung nach Stimulation mit Kontaktallergenen**

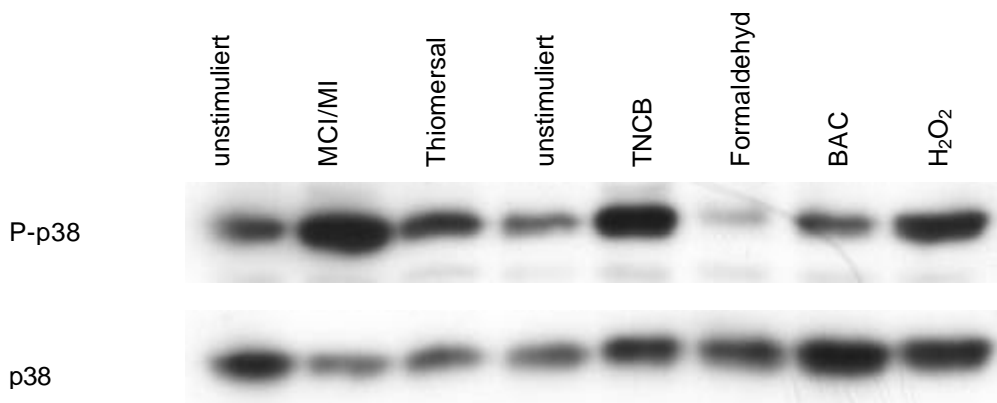
Reife DC wurden mit den Kontaktallergenen MCI/MI (1,5µg/ml), Thiomersal (2µg/ml), TNCB (1µg/ml) und Formaldehyd (200µg/ml) sowie dem Irritanz BAC (4µg/ml) oder mit  $H_2O_2$  (0,6µM) für 20min stimuliert. Die Lysate wurden im Western Blot analysiert. Die Blots wurden nacheinander mit Antikörpern gegen phosphoryliertes ERK und ERK2 detektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus fünf unabhängigen Versuchen.



Nach Stimulation mit MCI/MI und mit TNCB konnte ein deutlicher Anstieg der phosphorylierten Form von ERK1/2 beobachtet werden. Beide Isoformen werden von ERK aktiviert, wobei P-ERK2 deutlich stärker nachzuweisen ist. Durch Stimulation mit den Kontaktallergenen Thiomersal und Formaldehyd und auch mit dem Irritant Benzalkoniumchlorid konnte keine Phosphorylierung von ERK hervorgerufen werden. Oxidativer Streß dagegen führt zu einer meßbaren jedoch weniger deutlichen Phosphorylierung von ERK (Abb. 16) als Stimulation mit MCI/MI oder TNCB. Als Kontrolle wurde unphosphoryliertes ERK2 gefärbt. Die Detektion von ERK2 zeigt, daß in allen Proben annähernd gleiche Proteinmengen vorhanden sind, wie vor dem Western Blot durch Bestimmung des Proteingehaltes der Lysate errechnet. Die Färbung zeigt zudem, daß es innerhalb der 20minütigen Stimulation nicht zu einer Hochregulation von ERK2 kommt.

#### Aktivierung der MAP Kinase p38

Auch die Aktivierung der MAP Kinase p38 wurde im Western Blot überprüft (Abb. 17).



**Abb. 17: p38-Phosphorylierung nach Stimulation mit Kontaktallergenen**

Reife DC wurden mit den Kontaktallergenen MCI/MI (1,5µg/ml), Thiomersal (2µg/ml), TNCB (1µg/ml) und Formaldehyd (200µg/ml) sowie dem Irritant BAC (4µg/ml) oder mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,6µM) für 20min stimuliert. Die Lysate wurden im Western Blot analysiert. Die Blots wurden nacheinander mit Antikörpern gegen phosphoryliertes p38 und gegen p38 detektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus fünf unabhängigen Versuchen.

Für p38 findet man ein differenziertes Aktivierungsmuster durch die vier eingesetzten Kontaktallergene. Nach Stimulationen mit MCI/MI und TNCB kommt es zu einem deutlichen Anstieg der phosphorylierten Form von p38. Thiomersal zeigte einen von Spender zu Spender schwankenden Effekt auf p38, während Formaldehyd nur in der Minderzahl der Versuche einen minimalen Anstieg der p38-Phosphorylierung verursachte. Das Irritanz Benzalkoniumchlorid zeigt keinen messbaren Einfluß auf p38, während oxidativer Streß zur Aktivierung von p38 führt.

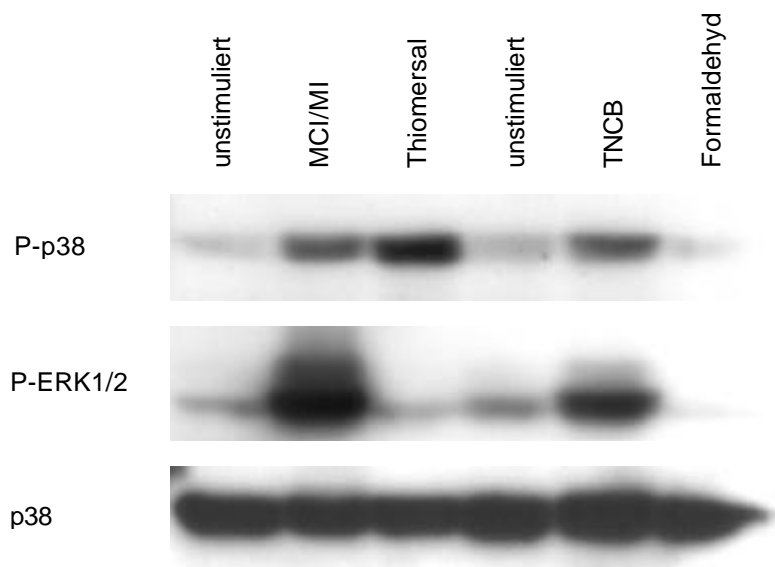
Bezieht man den Ladungsabgleich durch Färbung von p38 mit ein, verdeutlicht sich das oben beschriebene Bild. MCI/MI und TNCB bewirken eine deutliche Aktivierung von p38, während Thiomersal zu einer schwächeren und Stimulation mit Formaldehyd nicht zur Phosphorylierung von p38 führt.

### **3.3.2 Aktivierung von ERK und p38 in unreifen dendritischen Zellen**

Die in reifen dendritischen Zellen beobachteten Aktivierungsmuster der MAP Kinasen ERK und p38 durch verschiedene Kontaktallergene wurden in unreifen dendritischen Zellen überprüft. Unreife dendritische Zellen wurden mit den Kontaktallergenen MCI/MI, Thiomersal, TNCB und Formaldehyd in subtoxischen aber aktivierenden Konzentrationen stimuliert. Die Zellysate wurden anschließend im Western Blot untersucht und mit phosphospezifischen Antikörpern für die phosphorylierten Formen von p38 und ERK gefärbt. Um die aufgetragene Proteinmenge zu überprüfen, wurde auch p38 gefärbt.

Wie in Abbildung 18 zu sehen, kann man auch in unreifen dendritischen Zellen eine deutliche Aktivierung von ERK und p38 durch die Kontaktallergene MCI/MI und TNCB beobachten. Stimulation mit Thiomersal führt zur Aktivierung von p38, nicht jedoch zur Phosphorylierung von ERK. Formaldehyd bewirkt nach 20minütiger Stimulation in subtoxischer Konzentration weder ERK- noch p38-Aktivierung in unreifen dendritischen Zellen.

Mit reifen und unreifen dendritischen Zellen werden annähernd identische Aktivierungsmuster der MAPKinasen p38 und ERK durch die vier eingesetzten beobachtet.



**Abb. 18: Aktivierung von p38 und ERK durch Kontaktallergenen in unreifen DC**

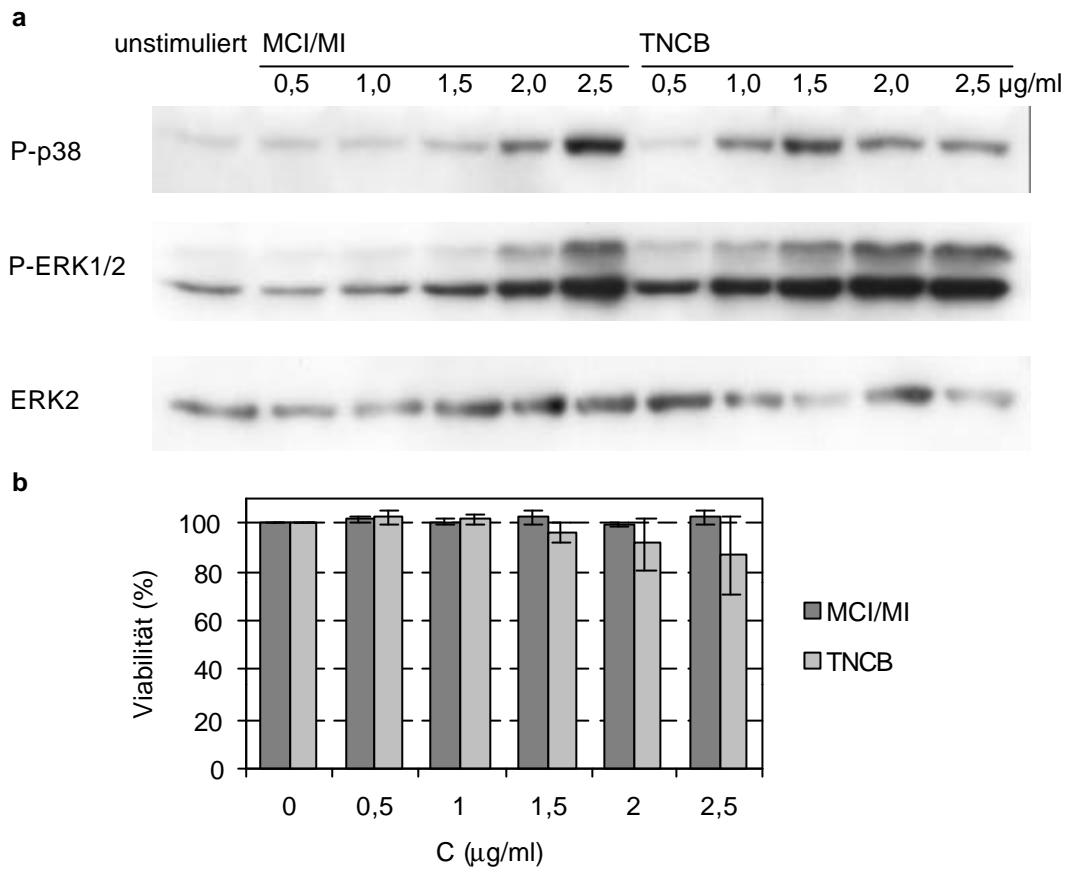
Unreife DC wurden mit den Kontaktallergenen MCI/MI (1,5µg/ml), Thiomersal (2µg/ml), TNCB (1µg/ml) und Formaldehyd (200µg/ml) für 20min stimuliert. Die Lysate wurden im Western Blot analysiert. Die Blots wurden nacheinander mit Antikörpern gegen phosphoryliertes p38, phosphoryliertes ERK und gegen p38 detektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchen.

Die in Abb. 18 präsentierten Ergebnisse zeigen keine grundlegenden Unterschiede zwischen unreifen und reifen dendritischen Zellen im Hinblick auf die Aktivierung der MAP Kinasen p38 und ERK durch Kontaktallergene.

### 3.3.3 Dosisabhängigkeit der ERK-Aktivierung

Als wichtiger Parameter der Aktivierung von ERK durch die Kontaktallergene MCI/MI und TNCB wurde die Dosisabhängigkeit der ERK- und p38-Phosphorylierung untersucht (Abb. 19).

Durch Vergleich der Viabilität der Zellen nach Stimulation mit ansteigenden Konzentrationen dieser Allergene wurde die optimale subtoxische Dosis für eine zuverlässige Aktivierung von ERK durch MCI/MI und TNCB ermittelt. Sowohl für MCI/MI als auch für TNCB ist ein dosisabhängiger Anstieg der Phosphorylierung von ERK und p38 im gewählten Konzentrationsbereich von 0,5 bis 2,5µg/ml zu erkennen.



**Abb. 19: Dosisabhängigkeit der Aktivierung von p38 und ERK durch MCI/MI und TNCB**

Reife DC wurden mit den Kontaktallergenen MCI/MI und TNCB in ansteigender Konzentration für 20 Minuten stimuliert.

- a Die Lysate wurden im Western Blot analysiert. Die Blots wurden nacheinander mit Antikörpern gegen phosphoryliertes p38, phosphoryliertes ERK und gegen ERK2 detektiert.
- b Die Zellen wurden mit Propidium-Iodid behandelt, der Anteil an toten Zellen wurde im FACScan bestimmt. Die Viabilität ist angegeben in Prozent vom Wert für unbehandelte Zellen.

Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchen.

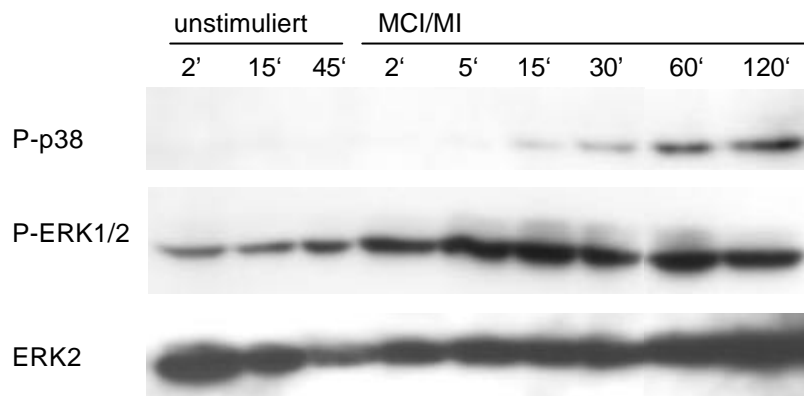
Nach Stimulation mit MCI/MI nimmt die Phosphorylierung von ERK und p38 ab einer Konzentration von 1,5µg/ml bis zu einer Konzentration von 2,5µg/ml deutlich zu.

Die Viabilität der Zellen bleibt bis zu den maximal eingesetzten 2,5µg/ml MCI/MI konstant. Mit TNCB wird die maximale Phosphorylierung von p38 schon bei einer Konzentration von 1,5µg TNCB pro ml erreicht. Die Phosphorylierung von ERK nimmt bei höheren Konzentrationen nur noch leicht zu. Gleichzeitig sinkt allerdings die Viabilität der Zellen bei Konzentrationen über 1,5µg/ml deutlich.

Aus diesen Daten wurde eine optimale Konzentration von 2,5µg/ml MCI/MI und 1,5µg/ml TNCB entsprechend etwa 18µM MCI und 15µM TNCB abgeleitet, um die Aktivierung von p38 und ERK durch MCI/MI und TNCB bei stabiler Viabilität zu untersuchen.

### 3.3.4 Zeitkinetik der ERK-Aktivierung durch MCI/MI

Mit dem Modellallergen MCI/MI wurde der zeitliche Verlauf der Aktivierung von p38 und ERK untersucht.



**Abb. 20: Zeitlicher Verlauf der Aktivierung von p38 und ERK durch MCI/MI in reifen DC**

Reife DC wurden mit dem Kontaktallergen MCI/MI (2,5 µg/ml) für verschiedene Zeiten stimuliert. Die Lysate wurden im Western Blot analysiert. Die Blots wurden nacheinander mit Antikörpern gegen phosphoryliertes p38, phosphoryliertes ERK und gegen ERK2 detektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus zwei unabhängigen Versuchen.

Wie in Abbildung 20 dargestellt, kann man für ERK eine schnelle und anhaltende Aktivierung beobachten. Schon nach fünf Minuten ist eine deutliche Phosphorylierung von ERK zu erkennen, die nach fünf Minuten ihr Maximum erreicht. Die Phosphorylierung hält auf diesem Niveau mindestens bis zu zwei Stunden an.

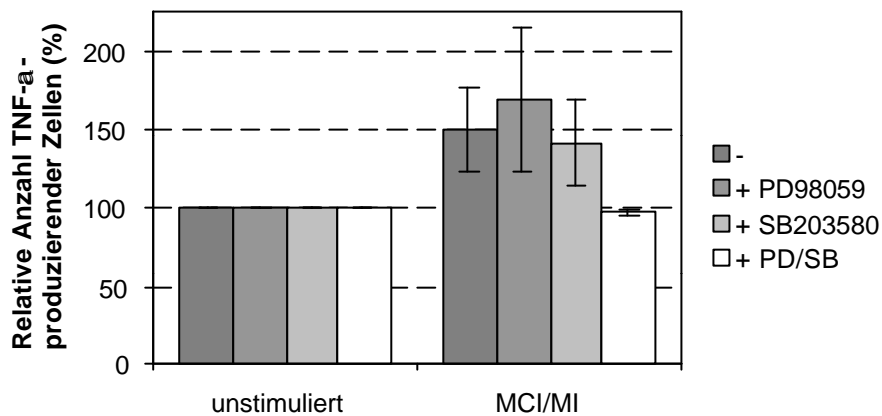
Die Aktivierung von p38 dagegen beginnt schwach nach fünfzehn Minuten und erreicht ihren Höhepunkt erst nach einer Stunde. MCI/MI bewirkt in dendritischen Zellen eine schnelle und anhaltende Aktivierung von ERK, während die Phosphorylierung von p38 zeitlich verzögert auftritt.

In den folgenden Kapiteln konzentrieren sich die Untersuchungen auf die Aktivierung von ERK als frühen Mechanismus der Aktivierung von APC durch die Kontaktallergene

MCI/MI und TNCB. Die Stimulationszeit wurde für die nachfolgenden Versuche, wenn nicht anders angegeben, auf zehn Minuten reduziert.

### 3.3.5 Inhibition der TNF- $\alpha$ -Produktion durch MAPK-Inhibitoren

Es sollte überprüft werden, ob die Aktivierung der MAP Kinasen p38 und ERK auch eine funktionelle Relevanz besitzt. Daher wurde überprüft, welche Bedeutung ERK und p38 für die durch MCI/MI induzierte TNF- $\alpha$  Produktion haben. Dazu wurden Inhibitoren eingesetzt, die den ERK-Signalweg (PD98059 inhibiert MEK1/2) bzw. den p38 Signalweg (SB203580) inhibieren (Abb. 21).



**Abb. 21: Einfluß der Inhibition des ERK- und p38-Signalweges auf die TNF- $\alpha$ -Produktion**

Reife DC wurden mit 50 $\mu$ M PD98059 oder/und 20 $\mu$ M SB203580 30min bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit MCI/MI (2,5 $\mu$ g/ml) stimuliert. Die Zellen wurden nach 1h gewaschen und in Elispot-Platten überführt. Nach 24h wurden die Platten detektiert und die Spots gezählt. Dargestellt ist die Anzahl TNF- $\alpha$ -produzierender Zellen nach MCI/MI Stimulation in Prozent im Vergleich zu unbehandelten Zellen. n=3

In Anwesenheit von PD98059 konnte keine Verminderung der TNF- $\alpha$ -Produktion nach Stimulation mit MCI/MI beobachtet werden. Auch mit SB203580 ist nur ein minimaler Effekt zu erkennen. Bei Einsatz beider Inhibitoren jedoch ist eine deutliche Verminderung der Anzahl TNF- $\alpha$ -produzierender Zellen zu erkennen, die dem Niveau unbehandelter Zellen entspricht.

**Tab. 12: Viabilität von reifen DC nach Präinkubation mit MAPK Inhibitoren**

Reife DC wurden mit PD98059 oder/und SB203580 in verschiedenen Konzentrationen für 30min vorinkubiert und anschließend für 10min mit MCI/MI stimuliert. Die Viabilität wurde mit Propidiumjodid-Färbung im FACScan bestimmt. Die Werte entsprechen dem prozentualen Anteil lebender Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen und der Mittelwertabweichung aus 3 Experimenten.

<b>Viabilität [%] mit MAPK Inhibitoren</b>				
	-	PD98059	SB203580	PD+SB
		50µM	20µM	50/20µM
<b>MCI/MI</b>	98,7	100,2	101	99
	± 1,11	± 3,92	± 0,67	± 2,67

Die Viabilität der Zellen wurde durch den Einsatz der Inhibitoren nicht beeinträchtigt (Tab. 12).

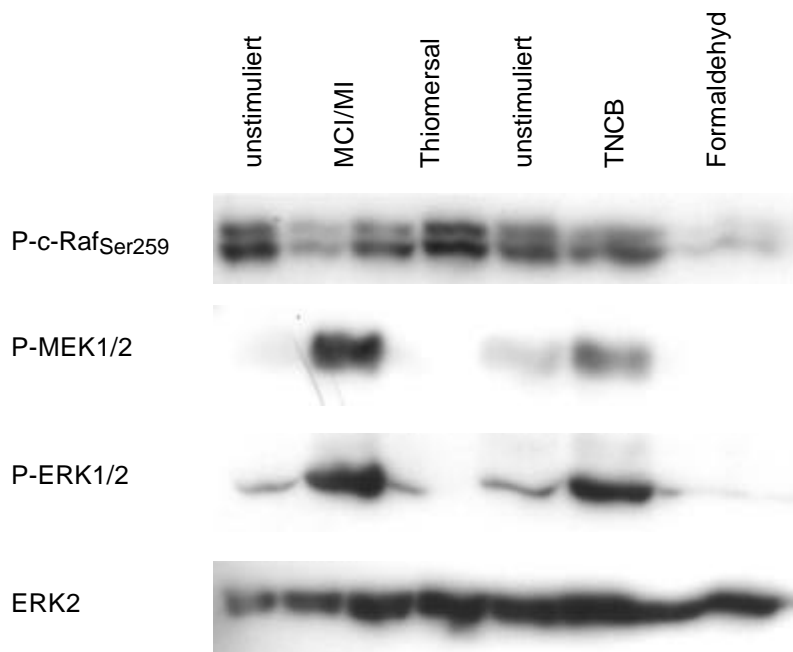
Mit einer Kombination aus Inhibitoren für beide Signalwege konnte die Produktion des pro-inflammatorischen Cytokins TNF- $\alpha$  von dendritischen Zellen nach Stimulation mit MCI/MI verhindert werden.

### 3.4 Upstream Mechanismen der ERK-Aktivierung: Die ERK-Core-Kaskade

In diesem Kapitel sind Untersuchungen zur Aktivierung von ERK direkt vorgeschalteten Kinasen auf MAPK Kinase und MAPKK Kinase Ebene zusammengefasst. Dabei handelt es sich um die Bestandteile der „ERK-Core-Kaskade“ ERK1/2, MEK1/2 und Raf.

#### 3.4.1 Beteiligung der ERK-Core-Kaskade

In einem ersten Ansatz, die Aktivierung der ERK vorangehenden Kinasen MEK und Raf zu untersuchen, wurden wiederum Western Blots mit phosphospezifischen Antikörpern gefärbt, die gegen Aktivierungs-modulierende Phosphorylierungsstellen gerichtet sind. So konnte P-MEK1/2 nachgewiesen werden, das der aktivierten Form von MEK entspricht. Die MAPKK Kinase c-Raf wurde mit einem Antikörper detektiert, der die Phosphorylierungsstelle Serin 259 mit inhibitorischer Funktion erkennt.

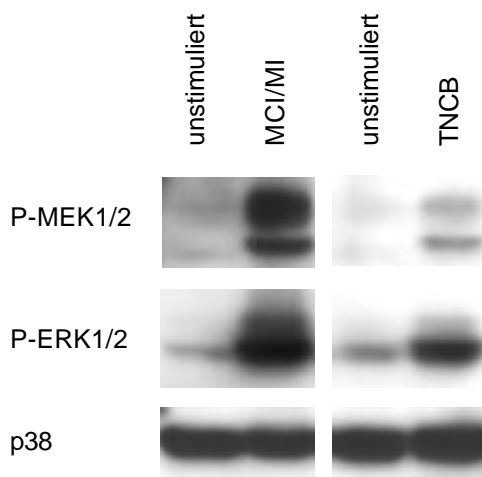


**Abb. 22: Aktivierung der „ERK-Core-Kaskade“ nach Stimulation mit Kontaktallergenen**  
Reife DC wurden mit den Kontaktallergenen MCI/MI (2,5µg/ml), Thiomersal (2µg/ml), TNCB (1,5µg/ml) und Formaldehyd (200µg/ml) für 10min bei 37°C stimuliert. Die Zell-Lysate wurden im Western Blot analysiert. Die Blots wurden nacheinander mit Antikörpern gegen P-c-Raf, P-MEK1/2, P-ERK1/2 und gegen ERK1/2 detektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.



In Abbildung 22 wird gezeigt, daß für die MAPK Kinase MEK1/2 das gleiche Aktivierungsmuster durch die vier Kontaktallergene MCI/MI, TNCB, Thiomersal und Formaldehyd zu erkennen ist wie für ERK1/2. MCI/MI und TNCB bewirken eine deutliche Zunahme der phosphorylierten Form von MEK1/2, während die Stimulation mit Thiomersal und Formaldehyd keinen Effekt auf die Phosphorylierung von MEK1/2 hat. Der Nachweis der Phosphorylierung von c-Raf an Ser259, die mit der Verminderung der Aktivität von c-Raf in Verbindung gebracht wird, zeigt einen Rückgang der Phosphorylierung nach Stimulation mit MCI/MI. Auch für TNCB, Thiomersal und Formaldehyd ist eine leichte Abnahme der Phosphorylierung zu beobachten. Um diesem Hinweis auf eine Beteiligung von c-Raf an der Aktivierung von ERK durch die Kontaktallergene MCI/MI und TNCB nachzugehen, wurde ein c-Raf-Kinase-Assay durchgeführt).

Die Aktivierung von MEK1/2 durch MCI/MI und TNCB konnte auch in unreifen dendritischen Zellen nachgewiesen werden (Abb. 23).



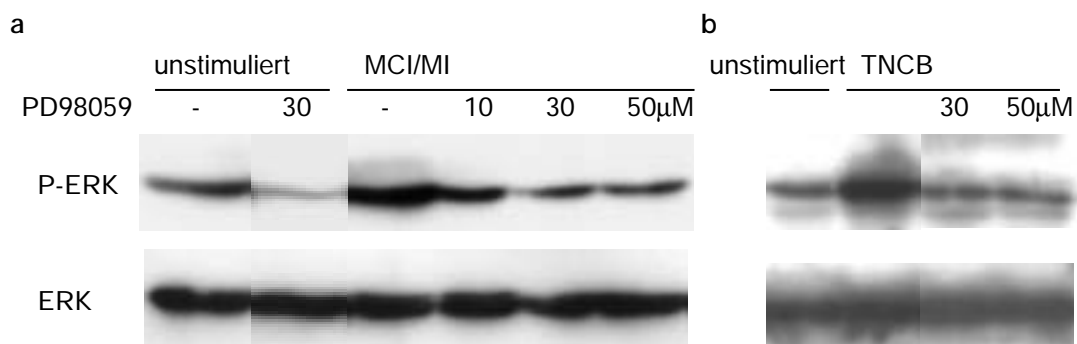
**Abb. 23: Aktivierung von MEK1/2 durch MCI/MI und TNCB in unreifen DC**

Unreife DC wurden mit den Kontaktallergenen MCI/MI (2,5µg/ml) und TNCB (1,5µg/ml) für 10min bei 37°C stimuliert. Die Lysate wurden im Western Blot analysiert. Die Blots wurden nacheinander mit Antikörpern gegen P-MEK1/2, P-ERK1/2 und p38 detektiert. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchen.

### Inhibition von MEK1/2

Um die Verknüpfung von MEK1/2 Phosphorylierung und Aktivierung von ERK zu zeigen, also die Beteiligung von MEK1/2 an der Aktivierung von ERK, wurden reife dendritische Zellen vor der Stimulation mit MCI/MI und TNCB mit dem MEK1/2 Inhibitor PD98059 behandelt.

Wie in Abbildung 24 dargestellt, kann die Phosphorylierung von ERK nach Stimulation von reifen dendritischen Zellen mit MCI/MI und TNCB durch Vorinkubation mit PD98059 dosisabhängig inhibiert werden.



**Abb. 24: Inhibition von MEK1/2 mit PD98059**

Reife DC wurden mit PD98059 in verschiedenen Konzentrationen 30min bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit den Kontaktallergenen (a) MCI/MI (2,5μg/ml) und (b) TNCB (1,5μg/ml) für 10min stimuliert. Die Lysate wurden im Western Blot analysiert. Die Blots wurden nacheinander mit Antikörpern gegen P-ERK1/2 und ERK detektiert. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus fünf (a) bzw. drei (b) unabhängigen Versuchen.

Bei einer Konzentration von 30μM PD98059 ist die Reduktion der ERK-Phosphorylierung auf das Niveau von nicht stimulierten Zellen gesunken. In den eingesetzten Konzentrationen war kein toxischer Effekt von PD98059 bei gleichzeitiger Stimulation mit MCI/MI oder TNCB zu beobachten (Tab. 13).

**Tab. 13: Viabilität von reifen DC nach Präinkubation mit PD98059**

Reife DC wurden mit PD98059 in verschiedenen Konzentrationen für 30min vorinkubiert und anschließend für 10min mit MCI/MI oder TNCB stimuliert. Die Viabilität wurde mit Propidiumjodid-Färbung im FACScan bestimmt. Die Werte entsprechen dem prozentualen Anteil lebender Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen und der Mittelwertabweichung aus 5 Experimenten.

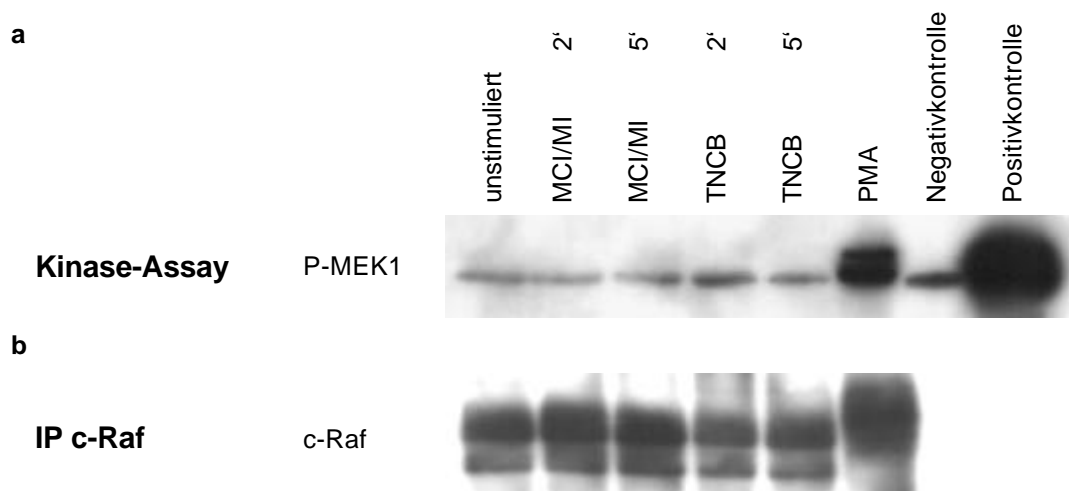
Viabilität [%] mit PD98059				
	-	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M	50 $\mu$ M
<b>MCI/MI</b>	98,4	100,5	97,25	100,2
	$\pm 1,92$	$\pm 0,5$	$\pm 4,75$	$\pm 3,92$
<b>TNCB</b>	98,5	-	102,5	107
	$\pm 2,5$	-	$\pm 3,5$	$\pm 2$

Sowohl die Aktivierung von MEK1/2 als auch die Beteiligung dieser MAPK Kinase an der Aktivierung von ERK durch MCI/MI und TNCB konnte gezeigt werden.

### 3.4.2 Aktivität von c-Raf

Um die Rolle von c-Raf aufbauend auf den Ergebnissen aus Abschnitt 3.5.1 mit phosphospezifischen Antikörpern zu untersuchen, wurde ein Kinase Assay für c-Raf durchgeführt. Aus Lysaten von MCI/MI-, TNCB- oder PMA-stimulierten reifen dendritischen Zellen wurde c-Raf präzipitiert. Als Substrat für den Kinase-Assay wurde inaktives MEK1/2 eingesetzt. In Abbildung 25 ist die Phosphorylierung von MEK1/2 durch präzipitiertes c-Raf dargestellt. Zur Überprüfung der Immunpräzipitation wurde c-Raf im Western Blot detektiert

Nur in Lysaten mit PMA stimulierter Zellen konnte Aktivität von c-Raf nachgewiesen werden. Dagegen war in Zellen, die mit den Kontaktallergenen MCI/MI und TNCB stimuliert wurden, weder nach zwei noch nach fünf Minuten c-Raf-Aktivität detektierbar. Die Immunpräzipitation von c-Raf nach Stimulation mit PMA zeigt eine Verschiebung der Laufstrecke von c-Raf im Vergleich zu allen anderen Ansätzen..



**Abb. 25: In-vitro Kinase Assay für c-Raf**

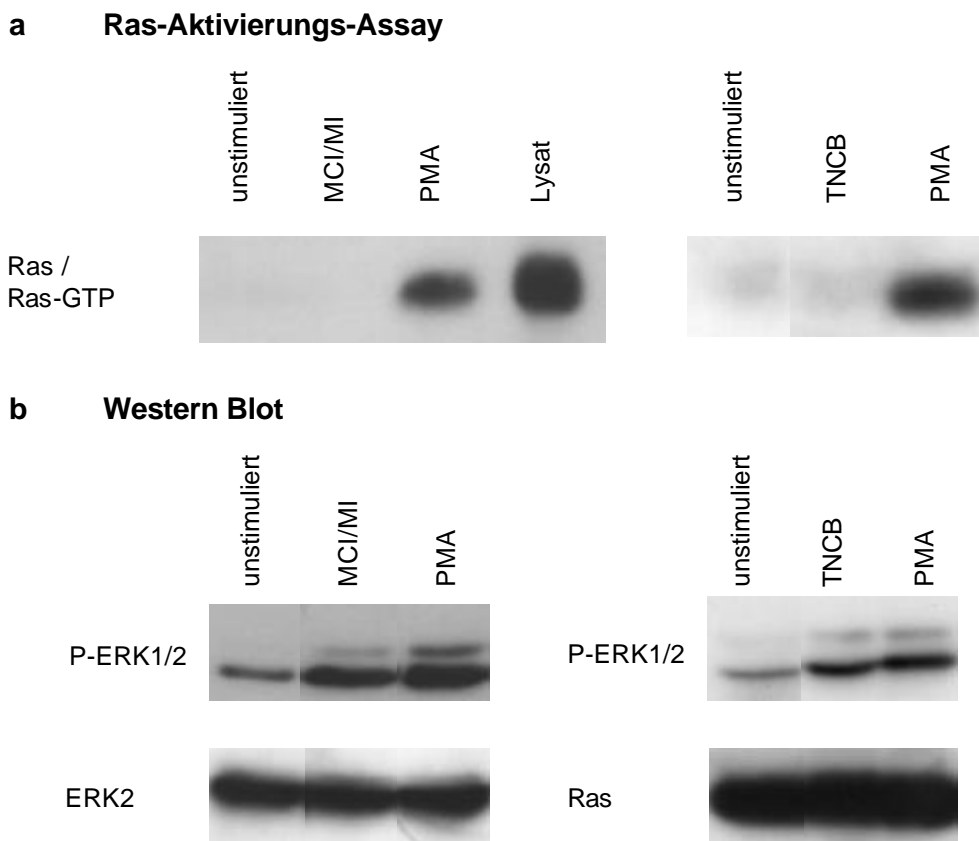
Reife DC wurden mit den Kontaktallergenen MCI/MI (2,5µg/ml) und TNCB (1,5µg/ml) für 2 oder 5min oder mit PMA (30nM) für 5min stimuliert. Aus den Lysaten wurde c-Raf präzipitiert und in den Kinase-Assay eingesetzt.

- a Als Nachweis für die Aktivität von c-Raf wurde P-MEK2 im Western Blot detektiert. Die Detektion von MEK1/2 dient zum Nachweis, daß gleiche Mengen Substrat eingesetzt wurden.
- b Immunpräzipitiertes c-Raf wurde nach dem Kinase Assay im Western Blot nachgewiesen. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchen.

Trotz dem in Abschnitt 3.4.1 erhaltenen Hinweis auf eine Aktivierung von c-Raf durch Kontaktallergene konnte im In-vitro-Kinase-Assay keine Aktivität von c-Raf nach Stimulation mit MCI/MI oder TNCB nachgewiesen werden.

### 3.5 Upstream Mechanismen der ERK-Aktivierung: Die GTPase Ras

Ein wichtiges Upstream Element der MAP Kinase ERK ist die kleine GTPase Ras. Um das in Kapitel 1.3.4 für Stickoxid beschriebene Modell der Rezeptor-unabhängigen Aktivierung von Ras für Kontaktallergene zu überprüfen, wurde die Aktivierung von Ras durch Kontaktallergene untersucht. In einem Ras-Aktivierungs-Assay wurde aktiviertes also GTP-gebundenes Ras aus den Lysaten präzipitiert.



**Abb. 26: Ras - Aktivierungsassay**

Reife DC wurden mit den Kontaktallergenen MCI/MI (2,5µg/ml) und TNCB (1,5µg/ml) oder mit PMA (20nM) für 10 min stimuliert. Aus den Lysaten wurde mit RBD-Agarose Ras-GTP präzipitiert.

a Präzipitiertes Ras-GTP wurde im Western Blot aufgetrennt und mit Anti-Ras Antikörpern detektiert.

b Als Kontrolle für die Aktivierung von ERK wurden die Gesamt-Lysate im Western Blot aufgetrennt.

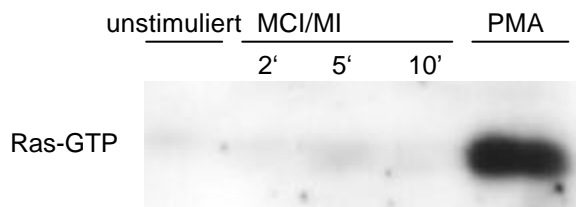
Die Blots wurden mit Antikörpern gegen P-ERK1/2, ERK2 und Ras gefärbt.

Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus fünf unabhängigen Versuchen

Nur aus den Lysaten der mit PMA behandelten Zellen konnte Ras-GTP präzipitiert werden. In unstimulierten dendritischen Zellen und in Zellen, die mit den Kontaktallergenen MCI/MI und TNCB stimuliert wurden, ist kein Ras-GTP detektierbar. Als Kontrolle für die Laufstrecke von Ras bzw. Ras-GTP wurde in Abb. 26a neben den Präzipitaten auch ein Lysat aufgetragen.

Die für PMA-stimulierte Zellen erhaltene Bande konnte eindeutig dem Molekulargewicht von Ras zugeordnet werden, während in den lanes der mit Kontaktallergenen stimulierten dendritischen Zellen keine Banden zu finden waren. Abbildung 26b belegt die Aktivierung von ERK in den für den Ras Assay eingesetzten Zellen. Weiterhin konnte die gleichmäßige Expression von Ras gezeigt werden (Abb. 26b. rechts).

Um ausschließen zu können, daß es zu einer transienten Aktivierung von Ras nach Stimulation mit Kontaktallergenen kommt, die nach zehn Minuten nicht mehr nachweisbar ist, wurde die Ras-Aktivierung nach zwei und fünf Minuten Stimulation mit MCI/MI als Modellallergen überprüft.



**Abb. 27: Ras-Aktivierungs-Assay: Zeitkinetik MCI/MI**

Reife DC wurden mit dem Kontaktallergenen MCI/MI (2,5 µg/ml) für 2, 5 oder 10 min oder mit PMA (20nM) für 10 min stimuliert. Aus den Lysaten wurde mit RBD-Agarose Ras-GTP präzipitiert. Präzipitiertes Ras-GTP wurde im Western Blot aufgetrennt und mit einem Anti-Ras Antikörper detektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus zwei unabhängigen Versuchen.

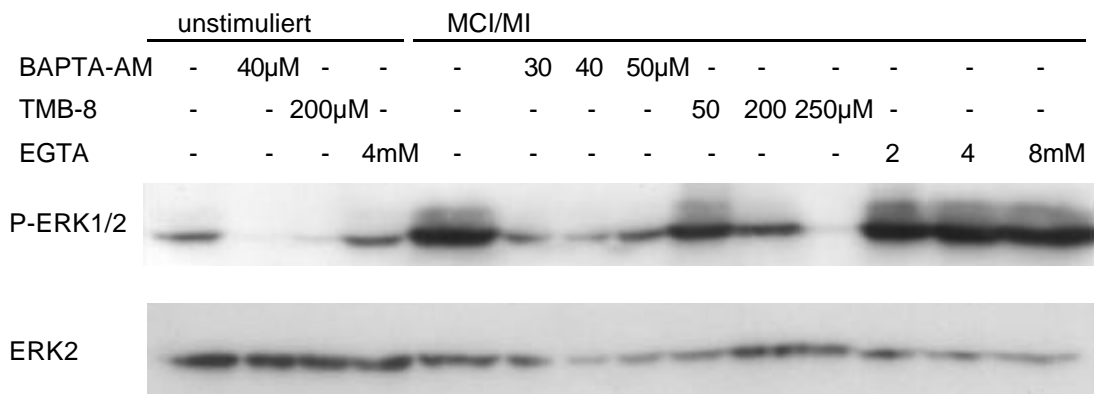
Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus fünf unabhängigen Versuchen. Auch zu früheren Zeitpunkten der Stimulation mit MCI/MI ist, wie in Abbildung 27 gezeigt, keine Aktivierung von Ras nachzuweisen. Lediglich in den Lysaten PMA-stimulierter Zellen wurde Ras-GTP detektiert.

### 3.6 Die Rolle von Calcium

Als weiteres wichtiges Signaltransduktionselement sollte die Rolle des second messenger Calcium geklärt werden.

#### 3.6.1 Einfluß von Calcium auf die ERK-Aktivierung

Durch den Einsatz von Calcium-Chelatoren wurde untersucht, ob Calcium für die Aktivierung von ERK durch die Kontaktallergene MCI/MI und TNCB erforderlich ist. Die Bedeutung der intra- und der extrazellulären Calciumkonzentration wurde mit den folgenden Substanzen analysiert: BAPTA-AM, um intrazelluläres Calcium zu binden, EGTA, um die extrazelluläre Calcium-Konzentration im Medium zu minimieren und TMB-8, das die IP<sub>3</sub>-vermittelte intrazelluläre Calcium-Freisetzung inhibiert. In Abbildung 28 ist der Einfluß dieser Substanzen auf die ERK-Aktivierung durch MCI/MI dargestellt.

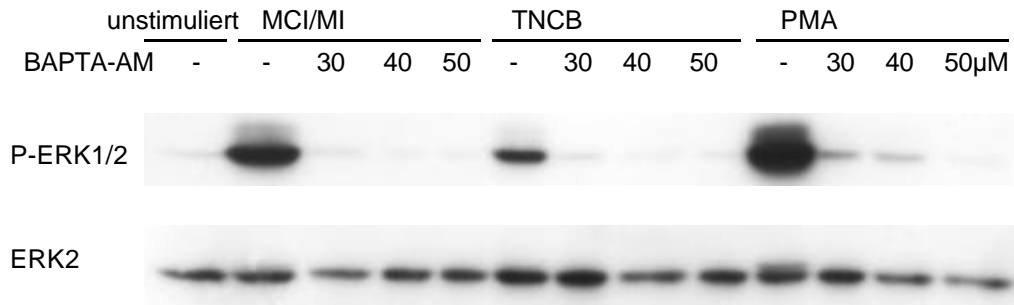


**Abb. 28: Calciumabhängigkeit der ERK-Phosphorylierung durch MCI/MI**

Reife DC wurden mit BAPTA-AM, TMB-8 oder EGTA in den angegebenen Konzentrationen 30min (für EGTA: 5min) bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit dem Kontaktallergen MCI/MI (2,5 µg/ml) 10min stimuliert. Die Lysate wurden im Western Blot analysiert. Die Blots wurden nacheinander mit Antikörpern gegen P-ERK1/2 und ERK2 detektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus fünf unabhängigen Versuchen.

Mit BAPTA-AM, einem Chelator für intrazelluläres Calcium, konnte eine vollständige Inhibition der ERK-Phosphorylierung durch MCI/MI beobachtet werden. Die Eliminierung von extrazellulärem Calcium durch EGTA hat dagegen keinen Einfluß. Durch Inhibition der intrazellulären IP<sub>3</sub>-vermittelten Calcium-Freisetzung mit TMB-8 wurde eine konzentrationsabhängige Verminderung der ERK-Aktivierung durch MCI/MI bewirkt.

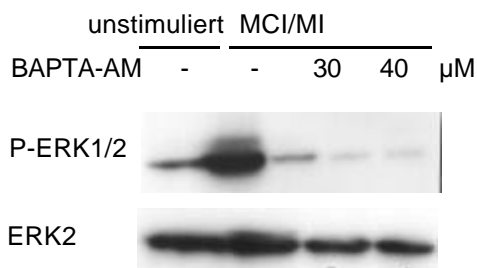
Wie in Abbildung 29 dargestellt, konnte die Abhängigkeit der ERK-Phosphorylierung vom intrazellulären Calciumspiegel auch für das Kontaktallergen TNCB und die Vergleichssubstanz PMA gezeigt werden, indem die Zellen vor der Stimulation mit BAPTA-AM inkubiert wurden.



**Abb. 29: Abhängigkeit der ERK-Phosphorylierung durch MCI/MI, TNCB und PMA von  $[Ca^{2+}]_i$**

Reife DC wurden mit BAPTA-AM in den angegebenen Konzentrationen 30min bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit den Kontaktallergenen MCI/MI (2,5 µg/ml) oder TNCB (1,5µg/ml) bzw. mit PMA (20nM) für 10min stimuliert. Die Lysate wurden im Western Blot analysiert. Die Blots wurden nacheinander mit Antikörpern gegen P-ERK1/2 und ERK2 detektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus vier unabhängigen Versuchen.

Anschließend wurde überprüft, ob die Abhängigkeit der ERK-Phosphorylierung durch MCI/MI von der intrazellulären Calcium-Konzentration auch in unreifen dendritischen Zellen reproduzierbar ist.



**Abb. 30: Abhängigkeit der ERK-Phosphorylierung durch MCI/MI von  $[Ca^{2+}]_i$  in unreifen DC**

Unreife DC wurden mit BAPTA-AM in den angegebenen Konzentrationen 30min bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit dem Kontaktallergen MCI/MI (2,5µg/ml) für 10min stimuliert. Die Lysate wurden im Western Blot analysiert. Die Blots wurden nacheinander mit Antikörpern gegen P-ERK1/2 und ERK2 detektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchen.

Wie in Abbildung 30 gezeigt, wird auch in unreifen dendritischen Zellen durch Einsatz von BAPTA-AM die ERK-Phosphorylierung bei Stimulation mit MCI/MI vollständig inhibiert. Auch in unreifen dendritischen Zellen ist die Aktivierung der MAP Kinase ERK abhängig vom intrazellulären Calcium-Spiegel.



Parallel zu den proteinbiochemischen Untersuchungen wurde die Toxizität der eingesetzten Substanzen mit Propidium-Iodid-Färbung im FACScan überprüft. In Tabelle 14 ist die Viabilität der Zellen nach Vorinkubation mit dem jeweiligen Inhibitor und Stimulation mit Kontaktallergenen aufgeführt.

**Tab. 14: Viabilität von DC nach Präinkubation mit BAPTA-AM, TMB-8 und EGTA**

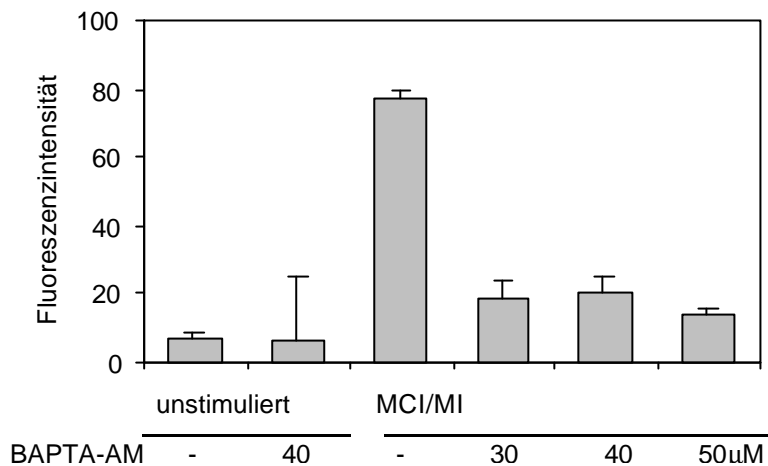
Reife DC wurden mit BAPTA-AM, TMB-8 oder EGTA in verschiedenen Konzentrationen 30min vorinkubiert (EGTA 5min) und anschließend 10min mit MCI/MI, TNCB oder PMA stimuliert. Der Anteil viabler Zellen wurde mit Propidiumjodid-Färbung im FACScan bestimmt. Angegeben ist die Viabilität in Prozent im Vergleich zu unbehandelten Zellen und die Mittelwertabweichung aus mindestens 4 Experimenten.

	Viabilität [%] mit:									
	-	BAPTA-AM			TMB-8			EGTA		
		30µM	40µM	50µM	50µM	200µM	250µM	2mM	4mM	8mM
<b>MCI/MI</b>	100	98	95	94	97	96	95	101	100	99
	± 1,5	± 7	± 5,2	± 5,5	± 4	± 4,7	± 6,9	± 1,6	± 0,4	± 0,9
<b>TNCB</b>	99	97	96	95	100	93	96	-	-	-
	± 4	± 2,75	± 2	± 2	± 0,7	± 4,7	± 8			
<b>PMA</b>	99	96	93	94	-	-	-	-	-	-
	±1,6	± 3,2	± 3,3	± 4,1						

Mit BAPTA-AM und TMB-8 ist eine geringfügige Beeinträchtigung der Viabilität zu beobachten. Die Viabilität sinkt jedoch nicht unter 93% im Mittel im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

### 3.6.2 Abhängigkeit der Tyrosinphosphorylierung von $[Ca^{2+}]_i$

Um die Rolle von Calcium weiter zu charakterisieren, wurde der Einfluß von BAPTA-AM auf die durch MCI/MI induzierte intrazelluläre Tyrosinphosphorylierung untersucht.

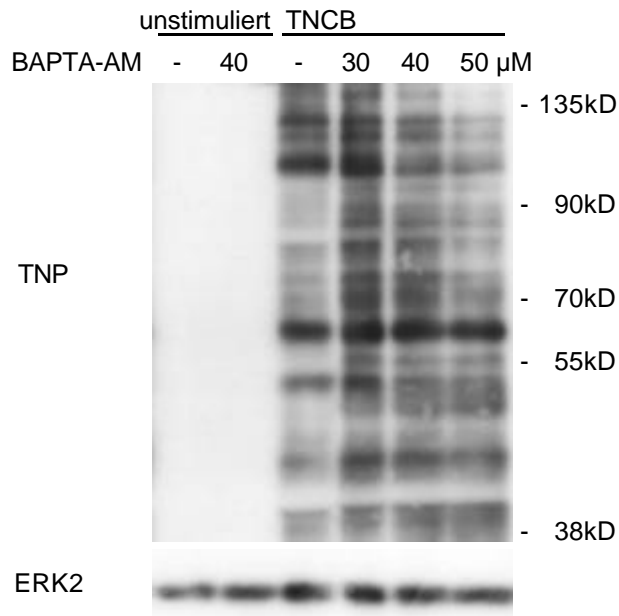


**Abb. 31: Abhängigkeit der Tyrosinphosphorylierung durch MCI/MI von  $[Ca^{2+}]_i$**

Reife DC wurden mit BAPTA-AM in den angegebenen Konzentrationen 30min bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit dem Kontaktallergen MCI/MI (2,5 µg/ml) für 10min stimuliert. Die Zellen wurden permeabilisiert, Phosphotyrosin-Reste wurden mit dem Antikörper PY20-FITC gefärbt und die Fluoreszenzintensität durchflußcytometrisch bestimmt. n=4

Auch der Anstieg der intrazellulären Tyrosinphosphorylierung durch MCI/MI kann durch Vorinkubation mit BAPTA-AM fast vollständig inhibiert werden (Abb. 31).

Um auszuschließen, daß die Wirkung von BAPTA-AM auf die Aktivierung von dendritischen Zellen durch Kontaktallergene darauf zurückzuführen ist, daß die Allergene in Gegenwart von BAPTA-AM nicht an zelluläre Proteine koppeln können, wurde die Bindung von TNCB durch Nachweis von TNP-Resten im Western Blot überprüft.



**Abb. 32: TNP-Bindung in Anwesenheit von BAPTA-AM**

Reife DC wurden mit BAPTA-AM in den angegebenen Konzentrationen 30min bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit dem Kontaktallergen TNCB (1,5 μg/ml) 10min stimuliert. Die Lysate wurden im Western Blot analysiert. Die Blots wurden nacheinander mit Antikörpern gegen TNP-Reste und ERK2 detektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchen.

Wie in Abbildung 32 dargestellt, kann nach Vorinkubation mit BAPTA-AM keine Verminderung der TNP-Bindung beobachtet werden.

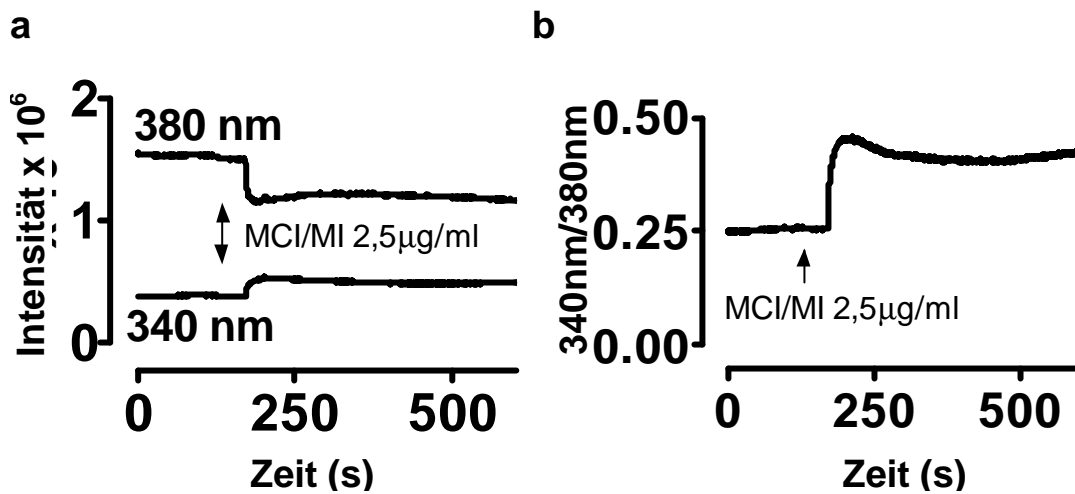
### 3.6.3 Calcium-Mobilisierung durch MCI/MI

Aus den bisher dargestellten Ergebnissen ergibt sich die Frage, ob Kontaktallergene die Mobilisierung von Calcium in dendritischen Zellen bewirken.

Daher wurde in einem nächsten Schritt überprüft, ob es tatsächlich zu Mobilisierung von Calcium durch Kontaktallergene kommt. In diesen Versuchen mit dem Farbstoff Fura-2 konnte lediglich MCI/MI eingesetzt werden, da TNCB eine hohe Eigenfluoreszenz aufweist, die die Messung im Fluoreszenzspektrometer stört.

In Abbildung 33 ist exemplarisch der Verlauf einer Calcium-Messung nach Stimulation mit MCI/MI dargestellt. Es ist nach Zugabe von MCI/MI ein Zunahme der Calcium-gebunden Form von Fura-2 (Anregung bei 340nm) zu beobachten, während die Fluoreszenz durch die Calcium-freie Form (Anregung bei 380nm) abnimmt (Abb. 33a). Der Verlauf des Quotienten von Calcium-gebundenem zu Calcium-freiem Fura-2 (ratio

340/380) macht einen deutlicher Anstieg von freiem intrazellulären Calcium in der Zelle innerhalb weniger Sekunden nach Stimulation mit MCI/MI sichtbar (Abb.33b).



**Abb. 33:  $[Ca^{2+}]_i$  während der Stimulation mit MCI/MI**

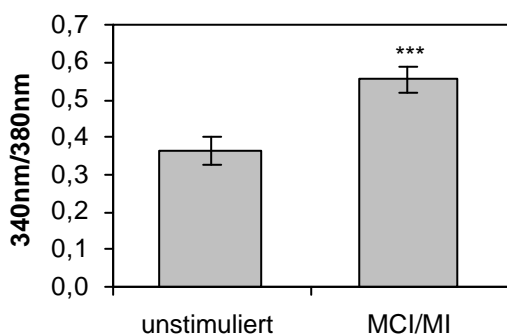
Unreife DC wurden mit Fura-2-AM (1µM) 30min inkubiert und anschließend mit dem Kontaktallergen MCI/MI (2,5µg/ml) stimuliert. Die Fluoreszenzintensität wurde bei 510nm detektiert unter alternierender Anregung bei 340 und 380nm.

a Verlauf der Fluoreszenzintensität bei Anregung durch 340 bzw 380nm

b Quotient der Fluoreszenzintensität bei Anregung durch 340nm und 380nm

Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus sechs unabhängigen Versuchen.

Die Calcium-Mobilisierung nach Stimulation mit MCI/MI war sowohl in Calcium-freiem als auch in Calcium-haltigen (0,4mM CaCl<sub>2</sub>) Puffer reproduzierbar.

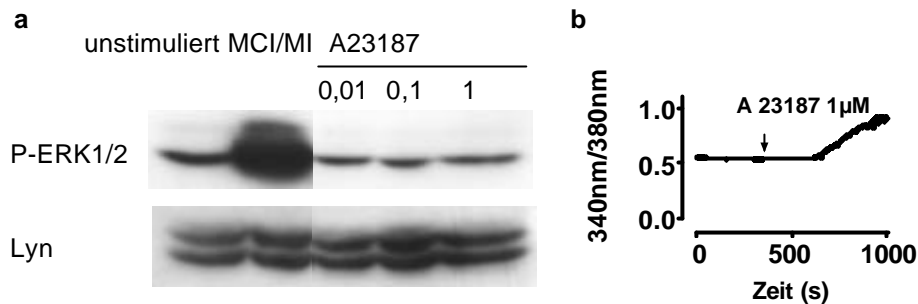


**Abb. 34: Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  nach Stimulation mit MCI/MI**

Unreife DC wurden mit Fura-2-AM (1µM) 30min inkubiert und anschließend mit dem Kontaktallergen MCI/MI (2,5µg/ml) bei 37°C stimuliert. Der Quotient der Fluoreszenzintensität von Calcium-gebundenem und Calcium-freiem Fura-2 wurde vor und nach der Stimulation mit MCI/MI ermittelt.  $p < 0,001$ ,  $n = 6$

In Abbildung 34 ist der Quotient der Fluoreszenzintensität von acht unabhängigen Messungen (4 Spender) dargestellt. Bei einem mittleren Ausgangswert für den Quotienten 340/380 von 0,37 steigt der Wert nach Stimulation mit MCI/MI signifikant ( $p < 0,001$ ) auf 0,55 an.

Daraufhin wurde überprüft, ob allein der Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration die Phosphorylierung von ERK bewirkt. Dendritische Zellen wurden mit dem Ionophor A23187 behandelt. Im Western Blot wurde die Phosphorylierung von ERK überprüft.



**Abb. 35: Stimulation von DC mit A23187**

a DC wurden mit MCI/MI (2,5μg/ml) bzw. mit A23187 in verschiedenen Konzentrationen 15min stimuliert. Die Zell-Lysate wurden im Western Blot analysiert. Die Blots wurden nacheinander mit Antikörpern gegen P-ERK und Lyn detektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus fünf unabhängigen Versuchen.

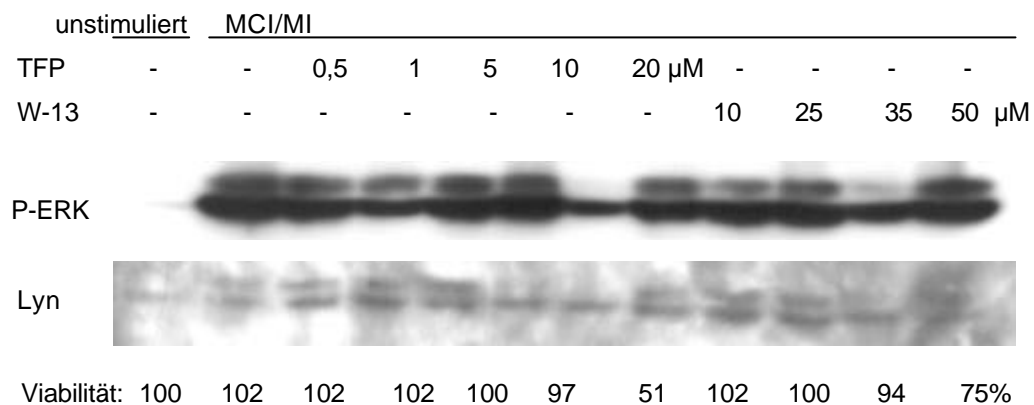
b DC wurden mit Fura-2-AM (1μM) 30min inkubiert und mit A23187 (1μM) in PBS/Ca<sup>2+</sup> (1mM) stimuliert. Die Fluoreszenzintensität wurde bei 510nm detektiert. Dargestellt ist der Quotient der Fluoreszenzintensitäten bei Anregung durch 340nm und 380nm

Nach 15min Stimulation mit A23187 konnte kein Anstieg der ERK-Phosphorylierung beobachtet werden (Abb. 35a). Der Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration durch A23187 konnte jedoch durch Calcium-Messung mit Fura-2 belegt werden (Abb. 35b).

### 3.6.4 Beteiligung von Calmodulin an der Aktivierung von ERK durch MCI/MI

Nachdem eine Abhängigkeit der ERK-Phosphorylierung durch MCI/MI und TNCB sowie die Mobilisierung von intrazellulärem Calcium durch MCI/MI gezeigt werden konnte, wurde untersucht ob Calcium-Calmodulin bei der Vermittlung des Calcium-Signals eine Rolle spielt. Dazu wurden dendritische Zellen vor der Stimulation mit MCI/MI mit Calmodulin-Antagonisten inkubiert.

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot mit den dazugehörigen Viabilitäts-Daten.



**Abb. 36: Bedeutung von Calmodulin für die Aktivierung von ERK durch MCI/MI**

Reife DC wurden mit den Calmodulin-Antagonisten TFP oder W13 in den angegebenen Konzentrationen 30min bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit dem Kontaktallergen MCI/MI (2,5 $\mu$ g/ml) für 10min stimuliert. Die Zell-Lysate wurden im Western Blot analysiert. Die Blots wurden nacheinander mit Antikörpern gegen P-ERK1/2 und Lyn detektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Vorinkubation mit TFP oder W13 führt nur in Konzentrationen, die die Viabilität der Zellen erheblich beeinträchtigen (auf 51% der Viabilität unbehandelter Zellen für TFP bzw. 75% für W13), zu einer Verminderung der ERK-Phosphorylierung durch MCI/MI. Die Mittelwerte der Viabilität aus mehreren Versuchen mit TFP und W13 sind in Tabelle 15 zusammengefaßt.

**Tab.15: Viabilität von DC nach Präinkubation mit TFP und mit W13**

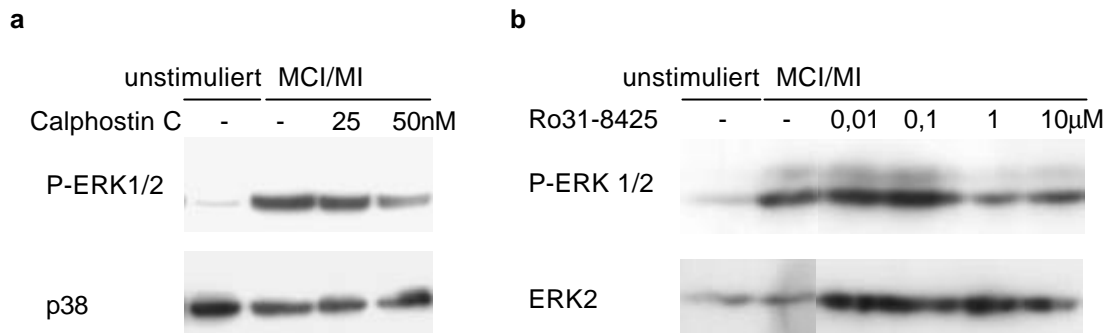
Reife DC wurden mit TFP oder W13 in verschiedenen Konzentrationen 30min vorinkubiert und anschließend 10min mit MCI/MI stimuliert. Der Anteil viable Zellen wurde durch Propidiumjodid-Färbung im FACScan bestimmt. Angegeben ist die Viabilität in Prozent im Vergleich zu unbehandelten Zellen und die Mittelwertabweichung aus 3 Experimenten.

	Viabilität [%] mit:									
	-	TFP					W13			
		0,5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	25 $\mu$ M	10 $\mu$ M	25 $\mu$ M	35 $\mu$ M	50 $\mu$ M
<b>MCI/MI</b>	99	99	99	98	96	47	100	98	82	57
	$\pm 2,2$	$\pm 1,8$	$\pm 2$	$\pm 2,2$	$\pm 1,1$	$\pm 12$	$\pm 0,4$	$\pm 3,6$	$\pm 5,1$	$\pm 13,8$

Aus Tabelle 15 ist der toxische Effekt von höheren Konzentrationen von TFP und W13 zu entnehmen. Die Viabilität der Zellen sinkt bei 10 $\mu$ M TFP auf 47%, bei 50 $\mu$ M W13 auf 57%, im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Nur in diesen toxischen Konzentrationen kann eine Verminderung der ERK-Phosphorylierung durch MCI/MI im Western Blot beobachtet werden.

### 3.7 Proteinkinase C

Die Proteinkinase C gehört zu den upstream-Elementen der ERK-Kaskade. Zudem ist die Aktivität der konventionellen Isoformen der PKC Calcium-abhängig. Daher sollte die Beteiligung der PKC an der Aktivierung von ERK durch Kontaktallergene durch den Einsatz von spezifischen Inhibitoren überprüft werden.



**Abb. 37: Beteiligung von Proteinkinase C an der ERK-Phosphorylierung durch MCI/MI**

Reife DC wurden mit Calphostin C (a) unter Beleuchtung oder Ro-31-8425 (b) in den angegebenen Konzentrationen 30min bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit dem Kontaktallergen MCI/MI (2,5 µg/ml) für 10min stimuliert. Die Zell-Lysate wurden im Western Blot analysiert. Die Blots wurden nacheinander mit Antikörpern gegen P-ERK1/2 und p38 bzw. ERK2 detektiert. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus vier unabhängigen Versuchen.

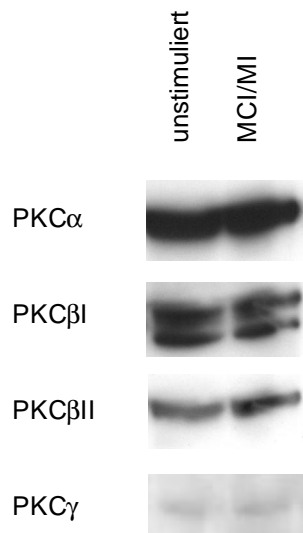
Sowohl mit dem PKC Inhibitor Calphostin C (Abb. 37a) als auch mit Ro31-8425 (Abb. 37b), welches speziell die konventionellen, Calcium-abhängigen Isoformen der PKC inhibiert, kann die Phosphorylierung von ERK vermindert, wenn auch nicht vollständig inhibiert werden.

**Tab. 16: Viabilität von DC nach Präinkubation mit Ro31-8425 und mit Calphostin C**

Reife DC wurden mit R031-8425 oder Calphostin C in verschiedenen Konzentrationen 30min vorinkubiert und anschließend 10min mit MCI/MI stimuliert. Der Anteil viabler Zellen wurde mit Propidiumjodid-Färbung im FACScan bestimmt. Angegeben ist die Viabilität in Prozent im Vergleich zu unbehandelten Zellen (n=4).

	Viabilität [%] mit:							
	Ro31-8425					Calphostin C		
	-	0,01µM	0,1µM	5µM	10µM	-	25nM	50nM
<b>MCI/MI</b>	87	91	91	91	93	96	95	93
	± 3,9	± 4,4	± 4,3	± 3,6	± 1,8	± 2,5	± 3	± 3,1

Nach diesem Hinweis auf die Beteiligung der konventionellen Isoformen der PKC an der Aktivierung von ERK durch MCI/MI sollte die Rolle der cPKC Isoformen untersucht werden.



**Abb. 38: Expression der cPKC Isoformen**

Reife DC wurden mit MCI/MI (2,5 µg/ml) 10min stimuliert. Die Zell-Lysate wurden im Western Blot analysiert und die cPKC Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II und  $\gamma$  nacheinander detektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchen.

Zuerst wurde die Expression der cPKC Isoformen in unbehandelten dendritischen Zellen und in MCI/MI-stimulierten Zellen untersucht.

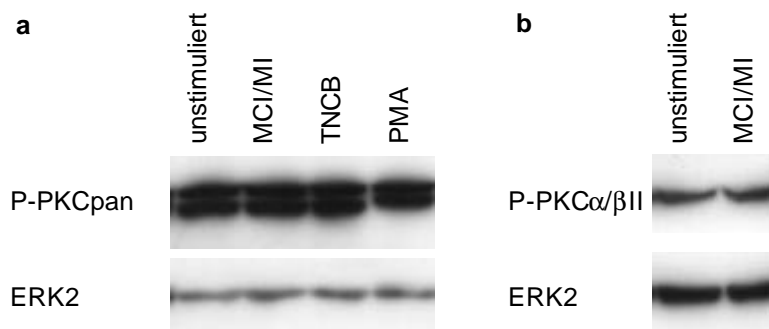
Das Expressionsmuster in Abbildung 38 zeigt, daß alle vier Isoformen in reifen dendritischen Zellen exprimiert werden. PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I und  $\beta$ II sind deutlich nachweisbar, während PKC $\gamma$  nur schwach detektierbar ist. Die Stimulation mit MCI/MI hat keinen Einfluß auf die Stärke der Expression.

In weiteren Versuchen wurde die Phosphorylierung der PKC mit phosphospezifischen Antikörpern untersucht. Zum

einen wurde ein Antikörper gegen eine Phosphorylierungsstelle in der hydrophoben Region am Carboxy-Terminus (Ser660 bei PKC $\beta$ II) eingesetzt, die im Rahmen der Aktivierung phosphoryliert wird.

Zum anderen wurde die Autophosphorylierung (Thr638 bei PKC $\alpha$  und Thr641 bei PKC $\beta$ II) der PKC-Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$ II mit einem phosphospezifischen Antikörper nachgewiesen. Wie in Abbildung 39 dargestellt, liegt PKC schon in unstimulierten dendritischen Zellen zumindest zweifach phosphoryliert vor. Die Stimulation mit MCI/MI, TNCB oder PMA hat keinen Einfluß auf die Phosphorylierung in der hydrophoben Region bei panPKC (Abb.39a). Auch die Autophosphorylierung von PKC $\alpha$ / $\beta$ II an Thr638/641 (Abb. 39b) wird durch Stimulation mit MCI/MI nicht verändert.





**Abb. 39: Nachweis phosphorylierter PKC-Isoformen**

Reife DC wurden mit MCI/MI (2,5 µg/ml), TNCB (1,5 µg/ml) oder PMA (20nM) 10min stimuliert.

Die Zell-Lysate wurden im Western Blot analysiert. Die Blots wurden nacheinander mit

a Antikörpern gegen P-PKC pan (Ser660/PKCβII, erkennt PKCα, β, δ, ε, η)

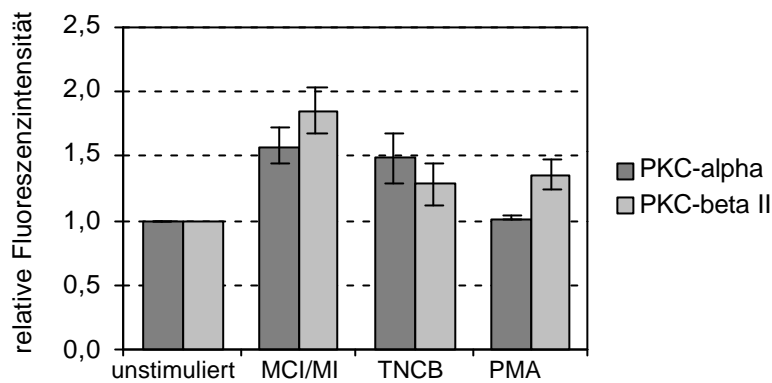
b Antikörpern gegen P-PKCα/βII (Thr638/Thr641) gefärbt.

Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Ergebnisse aus diesen Western Blots weisen darauf hin, daß in reifen dendritischen Zellen mehrfach phosphorylierte konventionelle PKC vorhanden ist. Durch die Stimulation mit MCI/MI, TNCB oder PMA wird der Anteil an diesen Stellen phosphorylierter PKC nicht erhöht. Auch in unreifen dendritischen Zellen und sogar in Monocyten konnte phosphorylierte PKC detektiert werden (ohne Abbildung).

Als Zeichen für die Aktivierung der PKC wird die Translokation an die Plasmamembran und damit an die Detergenz-resistente Zellfraktion angesehen. Daher wurden die cPKC-Isoformen PKCα und PKCβII in permeabilisierten dendritischen Zellen angefärbt und durchflußcytometrisch detektiert.

Sowohl PKCα als auch PKCβII waren in permeabilisierten DC sowohl in stimulierten als auch in nicht stimulierten Zellen nachweisbar (Abb. 40). Nach Stimulation mit MCI/MI war sowohl für PKCα als auch für PKCβII ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität zu beobachten. Auch Stimulation mit TNCB bewirkte eine verstärkte Detektion von PKCα und PKCβII jedoch in geringerem Ausmaß als MCI/MI. Durch PMA wurde lediglich für PKCβII eine Zunahme der Fluoreszenzintensität gemessen, der Nachweis von PKCα blieb konstant.



**Abb. 40: Translokation von PKC $\alpha$  und PKC $\beta$ II nach Stimulation mit Kontaktallergenen**

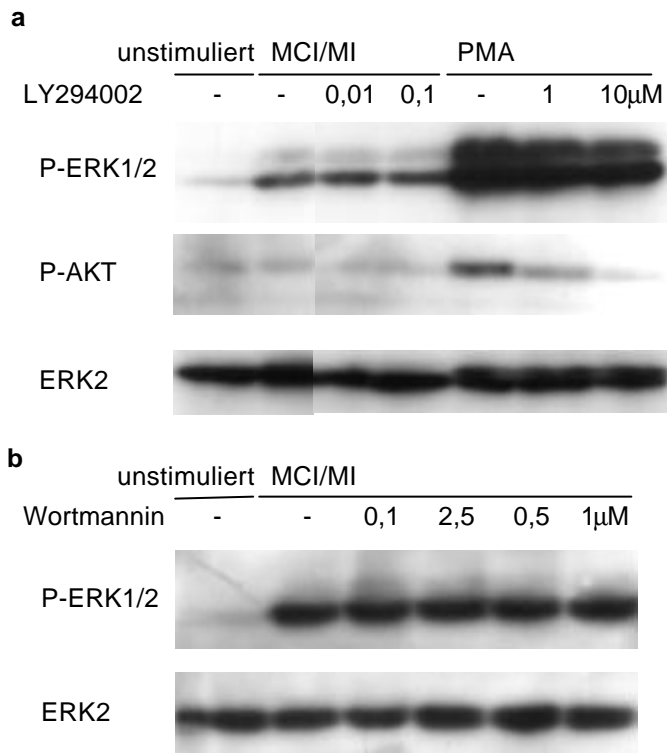
Reife DC wurden mit MCI/MI (2,5g/ml), TNCB (1,5 $\mu$ g/ml) oder PMA (20nM) 10min bei 37°C stimuliert. Die Zellen wurden permeabilisiert, mit anti-PKC $\alpha$ -, anti-PKC $\beta$ II- oder anti-P-PKC $\alpha$ / $\beta$ II-Antikörpern sowie DTAF-gekoppelten Sekundär-Antikörpern gefärbt und im FACScan analysiert.

Die Werte entsprechen der relativen Fluoreszenzintensität im Vergleich zu unstimulierten Zellen. n = 6

Nach Stimulation mit MCI/MI und TNCB ist eine verstärkte Nachweisbarkeit sowohl von PKC $\alpha$  als auch PKC $\beta$ II in permeabilisierten dendritischen Zellen zu beobachten. Die Stimulation mit PMA hat lediglich Einfluß auf PKC $\alpha$ .

### 3.8 PI<sub>3</sub>-Kinase

Die Beteiligung der Phosphoinositol-3-Kinase (PI<sub>3</sub>-Kinase) an der Aktivierung von ERK durch Kontaktallergene wurde mit den PI<sub>3</sub>-Kinase Inhibitoren Wortmannin und LY294002 überprüft.



**Abb. 41: Beteiligung der PI-3K an der ERK-Phosphorylierung durch MCI/MI**

Reife DC wurden mit LY294002 (a) oder Wortmannin (b) in den angegebenen Konzentrationen 30min bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit dem Kontaktallergen MCI/MI (2,5  $\mu$ g/ml) für 10min stimuliert. Die Lysate wurden im Western Blot analysiert. Die Blots wurden nacheinander mit Antikörpern gegen P-ERK1/2, P-AKT und ERK2 detektiert. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus drei (a) bzw. fünf (b) unabhängigen Versuchen.

Wie in Abbildung 41 dargestellt konnte mit beiden PI<sub>3</sub>-Kinase Inhibitoren über einen breiten Konzentrationsbereich nach Stimulation mit MCI/MI keine Verminderung der ERK-Phosphorylierung beobachtet werden, während die Aktivierung von ERK durch PMA mit LY294002 geringfügig vermindert wurde. Die Inhibition der Phosphorylierung von AKT durch PMA nach Vorinkubation mit LY294002 zeigt die Wirksamkeit des Inhibitors in den eingesetzten Konzentrationen. Bei 10 $\mu$ M LY294002 ist eine vollständige

Inhibition der AKT-Phosphorylierung erreicht, 10 $\mu$ M LY294002 bewirken jedoch keine nachweisbare Verminderung der Aktivierung von ERK durch MCI/MI.

**Tab. 17: Viabilität von reifen DC nach Präinkubation mit PI<sub>3</sub>-Kinase-Inhibitoren**

Reife DC wurden mit Wortmannin oder LY294002 in verschiedenen Konzentrationen für 30min vorinkubiert und anschließend für 10min mit MCI/MI stimuliert. Die Viabilität wurde mit Propidiumjodid-Färbung im FACScan bestimmt. Die Werte entsprechen dem prozentualen Anteil lebender Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen und der Mittelwertabweichung aus 6 bzw. 3 Experimenten.

	Wortmannin					LY294002		
	-	0,1 $\mu$ M	0,25 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	-	10 $\mu$ M	25 $\mu$ M
<b>MCI/MI</b>	102%	102%	99%	97%	99%	100%	101%	102%
	$\pm 2,5$	$\pm 3,7$	$\pm 2,8$	$\pm 3,5$	$\pm 2,3$	$\pm 2,4$	$\pm 0,6$	$\pm 1,2$

In den eingesetzten Konzentrationen wurde die Viabilität der Zellen durch keinen beiden PI<sub>3</sub>-Kinase-Inhibitoren beeinträchtigt (Tab. 17).

## 4 Diskussion

Die Aktivierung von epidermalen dendritischen Zellen spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung einer Kontaktallergie. Kontaktallergene sind meist niedermolekulare, chemisch reaktive Substanzen, die in die Epidermis eindringen und dort an Proteine binden. Antigen-präsentierende Zellen werden durch Kontaktallergene aktiviert und dadurch zur Produktion von proinflammatorischen Cytokinen, zur Hochregulation kostimulatorischer Moleküle und zur Auswanderung aus der Epidermis angeregt (Aiba et al. 1997, Weinlich et al. 1998, Arrighi et al. 2001). Aufgrund der Bedeutung von Antigen-präsentierenden Zellen als Immunmodulatoren in verschiedenen Phasen der Kontaktallergie stellt sich die Frage, welche molekularen Mechanismen ihrer Aktivierung durch Kontaktallergene zugrunde liegen.

Ziel dieser Arbeit war es, frühe Signaltransduktionsmechanismen zu identifizieren, die durch Kontaktallergene aktiviert werden. Bisläng wurde die Induktion intrazellulärer Tyrosinphosphorylierung in humanen dendritischen Zellen des Blutes, in Monocyten und in murinen Langerhanszellen durch Kontaktallergene beschrieben (Kühn et al. 1998, Neisius et al. 1999). Weiterhin ist die Aktivierung der MAP Kinasen p38, ERK und JNK in Monocyten (Brand et al. 2002) sowie p38 und ERK in unreifen dendritische Zellen (Arrighi et al. 2001) durch Kontaktallergene bekannt. Kürzlich zeigte Zahn (2002), daß das experimentelle Kontaktallergen TNCB an die Gewebstransglutaminase (tTG) in humanen dendritischen Zellen koppeln kann und deren Aktivierung bewirkt.

### 4.1 Charakterisierung des Modellsystems

Humane Monocyten und aus Monocyten-generierte dendritische Zellen wurden als Modell für Langerhanszellen verwendet. Die Zellen wurden durchflußcytometrisch durch die Expression der Oberflächenmarker CD14, CD86, CD83 und HLA-DR charakterisiert (siehe 3.1). Monocyten wurden mit einer Reinheit etwa 70% CD14-positiver Zellen erhalten, unreife dendritische Zellen waren CD86-positiv aber CD83-negativ, während reife dendritische Zellen durch Expression von CD86 (>90%) und CD83 (>80%) gekennzeichnet waren.

Monocyten und dendritische Zellen werden durch Kontaktallergene aktiviert (Arrighi et al 2001, Aiba et al. 1997, Becker et al. 2002, Brand et al. 2002, Bruchhausen et al. 2003). Als Parameter für ihre Reaktivität wurde die intrazelluläre Tyrosinphosphorylierung in Monocyten und dendritischen Zellen überprüft. Die Stimulation mit MCI/MI, TNCB, Thiomersal oder Formaldehyd führte sowohl bei Monocyten als auch bei dendritischen Zellen zu einem deutlichen Anstieg der intrazellulären Tyrosinphosphorylierung (siehe 3.1). Somit konnte die Eignung von Monocyten und dendritischen Zellen für die Analyse der Aktivierung durch Kontaktallergene sichergestellt werden.

Epidermale Langerhanszellen sind spezialisiert auf die Aufnahme von Antigen und dessen Transport zu den regionalen Lymphknoten. Sie exprimieren kostimulatorische Moleküle wie B7.1/CD80 und B7.2/CD86 in geringem Maß. Daher entsprechen Langerhanszellen eher einem unreifen Differenzierungsstadium von dendritischen Zellen (Romani et al. 1989a, Romani et al. 1989b, Jonuleit et al. 1996). In vitro generierte dendritische Zellen sind in reifem Zustand jedoch in größerer Anzahl zu erhalten. Da für die proteinbiochemischen Experimente große Mengen an Protein, also eine hohe Zellzahl erforderlich war, wurden überwiegend reife dendritische Zellen verwendet. Entscheidende Ergebnisse wurden mit unreifen dendritischen Zellen reproduziert (siehe 3.3: Aktivierung von MAP Kinasen und 3.7: Abhängigkeit der ERK-Phosphorylierung von  $[Ca^{2+}]_i$ ). Es konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Die Aktivierung von dendritischen Zellen durch Kontaktallergene scheint zumindest für die untersuchten Mechanismen unabhängig vom Ausreifungsgrad der Zellen zu sein. Zahn (2002) beschreibt zudem, daß die Bindung von TNCB an zelluläre Proteine vom Ausreifungsgrad der dendritischen Zellen unabhängig ist. Ein weiterer Vorteil der Verwendung von reifen dendritischen Zellen war, daß diese durch die Expression der Oberflächenmarker CD86 und CD83 eine klar definierte Zellpopulation darstellen, so daß die Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet ist.

Um die funktionelle Relevanz der Stimulation von dendritischen Zellen mit Kontaktallergenen zu ermitteln, wurde ein Cytokinprofil nach Stimulation mit MCI/MI und TNCB erstellt (siehe 3.1). Die Expression einer Reihe von Cytokinen mit vorwiegend

pro-inflammatorischer Wirkung wurde im RNase Protection Assay untersucht. Von besonderem Interesse waren dabei TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , denen eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Kontaktallergie zugeschrieben wird (Enk & Katz 1992, Wang et al. 1997, Antonopoulos et al. 2001, Shornick et al. 2001). Überraschend konnte lediglich ein leichter Anstieg der Expression von TNF- $\alpha$ -mRNA detektiert werden (Abb.3.x), jedoch keine deutlich verstärkte IL-1 $\beta$ -Expression.

Aiba et al. (1997) und Brand et al. (2002) beschreiben IL-1 $\beta$  Produktion von unreifen dendritischen Zellen und Monocyten nach Stimulation mit Kontaktallergenen. Dagegen finden Tuschl & Kovac (2001) nur nach Stimulation mit NiCl<sub>2</sub> IL-1 $\beta$  positive Zellen nicht jedoch mit anderen Kontaktallergenen. Basketter & Kimber (2001) betonen die großen, individuellen Unterschiede in der IL-1 $\beta$  Produktion nach Stimulation mit Kontaktallergenen bei unterschiedlichen Spendern.

Neben dem Anstieg der TNF- $\alpha$ -mRNA in MCI/MI- und in TNCB-stimulierten Zellen wurde TNF- $\alpha$  auch auf Proteinebene im Elispot nachgewiesen (siehe Abb. 12). Die TNF- $\alpha$ -Produktion stieg nach Stimulation mit den Kontaktallergenen MCI/MI, TNCB, Formaldehyd und in geringem Maß auch nach Stimulation mit Thiomersal an.

Durch Kontaktallergene induzierte TNF- $\alpha$  Produktion wurde von Aiba et al. (1997) und Manome et al. (1999) beschrieben. Stimulation mit NiCl<sub>2</sub> und MnCl<sub>2</sub> führt in unreifen dendritischen Zellen zur Produktion von TNF- $\alpha$ . Das Cytokin TNF- $\alpha$  gehört zu den Ausreifungsstimuli für dendritische Zellen (Arrighi et al. 2002, Sallusto et al. 1995) und vermittelt die Hochregulation von CD86 durch das Kontaktallergen DNCB (Aiba et al. 1997). Im murinen Modell konnten Senaldi et al. (1994) und Piguet et al. (1991) zeigen, daß TNF- $\alpha$  ein wichtiger Mediator der Kontaktallergie ist. TNCB induziert in murinen epidermalen Zellen die Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Enk & Katz 1992). In TNF Rezeptor p75-defizienten Mäusen wurde die verminderte Wanderung von Langerhanszellen und geringere Reaktivität auf das Kontaktallergen FITC beobachtet (Wang et al. 1997). Die Produktion von TNF- $\alpha$  durch Antigen-präsentierende Zellen nach Stimulation mit Kontaktallergenen wäre demnach von funktioneller Relevanz. Die TNF- $\alpha$ -

Produktion war in diesen Experimenten niedrig im Vergleich zu anderen Stimuli wie z.B. Phorbolestern. Zu bedenken sind die Unterschiede zwischen dem isolierten in vitro Modell und der Situation in vivo. Eine geringe Produktion von TNF- $\alpha$  könnte in vivo eine Rolle als initiiierendes Signal im Zusammenspiel mit anderen epidermalen Zellen wie Keratinocyten spielen und die Potentierung inflammatorischer Signale einleiten.

## 4.2 Jak / STAT

Die weiteren Untersuchungen beschäftigten sich mit verschiedenen Signaltransduktionselementen. Als erstes wurde die Aktivierung von Jak/STAT-Signalwegen durch Kontaktallergene überprüft. Keines der untersuchten STAT-Moleküle wurde in Monocyten oder dendritischen Zellen durch die Stimulation mit den Kontaktallergenen MCI/MI, Thiomersal, TNCB oder Formaldehyd aktiviert.

Durch die Bestimmung der intrazellulären Tyrosinphosphorylierung konnte sicher gestellt werden, daß sowohl dendritische Zellen als auch Monocyten durch die Kontaktallergene in den eingesetzten Konzentrationen aktiviert wurden (siehe 3.2). Unter identischen Bedingungen konnte jedoch keine Phosphorylierung von STAT1, STAT3, STAT4, STAT5 oder STAT6 im Western Blot beobachtet werden. Die Aktivierbarkeit der untersuchten Jak/STAT-Signalwege in Monocyten und dendritischen Zellen wurde durch Positivkontrollen mit Cytokinen demonstriert.

Im Gegensatz zu frisch isolierten Monocyten konnte STAT5-Aktivierung in dendritischen Zellen durch Stimulation mit GM-CSF nicht gezeigt werden. Das Fehlen der Phosphorylierung von STAT5 auch mit höheren Konzentrationen von GM-CSF läßt sich vermutlich auf die Kultur der Zellen in GM-CSF-haltigen Medium für mehrere Tage erklären. Lapteva et al. (2001) konnten zeigen, daß GM-CSF-Rezeptor-RNA in dendritischen Zellen im Vergleich zu Monocyten herunterreguliert wird. Die Verminderung der GM-CSF-Rezeptor Expression auf der Zelloberfläche während der Kultur mit GM-CSF wurde für Mastzellen, Neutrophile und für Monocyten beschrieben (Cannistra et al. 1990, Welker et al. 2001). Ein Rückgang der GM-CSF-Rezeptor-Expression könnte erklären, warum in dendritischen Zellen nach GM-CSF-Stimulation



keine Phosphorylierung von STAT5 detektierbar war. Trotz fehlender Positivkontrolle kann festgehalten werden, daß auch mit Kontaktallergenen in mehreren Experimenten keine Aktivierung von STAT5 festzustellen war. Daher kann die Aktivierung des STAT5 Signalweges in Monocyten und dendritischen Zellen ausgeschlossen werden.

Auch die Sensitivität für IL-4 war in dendritischen Zellen im Vergleich zu Monocyten vermindert. Die Phosphorylierung von STAT6 nach IL-4-Stimulation konnte nur mit einer zehnfach höheren IL-4-Konzentration als in Monocyten erzielt werden. Nach Renz et al. (1991) führt die kontinuierliche Inkubation von T-Zellen in Medium mit hohen Mengen IL-4 zu einer Herunterregulation der IL-4-Rezeptor-Expression. Ein ähnlicher Mechanismus wäre für dendritische Zellen denkbar.

In Monocyten konnte kein STAT4 detektiert werden, in dendritischen Zellen hingegen schon. Entsprechend fanden Frucht et al. (2000), daß naive Monocyten kein STAT4 exprimieren. Erst nach Aktivierung der Monocyten mit IFN- $\gamma$  und LPS konnte STAT4 detektiert werden (Frucht et al. 2000). In dendritischen Zellen wird STAT4 abhängig vom Differenzierungszustand exprimiert (Fukao et al. 2001).

Die Phosphorylierung von STAT4 in dendritischen Zellen konnte nur durch Stimulation mit IFN- $\alpha$ , nicht jedoch mit IL-12 erzielt werden. Während Nagayama et al. (2000) die Aktivierung von STAT4 und STAT3 durch IL-12 in unreifen dendritischen Zellen beschreiben, fanden Frucht et al. (2000) Phosphorylierung von STAT4 in aktivierten Monocyten nur nach IFN- $\alpha$ -Stimulation. Im Gegensatz zum Anstieg der gesamten intrazellulären Tyrosinphosphorylierung nach Stimulation mit Kontaktallergenen konnte nach Stimulation mit Cytokinen durchflußcytometrisch kein signifikanter Anstieg der Tyrosinphosphorylierung gemessen werden. Dies unterstreicht, daß Cytokine und Kontaktallergene unterschiedliche Signalwege aktivieren.

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.2 weisen darauf hin, daß Kontaktallergene die üblichen Jak/STAT-Signalwege weder durch Bindung an Jak-assoziierte Cytokin-Rezeptoren noch über deren downstream-Elemente direkt aktivieren. Jede Aktivierung von STAT-Molekülen in Antigen-präsentierenden Zellen in vivo während der Induktion einer

Kontaktallergie muß als sekundäre Reaktion auf Cytokine angesehen werden, die im Laufe der Aktivierung durch Kontaktallergene von epidermalen Zellen freigesetzt werden.

### **4.3 Aktivierung von MAP Kinasen durch Kontaktallergene**

Sowohl in reifen als auch in unreifen dendritischen Zellen konnte die Aktivierung von ERK durch MCI/MI und TNCB gezeigt werden. Stimulation mit Thiomersal oder Formaldehyd führte innerhalb von 20 Minuten nicht zur Aktivierung von ERK. Die MAP Kinase p38 wurde durch Stimulation mit MCI/MI, Thiomersal und TNCB aktiviert. Die identischen Aktivierungsmuster von p38 und ERK in reifen und unreifen dendritischen Zellen bestätigen die Verwendung von reifen dendritischen Zellen als Modell für Langerhanszellen.

Brand et al. (2002) fanden in Monocyten die Aktivierung von p38 durch die Kontaktallergene MCI/MI, Thiomersal, DNFB und auch Formaldehyd. Die überwiegend fehlende Aktivierung von p38 durch Formaldehyd in reifen dendritischen Zellen könnte auf die stark schwankende Reaktion von Spender zu Spender, die auch bei der TNF- $\alpha$ -Produktion (siehe 3.1) zu beobachten war, zurückzuführen sein. Die Sensitivität für Formaldehyd scheint individuell deutlich zu variieren. Arrighi et al. (2001) beschreiben in unreifen dendritischen Zellen p38-Aktivierung durch NiSO<sub>4</sub> und DNFB und eine geringere Aktivierung von ERK durch DNFB, nicht jedoch durch NiSO<sub>4</sub>. Die Aktivierung von p38 und ERK ist ein Mechanismus der Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen durch Kontaktallergene, auch wenn das Aktivierungsmuster der unterschiedlichen Kontaktallergene variiert. Dies mag darauf zurückzuführen sein, daß die Sensitivität für verschiedene Kontaktallergene abhängig individuell stark schwankt oder aber, daß die Aktivierung von Zellen durch unterschiedliche Kontaktallergene auf verschiedene Mechanismen zurückzuführen ist.

Oxidativer Streß in Form von Wasserstoffperoxid bewirkte eine deutliche Aktivierung von p38 und einen leichten Anstieg der Phosphorylierung von ERK. Das Irritant Benzalkoniumchlorid dagegen hatte keinen Einfluß auf p38 oder ERK. Die Aktivierung von ERK und p38 durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde von Guyton et al. (1996) beschrieben. Stimulation

von dendritischen Zellen mit  $H_2O_2$  induziert vergleichbar zu Kontaktallergenen die Produktion von  $TNF-\alpha$  (Verhasselt et al. 1998). Im Gegensatz zu Kontaktallergenen bewirkt Benzalkoniumchlorid keine Aktivierung von ERK und p38. Entsprechend fanden Arrighi et al. (2000) weder mit Benzalkoniumchlorid noch mit Natriumdodecylsulfat (SDS) eine Aktivierung von p38 in unreifen dendritischen Zellen. Brand et al. (2002) beschreiben dagegen die Phosphorylierung von p38 nach Stimulation von Monocyten mit Benzalkoniumchlorid, konnten jedoch zeigen, daß die Irritanz nicht die Translokation von phosphoryliertem p38 bewirkt, die für Kontaktallergene beobachtet wurde.

Für die Aktivierung von ERK und p38 durch MCI/MI und TNCB wurde die jeweils optimale Dosis ermittelt, bei der eine zuverlässige Phosphorylierung von ERK bei stabiler Viabilität gewährleistet war. Die verwendeten Konzentration liegen unter den in vitro eingesetzten Konzentrationen für TNCB (1% Sensibilisierung murin, Yokozeki et al. 2000, und für MCI/MI (0,01% für Epicutan-Testungen). Die für Sensibilisierungen bzw. Testung eingesetzten Mengen sind der in vivo Situation insofern nicht vergleichbar, da die Zellen in vitro dem Kontaktallergen direkt ausgesetzt sind und keine Schutzmechanismen wie z.B. die Hornhautbarriere zu überwinden sind. Die Konzentrationen wurden daher anhand der zuverlässigen reproduzierbaren Aktivierung von MAP Kinasen bei stabiler Viabilität der Zellen ausgewählt.

Der zeitliche Verlauf der Aktivierung der MAP Kinasen p38 und ERK durch das starke Kontaktallergen MCI/MI zeigte, daß die ERK-Phosphorylierung schon nach zwei Minuten Stimulation detektiert werden kann, während die Phosphorylierung von p38 erst nach 15 Minuten beginnt. Ludwig et al. (1998) haben die Aktivierung der MAP Kinasen p38 und ERK durch die Streß-induzierende Substanz Arsenit in verschiedenen Zelllinien (u.a. promonocytisch, promyelocytisch, T-Zelllymphom) untersucht. Arsenit koppelt wie viele Haptene (Basketter et al. 1995) über freie Thiolgruppen an zelluläre Proteine. Die Aktivierung von p38 durch Arsenit wird jedoch als früher Mechanismus beschrieben, während ERK erst zwei bis vier Stunden nach Stimulation abhängig vom p38-Signalweg

aktiviert wird. Die Aktivierung der MAP Kinasen p38 und ERK durch das Kontaktallergen MCI/MI dagegen verhält sich entgegengesetzt (siehe Abb. 20). Die Phosphorylierung von ERK gehört zu den frühen Mechanismen der Signaltransduktion durch MCI/MI, während p38 erst zu einem späteren Zeitpunkt aktiviert wird. Es bleibt offen, ob eine Abhängigkeit zwischen den beiden Signalwegen besteht. Raingeaud et al. (1995) beschreiben einen ähnlichen zeitlichen Verlauf der Aktivierung von p38 durch Phorbol ester, EGF, osmotischen Streß und TNF- $\alpha$  in HeLA-Zellen. Bei diesen Stimuli wurde nach 15 Minuten Stimulation schwache Aktivität gemessen, die während der folgenden 45 Minuten anstieg. Der zeitliche Verlauf der Stimulation mit dem Allergen MCI/MI zeigte eine frühe und anhaltende Aktivierung von ERK. Anhaltende Aktivierung von ERK bewirkt in verschiedenen Zelltypen die Induktion von Differenzierungsvorgängen, während die transiente Aktivierung von ERK mit der Förderung der Mitose in Verbindung gebracht wird (Gredinger et al. 1998, Schmidt et al. 2000). Ein Differenzierungsmerkmal von Antigen-präsentierenden Zellen ist die verstärkte Expression von kostimulatorischen Molekülen, die in vitro auch durch Kontaktallergene verursacht wird (Aiba et al. 1997, Arrighi et al. 2001). Ob der ERK-Signalweg dabei eine Rolle spielt ist ungeklärt. Arrighi et al. (2001) konnten zeigen, daß die durch NiSO<sub>4</sub> und DNFB induzierte Hochregulation der Oberflächenmarker CD80, CD86 und CD83 durch Inhibition von p38 vermindert wird. Die Bedeutung der Aktivierung von MAP Kinasen wird deutlich durch die Beteiligung von MAP Kinasen an der Ausreifung von dendritischen Zellen. So wird die Inhibition von TNF- $\alpha$ -induzierten Ausreifungsmerkmalen durch IL-10 auf die Blockade der MAPK-Kaskaden zurückgeführt (Sato et al. 1999). Weiterhin zeigten Arrighi et al. (2001), daß Ausreifungsstimuli wie LPS und TNF- $\alpha$  die drei MAP Kinasen p38, ERK und JNK in dendritischen Zellen aktivieren. Durch Inhibition von p38 konnten verschiedene Differenzierungsmerkmale wie der Anstieg der allostimulatorischen Kapazität, die Verringerung der endozytotischen Aktivität und die Hochregulation von Oberflächenmarkern vermindert werden. In Kapitel 3.3 wurde der Einfluß von ERK und p38 Inhibitoren auf die Induktion der TNF- $\alpha$ -Produktion durch MCI/MI untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß weder Inhibition

von ERK noch Inhibition von p38 allein die TNF- $\alpha$  Produktion von dendritischen Zellen nach Stimulation mit MCI/MI vermindern. Mit einer Kombination beider Inhibitoren dagegen konnte die Anzahl TNF- $\alpha$  produzierender Zellen auf das Niveau nicht stimulierter Zellen reduziert werden.

Sowohl ERK als auch p38 haben Einfluß auf die Regulation der TNF- $\alpha$  Produktion (Dong et al. 2002). Die Inhibition von p38 jedoch bewirkt nicht zwingend eine Verminderung der TNF- $\alpha$ -Expression. Während die Inhibition von p38 die LPS-induzierte Produktion von TNF- $\alpha$  in Gesamtblut-Zellen verringert, wurde in Makrophagen ein Anstieg der TNF- $\alpha$ -Produktion beobachtet (van den Blink et al. 2001). Die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Expression von humanen Monocyten ist sowohl abhängig vom MEK/ERK-Signalweg (Guha et al. 2001) als auch von p38 (Underwood et al. 2000). Underwood et al. (2000) zeigten weiterhin im murinen Modell, daß die Inhibition von p38 bei Stimulation mit LPS zu verminderter TNF- $\alpha$ -Konzentration im Plasma führt. Wie bei der Aktivierung von dendritischen Zellen durch MCI/MI beobachtet, wird auch in Monocyten (THP-1-Zellen) und Makrophagen die TNF- $\alpha$ -Produktion nach Stimulation mit LPS nur durch eine Kombination von p38- und ERK-Inhibitoren vollständig inhibiert (Carter et al. 1999, Rutault et al. 2001). Außer ERK und p38 können auch weitere MAP Kinase Signalwege an der Regulation der TNF- $\alpha$ -Biosynthese beteiligt sein. Sowohl ERK1/2, p38, JNK als auch ERK5 üben einen kooperativen Effekt auf die TNF- $\alpha$ -Gen-Expression aus (Zhu et al. 2000).

Da die Aktivierung von ERK im Gegensatz zur Aktivierung von p38 zu den unmittelbaren Auswirkungen der Stimulation mit MCI/MI gehört, wurde in den folgenden Experimenten untersucht, welche Signalelemente an der Aktivierung von ERK durch MCI/MI beteiligt sind.

#### 4.4 ERK-Core Kaskade

Die Untersuchung der Phosphorylierung der ERK vorgeschalteten MAPK Kinase MEK1/2 ergab das gleiche Aktivierungsmuster wie für ERK beobachtet. Die Inhibition der ERK-Aktivierung durch TNCB und MCI/MI mit dem MEK1/2 Inhibitor PD98059 belegt, daß die Phosphorylierung von ERK durch MEK1/2 vermittelt wird. PD98059 ist ein synthetischer Inhibitor, der selektiv MEK inhibiert und damit die Aktivierung von ERK verhindert (Dudley et al. 1995).

Weiterer Bestandteil des klassischen Ras-Raf-MEK-ERK Weges ist c-Raf, die am besten untersuchte Isoform der MAPK Kinasen der Raf-Familie (Dhillon & Kolch 2002). Nach Stimulation mit allen vier Kontaktallergenen konnte eine Verminderung der Phosphorylierung von c-Raf an Serin 259 detektiert werden. Dieser Phosphorylierungsstelle wird inhibitorische Funktion zugeschrieben. Die Balance zwischen dem Phosphorylierungs-Zustand bestimmter Aminosäurereste ist ein essentieller Faktor bei der Regulation der Raf-Isoformen (Chong et al. 2001). Die Dephosphorylierung von Serin 259 durch Protein-phosphatase 2A reguliert die Assoziation von c-Raf an die Membran, erhöht jedoch nicht die spezifische Aktivität der Kinase (Kubicek et al. 2002). Dieser Mechanismus ist Voraussetzung für die Aktivierung von c-Raf, an der u.a. GTP-gebundenes Ras und aktivierende Kinasen beteiligt sind (Dhillon & Kolch 2002, Dhillon et al. 2002).

Die Aktivität von c-Raf wurde daher im Kinase-Assay überprüft. Das Prinzip des aus der Literatur bekannten *in vitro*-Kinase-Assays für c-Raf beruht auf dem Nachweis von  $P^{32}$ -markiertem phosphoryliertem Substrat (siehe Schmid-Alliana et al. 1998, Kim et al. 2001, Chong et al. 2001). Um den Assay ohne Einsatz einer radioaktiven Markierung durchführen zu können, wurde durch c-Raf phosphoryliertes MEK2 mit einem phosphospezifischen Antikörper im Western Blot nachgewiesen. Im Vergleich zur Stimulation mit PMA konnte jedoch nach Aktivierung mit den Kontaktallergenen MCI/MI und TNCB kein Anstieg der c-Raf-Aktivität beobachtet werden. Die geringere Laufstrecke von c-Raf im SDS-Gel nach Stimulation mit PMA läßt auf ein höheres Molekulargewicht schließen, z.B. durch mehr Phosphorylierungen verursacht. Die Aktivierung des Raf-

MEK-ERK-Signalweges durch PMA wurde in einer epidermalen Carcinoma-Zelllinie (A431-Zellen) und in Jurkat T-Zellen gezeigt (Chen et al. 2002, Li et al. 1999).

Die Phosphorylierung von MEK1/2 und ERK1/2 durch Kontaktallergene muß entweder über andere Raf-Isoformen vermittelt werden oder ist unabhängig von Raf. Neben den Kinasen der Raf-Familie fanden Zhang et al. (2000) in dendritischen Zellen eine Kinase, DPK (dendritic cell-derived protein kinase), die sowohl an der Aktivierung von ERK1/2 als auch JNK beteiligt ist und den MAPKK Kinasen zugeordnet wird. Methoden, um die Aktivierung dieser Kinase zu untersuchen, waren jedoch nicht verfügbar.

Alle drei Raf-Isoformen können MEK aktivieren. Sie weisen spezifische aber überlappende Expression in verschiedenen Geweben auf. Während c-Raf ubiquitär exprimiert wird, ist das Vorkommen der anderen Raf-Isoformen begrenzt (Hagemann & Rapp 1999). Die Expression von A- und B-Raf wird für einige haematopoetische Zelllinien berichtet (Eychene et al. 1995, Sutor et al. 1999), B-Zellen exprimieren Raf-1 und B-Raf (Brummer et al. 2002). Ob A- und B-Raf in dendritischen Zellen exprimiert werden, ist nicht bekannt. Auch A- und B-Raf können durch Ras aktiviert werden (Hagemann & Rapp 1999). Daher stellte sich die Frage, ob Ras durch die Kontaktallergene MCI/MI und TNCB aktiviert wird.

#### **4.5 Ras**

Ras erschien auch im Hinblick auf einen möglicherweise ähnlichen Mechanismus der Aktivierung von ERK durch Stickstoffmonoxid (NO) interessant. NO bindet über einen Cystein-Rest (Cys118) an Ras und kann Ras so unabhängig von Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren aktivieren (Lander et al. 1995, Lander et al. 1997, Deora et al. 2000). Auch viele Haptene können über Thiolgruppen an Proteine koppeln (Basketter et al. 1995, Roberts & Lepoittevin 1998). Die Thiolgruppenaffinität von Haptenen ist essentiell für die Aktivierung von Monocyten und dendritischen Zellen (Becker et al. 2003). Daher wurde die direkte Aktivierung von Ras durch Kontaktallergene analog zu NO als möglicher Mechanismus in Betracht gezogen. Die Aktivierung von Ras wurde durch Präzipitation von GTP-gebundenem also aktiviertem Ras überprüft.

Nach Stimulation mit MCI/MI oder TNCB konnte kein GTP-Ras detektiert werden. Auch nach zwei und fünf Minuten Stimulation wurde keine Aktivierung von Ras durch MCI/MI beobachtet. Da der für die Detektion verwendete Antikörper alle drei bekannten ERK-aktivierenden Isoformen von Ras (H-Ras, N-Ras und K-Ras) erkennt, muß man davon ausgehen, daß die Aktivierung von ERK durch TNCB und MCI/MI unabhängig von Ras erfolgt. Die Aktivierbarkeit von Ras und die Funktionsfähigkeit des Assays konnte durch den Nachweis von Ras-GTP nach Stimulation mit PMA gewährleistet werden. Die Aktivierung von Ras durch PMA wurde in Jurkat T-Zellen gezeigt (Li et al. 1999, Deora et al. 2000). Außerdem ist Ras an der Induktion der Aktivität des 12(S)-lipoxygenase Promoters in epidermalen Carcinoma Zellen durch PMA beteiligt. PMA-induzierte Signale werden sowohl über Ras als auch durch PKC vermittelt (Chen et al. 2002).

Ras-unabhängige Aktivierung von ERK ist auch während der Calcium-induzierten Differenzierung von Keratinozyten zu beobachten (Schmidt et al. 2000). Im Gegensatz zur Aktivierung von ERK durch MCI/MI und TNCB sind in diesem Fall jedoch sowohl c-Raf als auch B-Raf beteiligt. Signale von Nukleotid-Rezeptoren (P2Y), einer Untergruppe von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, bewirken die Aktivierung von ERK ebenfalls unabhängig von der klassischen Ras/Raf/MAPK -Kaskade. Calcium und Proteinkinase C dagegen sind beteiligt an der ATP-induzierten ERK-Aktivierung in Endothelzellen (Short et al. 2000).

Die ERK-Aktivierung durch Kontaktallergene verläuft folglich nicht über den klassischen Ras/Raf/MEK/ERK-Weg, weder über upstream-Elemente noch durch direkte Aktivierung von Ras.



## 4.6 Calcium

Ein zentraler Mechanismus der Signaltransduktion ist die Kontrolle der cytoplasmatischen Calcium-Konzentration. Durch den Einsatz von Calcium-Chelatoren wurde überprüft, ob Calcium für die Aktivierung von ERK durch MCI/MI benötigt wird. Die Wahl der Substanzen ermöglichte die Unterscheidung, ob die intra- oder/und extrazelluläre Calciumkonzentration von Bedeutung ist. Durch die Bindung von intrazellulärem Calcium mit BAPTA-AM wird die ERK-Phosphorylierung durch MCI/MI und TNCB vollständig inhibiert. Die Eliminierung von Calcium im Medium durch EGTA dagegen hat keinen Einfluß. Es konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung der MAP Kinase ERK durch MCI/MI von der intrazellulären Calcium-Konzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) abhängig ist, jedoch nicht vom Einstrom von Calcium durch die Plasmamembran. Dieser Effekt ist nicht spezifisch für MCI/MI sondern kann auch für das Kontaktallergen TNCB und die Vergleichssubstanz PMA nachvollzogen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß  $[Ca^{2+}]_i$  kritisch ist für die Tyrosinphosphorylierung durch MCI/MI.

Ähnliche Ergebnisse erzielten Natarajan et al. (1998) bei der Stimulation mit reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS: reactive oxygen species). ROS bewirken einen Anstieg der Tyrosinphosphorylierung, die mit BAPTA-AM inhibiert werden kann, nicht jedoch mit EGTA (Natarajan et al. 1998). Ähnlich wie MCI/MI in dendritischen Zellen induziert Thrombin in Blutplättchen sowohl Tyrosin-Phosphorylierung (Vostal et al. 1991) als auch die Aktivierung von ERK (Nadal-Wollbold et al. 2002) in  $[Ca^{2+}]_i$ -abhängiger Weise.

Aufgrund der umfassenden Effekte von BAPTA-AM wurde überprüft, ob BAPTA-AM schon die Bindung von Kontaktallergenen an zelluläre Bestandteile verhindert. Es konnte belegt werden, daß BAPTA die Bindung von TNCB an zelluläre Proteine nicht verhindert. Die Inhibition der ERK-Phosphorylierung durch TNCB und MCI/MI muß daher darauf zurückzuführen sein, daß die durch die Bindung ausgelösten Signalmechanismen Calcium-abhängig sind.

Mit dem Calcium-Chelator BAPTA konnte gezeigt werden, daß die ERK-Aktivierung durch MCI/MI und TNCB Calcium-abhängig ist, es blieb jedoch offen, ob es durch die Kontaktallergene zu einer Mobilisierung von Calcium kommt. Durch den Einsatz von

EGTA konnte ausgeschlossen werden, daß Calcium-Einstrom für die Aktivierung von ERK von Bedeutung ist. Einen ersten Hinweis auf die Induktion intrazellulärer Calcium-Mobilisierung gab die Beobachtung, daß auch mit TMB-8 die Phosphorylierung von ERK nach Stimulation mit MCI/MI vermindert wurde. TMB-8 dient zur Unterscheidung von intra- und extrazellulärer Calcium-Mobilisierung. Nach Bauer et al. (1999) beruht der Wirkmechanismus von TMB-8 auf der Inhibition der durch  $IP_3$ -vermittelten intrazellulären Calcium-Mobilisierung.

Durch Messung von  $[Ca^{2+}]_i$  mit dem Calcium-bindenden Fluoreszenz-Farbstoff Fura-2 konnte dargestellt werden, daß  $[Ca^{2+}]_i$  nach Stimulation mit MCI/MI tatsächlich ansteigt. Dieser Effekt war sowohl in Calcium-freiem als auch Calcium-haltigem Phosphatpuffer detektierbar. Daraus geht nochmals hervor, daß extrazelluläres Calcium nicht erforderlich ist. Die Messung von  $[Ca^{2+}]_i$  bei Stimulation mit TNCB war nicht möglich, da die hohe Eigenfluoreszenz von TNCB sich mit dem Emissionsspektrum von Fura-2 überlagerte.

Der Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Zellen durch verschiedene Stimuli wie z.B. reaktive Sauerstoffverbindungen (Natarajan et al. 1998), LPS (McLeish et al. 1989), Boswelliasäuren (Altmann et al. 2002), Angiotensin (Murasawa et al. 1998) und bei der Aktivierung von T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor (Gardner 1989, Lewis 2001).

Auch das Kontaktallergen Thiomersal wird als Calcium-mobilisierende Substanz beschrieben (Elferink 1999). Thiomersal bewirkt die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern und den anschließenden Einstrom von Calcium durch die Plasmamembran. Es konnte jedoch im Gegensatz zu MCI/MI und TNCB keine Aktivierung von ERK durch Thiomersal in dendritischen Zellen detektiert werden (siehe 3.3). Außerdem stieg  $[Ca^{2+}]_i$  nach Stimulation mit MCI/MI in Calcium-haltigem Puffer nicht stärker an als in Calcium-freier Umgebung. Daher scheint sich die Calcium-Mobilisierung durch MCI/MI auf die intrazellulären Speicher zu beschränken. Die Calcium-Mobilisierung durch Thiomersal ist auf einen bestimmten Konzentrationsbereich beschränkt, so bewirken niedrige Konzentrationen die Mobilisierung von Calcium, höhere jedoch nicht (Elferink 1999). Um zu beurteilen, ob die Calcium-Mobilisierung durch

Thiomersal und MCI/MI über die gleichen Mechanismen vermittelt wird oder nicht, müßte in einer vergleichenden Studie geklärt werden.

Der Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  allein reicht nicht aus, um die frühe Aktivierung von ERK zu bewirken. Das Ionophor A23187 bewirkt einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration in dendritischen Zellen, jedoch keine Aktivierung von ERK innerhalb von 15 Minuten.

Die Behandlung mit A23187 kann die Differenzierung von myeloiden Zellen bewirken (Czernicki et al. 1997, Koski et al. 1999, Lyakh et al. 2000). Atherfold et al. (1999) zeigten, daß Calciumionophore in B- und T-Zellen schnelle und transiente ERK Aktivierung induzieren. In dendritischen Zellen jedoch bewirkte A23187 innerhalb der ersten zehn Minuten keine ERK-Phosphorylierung. Auch Werz et al. (2002) konnte in einer Monocyten Zelllinie (MonoMac6) erst nach Stimulation mit PMA die Aktivierung von ERK durch A23187 nachweisen.

Daraufhin wurde untersucht, durch welche Mechanismen das Calcium-Signal umgesetzt wird. Wichtigster Calcium-Sensor in Nicht-Muskelzellen ist Calcium-Calmodulin. Mit zwei verschiedenen Calcium-Calmodulin-Antagonisten konnte die Phosphorylierung von ERK nur in toxischen Konzentrationen vermindert werden. Die Inhibition der ERK-Phosphorylierung durch hohe Konzentrationen von Calmodulin-Antagonisten wurde als toxischer Effekt angesehen jedoch nicht auf spezifische Inhibition von Calmodulin-abhängigen Signalmechanismen zurückgeführt.

Der Einfluß von Calmodulin auf den Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg variiert Zell-Typ-spezifisch. So bewirkt Calcium-Calmodulin in neuronalen Zellen die Aktivierung von Ras über den an Calmodulin-bindenden Ras-Austauschfaktor Ras-GRF oder aber auch durch Aktivierung von Raf-1 in PC-12 Zellen. In Fibroblasten-Zelllinien dagegen bewirkt Calcium-Calmodulin eine verminderte Aktivität des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweges durch Regulation von Ras. Über Hitzeschockprotein 90 (HSP90) und Raf-1 sowie die  $PI_3$ -Kinase kann Calmodulin in Fibroblasten auch aktivierenden Einfluß auf ERK ausüben (Villalonga et al. 2001, Agell et al. 2002). Die Aktivierung von ERK in Beta-Zellen im Pankreas durch das Peptidhormon Glucagon-like Peptid 1 (GLP-1) erfolgt über Calcium-

Einstrom und Vermittlung durch Calmodulin und CaMKII (Gomez et al. 2002). Diese Zell-Typ-spezifischen Unterschiede in der Rolle von Calcium-Calmodulin bei der Aktivierung des ERK-Signalweges sind z.T. durch die unterschiedliche Expression von Calmodulinbindeproteinen zu erklären wie z.B. die auf neuronale Zellen beschränkte Expression von Ras-GRF mit CaM-Binde-Domäne oder die Expression der CaMK IV (Agell et al. 2002). In myeloiden Zellen ist Calmodulin z.B. an der durch Calcium-Mobilisierung induzierten Ausbildung von Merkmalen dendritischer Zellen (CD86, CD83, Dendriten) bei Monocyten sowie an der durch Amphotericin B-induzierten Expression von IL-1 $\beta$  beteiligt (Koski et al. 1999, Rogers et al. 1999). Außerdem konnte schon 1990 gezeigt werden, dass das Wachstum von myeloiden Vorläuferzellen durch Calmodulin-Antagonisten inhibiert wird (Katayama 1990). Aiba et al. (1997) dagegen konnten keinen Einfluß von Calmodulin auf die Hochregulation von CD86 durch NiCl<sub>2</sub> und DNCB in unreifen dendritischen Zellen beobachten. Auch ERK-Phosphorylierung durch MCI/MI in dendritischen Zellen scheint unabhängig zu sein von Calmodulin. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß es andere Effekte der Calcium-Mobilisierung nach Stimulation mit Kontaktallergenen gibt, die durch Calmodulin vermittelt werden.

Zusammenfassend bewirkt MCI/MI die Calcium-Mobilisierung aus intrazellulären Speichern, die eventuell durch IP<sub>3</sub> vermittelt wird. ERK-Aktivierung durch MCI/MI und TNCB ist abhängig von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Der Anstieg von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> jedoch ist nicht ausreichend, um die Phosphorylierung von ERK zu bewirken. Möglich ist, daß der Mechanismus der Calcium-Freisetzung bei der Aktivierung von ERK von Bedeutung ist und/oder weitere Signalelemente erforderlich sind. Außerdem wurde gezeigt, daß das MCI/MI-induzierte Calcium-Signal nicht durch Calmodulin vermittelt wird.

## 4.7 Proteinkinase C

Zu einer weiteren Gruppe von Calcium-bindenden Proteinen gehört die Proteinkinase C. Durch den Einsatz zwei verschiedener PKC-Inhibitoren Calophostin C und Ro31-8425 wurde gezeigt, daß PKC auch bei der Aktivierung von ERK durch MCI/MI eine Rolle spielt. Die Inhibition der ERK-Aktivierung durch Ro31-8425 weist auf die Beteiligung von klassischen PKC-Isoformen hin. Die Aktivität der klassischen PKC-Isoenzyme ist sowohl von Calcium, als auch von Diacylglycerol abhängig. Die Beteiligung von cPKC an der Aktivierung von ERK durch Kontaktallergene steht im Einklang mit den bisher geschilderten Beobachtungen zur Rolle von Calcium.

Die Beteiligung von Proteinkinase C an der Aktivierung der MAP Kinase ERK wurde für verschiedene Stimuli beschrieben. Thrombin bewirkt die Aktivierung von ERK2 in Blutplättchen abhängig von Calcium über cPKC-Isoformen (Nadal-Wollbold et al. 2002). Die Aktivierung von ERK durch „Gonadotropin-releasing hormone“ verläuft über die Bindung an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor und wird durch Proteinkinase C vermittelt (Outhiriaradjou et al. 2001). Alle 3 Gruppen von PKC-Isoformen sind in der Lage ERK zu aktivieren. Es gibt mindestens zwei Mechanismen, die an der Aktivierung von ERK durch PKC beteiligt sein können: PKC $\alpha$  und PKC $\eta$  können c-Raf aktivieren, die atypische PKC  $\zeta$  aktiviert MEK unabhängig von c-Raf (Cai et al. 1997, Schönwasser et al. 1998).

Die Inhibition der ERK-Phosphorylierung mit Ro31-8425 sowie der Einfluß von  $[Ca^{2+}]_i$  auf die Aktivierung von ERK durch Kontaktallergene weisen auf die Beteiligung von klassischen PKC-Isoformen hin. Gezeigt wurde, daß alle vier bekannten cPKC-Isoformen PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II und PKC $\gamma$ , welches nur schwach detektierbar war, in dendritischen Zellen exprimiert werden. Weiterhin konnte mit phosphospezifischen Antikörpern phosphorylierte PKC nachgewiesen werden (P-PKC $\alpha/\beta$ II: Thr638 bei PKC $\alpha$ , Thr641 bei PKC $\beta$ II und pan-P-PKC: Ser660 bei PKC $\beta$ II). Die Phosphorylierungen dieser Aminosäurereste ist Voraussetzung für die Aktivierung der PKC (Newton 2003). Diesen Phosphorylierungsschritten geht die Phosphorylierung am „activation loop“ voraus. Daher

ist anzunehmen, daß in dendritischen Zellen PKC $\alpha$ / $\beta$ II dreifach phosphoryliert folglich in durch Cofaktoren aktivierbarer Konformation vorliegt. Die Bindung von Calcium und DAG sollte zur Aktivierung und zur Verankerung der PKC an der Membran führen. Bei der Detektion der phosphorylierten Formen der PKC waren keine differenzierungsabhängigen Unterschiede zu beobachten. Auch in Monocyten und unreifen dendritischen Zellen war phosphorylierte PKC detektierbar.

Um einen Hinweis auf die Aktivierung von Proteinkinase C zu erhalten, wurden PKC- $\alpha$  und PKC- $\beta$ II in permeabilisierten dendritischen Zellen durchflußcytometrisch detektiert. So konnte die Translokation von PKC $\alpha$  und  $\beta$ II an die Detergenz-resistente Zellfraktion nach Stimulation mit MCI/MI und TNCB dargestellt werden. Die Assoziation der Proteinkinase C an die Membran oder das Cytoskelett erfolgt im Laufe ihrer Aktivierung durch die Cofaktoren DAG und Calcium (Newton 2003). Der verstärkte Nachweis von PKC in der Membran-Fraktion der Zellen wird als Nachweis für die Aktivierung von Proteinkinase C angesehen (siehe z.B. Kontny et al. 1999, Bapat et al. 2001). PMA bewirkt die Translokation von PKC $\beta$ II jedoch nicht von PKC $\alpha$ . Auch Chen et al. (2002) fanden bei Experimenten mit einer epidermalen Carcinom Zelllinie, daß die Aktivierung des Lipoxygenase-Promoters durch PMA hauptsächlich durch PKC $\delta$  nicht jedoch durch PKC $\alpha$  vermittelt wird.

PKC-abhängige Signalwege sind an der Induktion der Produktion von proinflammatorischen Cytokinen beteiligt. Kontny et al. (1999) zeigen, daß die durch LPS und durch Phorbol ester induzierte Expression der proinflammatorischen Cytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 in Monocyten mit dem PKC-Inhibitor Calphostin C verhindert werden kann. Auch in unreifen dendritischen Zellen wurde die Beteiligung der PKC an der LPS-induzierten Cytokin-Produktion (IL-12, TNF- $\alpha$ ) beschrieben (Aksoy 2002). Der PKC wird eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Keratinocyten und der Proliferation in Fibroblasten zugesprochen. Sowohl Calcium als auch Proteinkinase C sind an der Differenzierung von Keratinocyten beteiligt (Mitev & Miteva 1999). Die DNCB- und NiCl<sub>2</sub>-induzierte Hochregulation von CD86 von dendritischen Zellen mit dem PKC

Inhibitor H7 signifikant reduziert werden (Aiba et al. 1997). Proteinkinase C spielt somit eine Rolle bei der Induktion von Differenzierungsmerkmalen durch Kontaktallergene und der Produktion von Cytokinen.

#### **4.8 PI<sub>3</sub>-Kinase**

Die Beteiligung der PI<sub>3</sub>-Kinase an der Aktivierung von ERK durch MCI/MI konnte durch den Einsatz der PI<sub>3</sub>-Kinase-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 ausgeschlossen werden (siehe 3.8). Die Wirksamkeit des PI<sub>3</sub>-Kinase-Inhibitors LY294002 wurde durch den Nachweis der Inhibition der Phosphorylierung von AKT durch LY294002 erbracht.

Nosaka et al. (2001) beschreiben die Beteiligung der PI<sub>3</sub>-Kinase an der Aktivierung von ERK und Rac durch TNF- $\alpha$ . In dieser Studie wurde der Nachweis von Phospho-AKT als Indikator für die Wirksamkeit des PI<sub>3</sub>-Kinase-Inhibitors LY294002 eingesetzt. Somit können PI<sub>3</sub>-Kinase-abhängige Signalwege als Alternative zum klassischen Ras-Raf-MEK-ERK Weg als Mechanismus der ERK-Aktivierung durch MCI/MI ausgeschlossen werden. Die durch MCI/MI induzierten Signalereignisse unterscheiden sich auch in diesem Punkt von der NO-induzierten ERK-Aktivierung in Jurkat Zellen. Diese umfaßt neben der Aktivierung von Ras auch die Beteiligung der PI<sub>3</sub>-Kinase (Deora et al. 1998). Die PI<sub>3</sub>-Kinase spielt weiterhin eine Rolle bei der Signalweiterleitung des B-Zell-Rezeptors. Aktivierung des B-Zell-Rezeptors führt zur Ras-, PI<sub>3</sub>-Kinase- und PLC-abhängigen Aktivierung von ERK (Jacob et al. 2002). Cieslik et al. beschreiben einen Ras-unabhängigen Signalweg in Endothelzellen der über PI<sub>3</sub>K/Jak2/MEK1 die Aktivierung von ERK1/2 bewirkt (Cieslik 1999, 2001). Die Aktivierung von ERK durch IL-3 in myeloiden Zellen wird über einen PI<sub>3</sub>-Kinase und A-Raf abhängigen Signalweg vermittelt (Sutor et al. 1999).

#### 4.9 Modell der ERK-Aktivierung durch Kontaktallergene

Die Beteiligung verschiedener Signalelemente an der Aktivierung von ERK durch MCI/MI und TNCB wurden in ein Schema der ERK-Aktivierung nach Gutkind (1998, 2000) eingearbeitet (Abb. 43).

Die Aktivierung der MAPK Kinase MEK1/2 und ihre Beteiligung an der Phosphorylierung von ERK konnte gezeigt werden. Die Aktivierung von ERK verläuft jedoch nicht über den klassischen Ras-c-Raf-MEK-ERK Signalweg, da weder Ras noch c-Raf durch die beiden Kontaktallergene aktiviert werden. Eine wichtige Rolle dagegen spielt die intrazelluläre Calcium-Konzentration. Die ERK-Aktivierung durch MCI/MI und TNCB ist abhängig von  $[Ca^{2+}]_i$ . MCI/MI bewirkt die Mobilisierung von intrazellulärem Calcium.

Brand (1999) konnte zeigen, daß der intrazelluläre cAMP Gehalt nach Stimulation mit Kontaktallergenen in Monocyten leicht abfällt. Daher erscheint die Aktivierung von ERK über  $G\alpha_s$ , cAMP, PKA, Rap und B-Raf unwahrscheinlich. Dieses Modell der ERK-Aktivierung wurde für den  $\beta$ -Adrenergen Rezeptor beschrieben (Schmitt & Stork 2000, Gudermann et al. 2000).

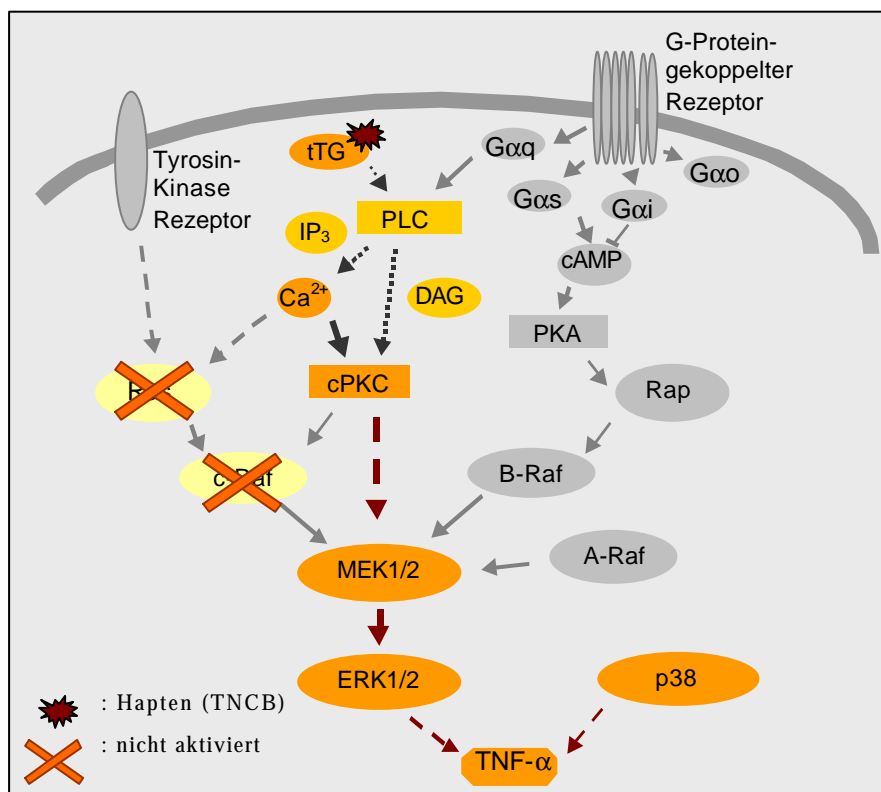


Abb. 42: hypothetisches Modell der Aktivierung von MAPK durch Haptene in DC



Insgesamt läßt sich folgendes hypothetisches Modell ableiten: Die Kopplung von Haptenen an die Gewebstransglutaminase (Zahn 2002) oder ein heterotrimeres G-Protein könnte den Ausgangspunkt darstellen für die Hapten-induzierte Signaltransduktion. Sowohl die Gewebstransglutaminase als  $\alpha$ -Untereinheit eines heterodimeren G-Proteins (Gill et al. 1998) als auch heterotrimere G-Proteine beispielsweise  $G\alpha_q$  (Rhee & Bae 1997, Fukami 2002) sind in der Lage Phospholipase C ( $\beta$ ) zu aktivieren. Durch die Aktivität von PLC $\beta$  entstehen die second messenger IP<sub>3</sub> und DAG (Rhee & Bae 1997). IP<sub>3</sub> bewirkt die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern (Streb et al. 1983), wie sie für MCI/MI gezeigt werden konnte (siehe 3.6). Calcium und DAG fördern die Aktivierung von Proteinkinase C, vorwiegend der klassischen Calcium-abhängigen Isoformen (Newton 2001, 2003). Die Aktivität von cPKC ist essentiell für die vollständige Aktivierung von ERK durch MCI/MI (siehe 3.7). Die Phosphorylierung von MEK1/2 wird nicht durch c-Raf vermittelt (siehe 3.4), könnte jedoch die alternativen Raf-Isoformen A und B (Hagemann & Rapp 1999) oder aber die kürzlich beschriebene DPK einbeziehen (Zhang et al. 2000). Die MAPK Kinase MEK1/2 wiederum phosphoryliert ERK1/2 (siehe 3.4). Sowohl ERK als auch p38 sind an der Induktion der TNF- $\alpha$  Produktion in dendritischen Zellen durch Kontaktallergene beteiligt (siehe 3.3).

In dieser Arbeit wurden eine Reihe von Signalelementen auf ihre Beteiligung an der Aktivierung von dendritischen Zellen durch Kontaktallergene hin untersucht. Durch den Ausschluß einiger Signalmechanismen, den Nachweis der Beteiligung anderer Elemente und auf der Grundlage vorhergehender Untersuchungen bzw. der Literatur konnte ein möglicher Signalweg skizziert werden. Damit trägt diese Arbeit zum Verständnis wesentlicher Teile der Aktivierung von dendritischen Zellen durch Kontaktallergene bei. Der vorgeschlagene Signalweg bietet ein Arbeitsmodell für weitere Untersuchungen, die sich mit der Beteiligung der Phospholipase C, der Verknüpfung von PKC und MEK und der Rolle der heterodimeren oder heterotrimeren G-Proteine beschäftigen sollten. Weiterhin ist von Interesse, in wie weit sich diese Ergebnisse auf andere Kontaktallergene und andere epidermale Zellen übertragen lassen.

Um Sensibilisierungen und klinische Symptome der Kontaktallergie zu reduzieren, ist es von essentieller Bedeutung zu verstehen, wie es zur Aktivierung epidermaler Zellen durch Kontaktallergene kommt. Besonders interessant sind in diesem Zusammenhang Langerhanszellen, als zentrale Immun-Modulatoren, aber auch Keratinocyten, die entscheidend zur Entwicklung einer Kontaktallergie beitragen. Die Aufklärung der molekularen Mechanismen bei der Aktivierung von epidermalen Zellen durch Kontaktallergene liefert Ansatzpunkte für die Entwicklung von Therapie- und Präventionsmaßnahmen.

## 5 Zusammenfassung

Antigen-präsentierende Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Kontaktallergie. Ziel dieser Arbeit war es, frühe Mechanismen der Signaltransduktion zu identifizieren, die an der Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen durch Kontaktallergene beteiligt sind.

- Monocyten und dendritische Zellen wurden auf ihre Eignung als **Modell für epidermale Langerhanszellen** hin untersucht. Die Aktivierbarkeit von Monocyten und dendritischen Zellen konnte durch den Anstieg der Tyrosinphosphorylierung nach Stimulation mit verschiedenen Kontaktallergenen gezeigt werden. Die durch Kontaktallergene induzierte TNF- $\alpha$ -Produktion von dendritischen Zellen belegt die funktionelle Relevanz des Modellsystems.
- Ausgehend von der Bedeutung von Cytokinen für die Differenzierung von myeloiden Zellen wurde untersucht, ob Kontaktallergene die mit Cytokin-Rezeptoren assoziierten Signalwege des **Jak/STAT-Systems** aktivieren. Es konnte keine Aktivierung von STAT-Moldekülen (STAT1, 3, 4, 5, 6) durch Kontaktallergene nachgewiesen werden. Daher ist davon auszugehen, daß Kontaktallergene die üblichen Jak/STAT-Signalwege nicht direkt aktivieren, weder durch Bindung an Jak-assoziierte Cytokin-Rezeptoren noch über deren downstream-Elemente.
- Die Aktivierung der **MAP Kinasen** ERK und p38 durch verschiedene Kontaktallergene wurde charakterisiert. MCI/MI und TNCB aktivieren ERK und p38. Nicht alle Kontaktallergene bewirken die gleichen Aktivierungsmuster. Die Phosphorylierung von ERK durch MCI/MI wurde im Vergleich zur Aktivierung von p38 als früher Mechanismus der Signaltransduktion charakterisiert. Die Beteiligung von ERK und p38 an der TNF- $\alpha$ -Induktion durch MCI/MI belegt die Relevanz dieser MAP Kinasen für die Aktivierung von dendritischen Zellen.
- Weiterhin wurden eine Reihe von upstream-Elementen von ERK untersucht. Die Aktivierung von ERK durch MCI/MI und TNCB verläuft nicht über den klassischen

**Ras-c-Raf-MEK-ERK** Signalweg. Während MEK1/2 an der Aktivierung von ERK durch MCI/MI und TNCB beteiligt ist, werden c-Raf und Ras nicht aktiviert.

- Die intrazelluläre **Calcium**-Konzentration ist wichtig für die ERK-Aktivierung durch MCI/MI und TNCB, extrazelluläres Calcium dagegen ist nicht erforderlich. Das Modellallergen MCI/MI bewirkt die Mobilisierung von intrazellulärem Calcium. Der Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  allein jedoch löst keine Aktivierung von ERK aus. Das durch MCI/MI induzierte Calcium-Signal wird nicht durch Calmodulin vermittelt.
- Durch Inhibition von **Proteinkinase C** konnte nachgewiesen werden, daß vorwiegend klassische Calcium-abhängige Isoformen der PKC an der Aktivierung von ERK durch MCI/MI beteiligt sind. Die Translokation von cPKC-Isoformen weist auf deren Aktivierung durch MCI/MI und TNCB hin. Die Inhibition von **PI<sub>3</sub>-Kinase** hingegen lieferte keinen Hinweis auf Beteiligung an der Aktivierung von ERK durch MCI/MI.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte auf der Grundlage der aktuellen Literatur ein möglicher Signalweg der Aktivierung von ERK durch Kontaktallergene entwickelt werden. Auslöser der Signalmechanismen wäre die Kopplung von Haptenen an ein heterodimeres (an die tTG siehe Zahn 2002) oder heterotrimeres G-Protein. Eine wichtige Rolle bei der Signalweiterleitung spielen die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, klassische Isoformen der Proteinkinase C und die MAPK Kinase MEK1/2. Sowohl ERK als auch p38 sind an der Induktion der TNF- $\alpha$ -Produktion durch Kontaktallergene in dendritischen Zellen beteiligt. Damit liefert diese Arbeit einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der molekularen Mechanismen bei der Aktivierung von dendritischen Zellen durch Kontaktallergene.

## 6 Literatur

- AGELL N., O. BACHS, N. ROCAMORA, P. VILLALONGA, 2002. Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by  $Ca^{2+}$ , and Calmodulin. *Cell. Signal.* 14: 649-654
- AGUIRRE MARTIN-FALERO, A., M.J. CALDERON GUTIERREZ, J.L. DIAZ-PEREZ, 1990. Contact allergy to the preservative Kathon CG. *Contact Dermatitis* 22: 185
- AIBA S., A. TERUNUMA, H. MANOME, H. TAGAMI, 1997. Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur. J. Immunol.* 27: 3031-3038
- AICHER A., G.L. SHU, D. MAGALETTI, T. MULVANIA, A. PEZZUTTO, A. CRAXTON, E.A. CLARK, 1999. Differential role for p38 mitogen-activated protein kinase in regulating CD40-induced gene expression in dendritic cells and B cells. *J. Immunol.* 163: 5786-5795
- AKSOY E., Z. AMRAOUI, S. GORIELY, M. GOLDMAN, F. WILLEMS, 2002. Critical role of protein kinase C  $\epsilon$  for lipopolysaccharide-induced IL-12 synthesis in monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 32: 3040-3049
- ALEXANDER B.R., 2002. An assessment of the comparative sensitization potential of some common isothiazolinones. *Contact Dermatitis* 48: 191-196
- ALTMANN A., L. FISCHER, M. SCHUBERT-ZSILAVECZ, D. STEINHILBER, O. WERZ, 2002. Boswellic acids activate p42MAPK and p38 MAPK and stimulate  $Ca^{2+}$  mobilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 185-190
- ANDOH A., M. SHIMADA, S. BAMBA, T. OKUNO, Y. ARAKI, Y. FUJIYAMA, T. BAMBA, 2002. Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 participate in interleukin-17 plus tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced stabilization of interleukin-6 mRNA in human pancreatic myofibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1591: 69-74
- ANTONOPOULOS C., M. CUMBERBACH, R.J. DEARMAN, R.J. DANIEL, I. KIMBER, R.W. GROVES, 2001. Functional caspase-1 is required for Langerhans cell migration and optimal contact sensitization in mice. *J. Immunol.* 166: 3672-3677
- ARRIGHI J.F., M. REBSAMEN, F. ROUSSET, V. KINDLER, C. HAUSER, 2001. A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF- $\alpha$ , and contact sensitizers. *J. Immunol.* 166: 3837-3845
- ATHERFOLD P.A., M.S. NORRIS, P.J. ROBINSON, E.W. GELFAND, R.A. FRANKLIN, 1999. Calcium-induced ERK activation in human T lymphocytes. *Mol. Immunol.* 36: 543-549
- BANCHEREAU, J. & R.M. STEINMAN, 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252
- BAPAT S., A. VERKLEIJ, J.A. POST, 2001. Peroxynitrite activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) via a MEK-independent pathway: a role for protein kinase C. *FEBS Letters* 499: 21-26
- BASKETTER D., A. DOOMS-GOOSSENS, A-T. KARLBERG, J-P. LEPOITTEVIN, 1995. The chemistry of contact allergy: why is a molecule allergenic? *Contact Dermatitis* 32: 65-73
- BASKETTER D.A. & I. KIMBER, 2001. Predictive testing in contact allergy: facts and future. *Allergy* 56: 937-943
- BAUER J., C. DAU, A. CAVARAPE, F. SCHAEFER, H. EHMKE, N. PAREKH, 1999. ANG II- and TxA<sub>2</sub>-induced mesenteric vasoconstriction in rats is mediated by separate cell signaling pathways. *Am. J. Physiol.* 277: H1-H7

- BECKER D., E. VALK, S. ZAHN, P. BRAND, J. KNOP, 2003. Coupling of contact sensitizers to thiol groups is a key event for the activation of monocytes and monocyte-derived dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 120: 233-238
- BECKER D., U. LEMPertz, A. ENK, J. SALOGA, J. KNOP, 1995. Contact sensitizers modulate mechanisms of receptor-mediated endocytosis but not fluid-phase endocytosis in murine epidermal Langerhans cells. *Exp. Dermatol.* 4: 211-217
- BECKER D., U. NEISS, S. NEIS, K. RESKE, J. KNOP, 1992. Contact allergens modulate the expression of MHC class II molecules on murine epidermal Langerhans cells by endocytotic mechanisms. *J. Invest. Dermatol.* 98: 700-705
- BERTRAND, F., D.A. BASKETTER, D.W. ROBERTS, J.P. LEPOITTEVIN, 1995. Skin sensitization to eugenol and isoeugenol in mice: possible metabolic pathways involving ortho-quinone and quinone methide intermediates. *Chem. Res. Toxicol.* 10: 335-343
- BHALLA U.S. & R. YENGER, 1999. Emergent properties of networks of biological signaling pathways. *Science* 283: 381-387
- BLINK B. VAN DEN, N.P. JUFFERMANS, T. TEN HOVE, M.J. SCHULTZ, S.J.H. VAN DEVENTER, T. VAN DER POLL, M.P. PEPELENBOSCH 2001. P38 mitogen-activated protein kinase inhibition increases cytokine release by macrophages in vitro and during infection in vivo. *J. Immunol.* 166: 582-587
- BOHN S., M. NIEDERER, K. BREHM, A.J. BIRCHER, 2000. Airborne contact dermatitis from methylchloroisothiazolinone in wall paint. Abolition of symptoms by chemical allergen inactivation. *Contact Dermatitis* 42: 196-201
- BRAND P., 1999. Humane Monozyten als Modell für die Untersuchung von Signaltransduktionsprozessen während der Aktivierung antigenpräsentierender Zellen der Haut durch Kontaktallergene. Dissertation Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- BRAND P., S. PLOCHMANN, E. VALK, S. ZAHN, J. SALOGA, J. KNOP, D. BECKER, 2002. Activation and translocation of p38 mitogen-activated protein kinase after stimulation of monocytes with contact sensitizers. *J. Invest. Dermatol.* 119: 99-106
- BROOK M., G. SULLY, A.R. CLARK, J. SAKLATVALA, 2000. Regulation of tumour necrosis factor alpha mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signalling cascade. *FEBS Lett* 483:57-61
- BRUCHHAUSEN S., S. ZAHN, E. VALK, J. KNOP, D. BECKER, 2003. Thiol antioxidants block the activation of antigen-presenting cells by contact sensitizers. *J. Invest. Dermat.* im Druck
- BRUMMER T., P.E. SHAW, M. RETH, Y. MISAWA, 2002. Inducible gene deletion reveals different roles for B-Raf and Raf-1 in B-cell antigen receptor signalling. *EMBO* 21: 5611-5622
- BRUNS R.F., F.D. MILLER, R.L. MERRIMAN, J.J. HOWBERT, W.F. HEATH, E. KOBAYASHI, I. TAKAHASHI, T. TAMAOKI, H. NAKANO, 1991. Inhibition of protein kinase C by Calphostin C is light-dependent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176: 288-293
- CAI H., U. SMOLA, V. WIXLER, I. EISENMANN-TAPPE, M.T. DIAZ-MECO, J. MOCAT, U. RAPP, G.M. COOPER, 1997. Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isotypes in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol* 17: 732-741
- CANNISTRA S.A., P. GROSHEK, R. GARLICK, J. MILLER, J.D. GRIFFIN, 1990. Regulation of surface expression of the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor receptor in normal human myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 93-97
- CARTER A.B., M.M. MONICK, G.W. HUNNINGHAKE, 1999. Both ERK and p38 are necessary for cytokine gene transcription. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20: 751-758

- CHANG, L. & M. KARIN, 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37-40
- CHEN B-K., T-Y. TSAI, H-S. HUANG, L-C. CHEN, W-C. CHANG, S-B. TSAI, W-C. CHANG, 2002. Functional role of extracellular signal-regulated kinase activation and c-Jun induction in phorbol ester-induced promoter activation of human 12(S)-lipoxygenase gene. *J. Biomed. Sci.* 9: 156-165
- CHIN D. & A.R. MEANS, 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* 10: 322-328
- CHONG H., J. LEE, K.L. GUAN, 2001. Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *EMBO* 20: 3716-3727
- CIESLIK K., C.S. ABRAMS, K.K. WU, 2001. Up-regulation of endothelial nitric-oxide synthase promoter by the phosphatidylinositol 3-kinase  $\gamma$ /Janus kinase 2/MEK-1-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 276: 1211-1219
- COBB, M.H., 1999. MAP kinase pathways. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 71: 479-500
- COOMBS, R.R.A. & GELL, P.G.H., 1975. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. Clinical aspects of Immunology 3. Edition Blackwell, Oxford
- COOMBS, R.R.A. & P.G.H. GELL, 1963. The classification of allergic reactions underlying disease. Clinical Aspects of Immunology, 317
- CUENDA A., J. ROUSE, Y.N. DOZA, R. MEIER, P. COHEN, T.F. GALLAGHER, P.R. YOUNG, J.C. LEE, 1995. SB203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Letters* 364: 229-233
- CZERNIECKI B.J., C. CARTER, L. RIVOLTINI, G.K. KOSKI, H.I. WENG, J.G. ROROS, Y.M. HIJAZI, S. XU, S.A. ROSENBERG, P.A. COHEN, 1997. Calcium ionophore-treated peripheral blood monocytes and dendritic cells rapidly display characteristics of activated dendritic cells. *J. Immunol.* 159: 3823-3837
- DARNELL J.E. JR, 1997. STATs and gene regulation. *Science* 277: 1630-1635
- DAUB H., C. WALLASCH, A. LANKENAU, A. HERRLICH, A. ULLRICH, 1997. Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO* 16 : 7032-7044
- DE GROOT, A.C. & A. HERXHEIMER, 1989. Isothiazolinone preservative: cause of a continuing epidemic of cosmetic dermatitis. *Lancet* 1: 314-316
- DE SMEDT T., B. PAJAK, E. MURAILLE, L. LESPARGNARD, E. HEINEN, P. DE BAETSELIER, J. URBAIN, O. LEO, M. MOSER, 1996. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J. Exp. Med.* 184: 1413-1424
- DEMPSEY E.C., A.C. NEWTON, D. MOCHLY-ROSEN, A.P. FIELDS, M.E. REYLAND, P.A. INSEL, R.O. MESSING, 2000. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279: L429-L438
- DEORA A.A., D.P. HAJJAR, H.M. LANDER, 2000. Recruitment and activation of Raf-1 kinase by nitric oxide-activated Ras. *Biochemistry* 39: 9901-9908
- DEORA A.A., T. WIN, B. VANHAESEBROECK, H.M. LANDER, 1998. A redox-triggered Ras-effector interaction. *J. Biol. Chem.* 273: 29923-29928
- DHILLON A.S. & W. KOLCH, 2002. Untying the regulation of Raf-1 kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 404: 3-9
- DHILLON A.S., S. MEIKLE, Z. YAZICI, M. EULITZ, W. KOLCH, 2002. Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *EMBO* 21: 64-71
- DONG C., R.J. DAVIS, R.A. FLAVELL, 2002. MAP kinases in the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 55-72

- DUDLEY D.T., L.PANG, S.J. DECKER, A.J. BRIDGES, A.R. SALTIEL, 1995. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 7686-7689
- ELFERINK, J.G.R., 1999. Thimerosal – a versatile sulfhydryl reagent, calcium mobilizer, and cell function-modulating agent. *Gen. Pharmacol.* 33: 1-6
- ENK A.H. & S.I. KATZ, 1992. Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1398-1402
- ESNAULT S. & J.S. MALTER, 2002. Extracellular signal-regulated kinase mediates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger RNA stabilization in tumor necrosis factor-alpha plus fibronectin-activated peripheral blood eosinophils. *Blood* 99 (11):4048-52
- EYCHENE A, I. DUSANTER-FOURT, J.V. BARNIER, C. PAPIN, M. CHARON, S. GISSELBRECHT, G. CALOTHY, 1995. Expression and activation of B-Raf kinase isoforms in human and murine leukemia cell lines. *Oncogene* 10: 1159-1165
- FRANKE R.R., T.P. SAKMAR, R.M. GRAHAM, H.G. KHORANA, 1992. Structure and function in rhodopsin. Studies of the interaction between the rhodopsin cytoplasmic domain and transducin. *J. Biol. Chem.* 267: 14767-14774
- FROSCH P.J., T. RUSTENMEYER, A. SCHNUCH, 1996a. Kontaktdermatitis I. *Hautarzt* 47: 874-882
- FROSCH P.J., T. RUSTENMEYER, A. SCHNUCH, 1996b. Kontaktdermatitis II. *Hautarzt* 47: 874-882
- FRUCHT D.M., M. ARINGER, J. GALON, C. DANNING, M. BROWN, S. FAN, M. CENTOLA, C.Y. WU, N. YAMADA, H. EL GABALAWY, J.J. O'SHEA, 2000. Stat4 is expressed in activated peripheral blood monocytes, dendritic cells, and macrophages at sites of Th1-mediated inflammation. *J. Immunol.* 164: 4659-4664
- FUKAMI K., 2002. Structure, regulation, and function of phospholipase C Isozymes. *J. Biochem. (Tokyo)* 131: 293-299
- FUKAO T., D.M. FRUCHT, G. YAP, M. GADINA, J.J. O'SHEA, S. KOYASU, 2001. Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses. *J. Immunol.* 166: 4446-4455
- GARDNER P., 1989. Calcium and T lymphocyte activation. *Cell* 59: 15-20
- GILL, L.S., V.K. PABBATHI, M. VIGNES, L.W. HAYNES, 1998. Altered distribution of G $\alpha_h$ /type2 transglutaminase following catecholamine deprivation is associated with depression of adrenoreceptor signal transduction in cultured ventricular zone germinal cells. *Brain Research* 788: 95-103
- GOMEZ E., C. PRITCHARD, T.P. HERBERT, 2002. cAMP-dependent protein kinase and Ca<sup>2+</sup> influx through L-type voltage-gated calcium channels mediate Raf-independent activation of extracellular regulated kinase in response to glucagon-like peptide-1 in pancreatic  $\beta$ -cells. *J. Biol. Chem.* 277: 48146-48151
- GRABBE, S. & T. SCHWARZ, 1998. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol. Today* 19: 37-44
- GREDDINGER E., A.N. GERBER, Y. TAMIR, S.J. TAPSCOTT, E. BENGAL, 1998. Mitogen-activated protein kinase pathway is involved in the differentiation of muscle cells. *J. Biol. Chem.* 273: 10436-10444
- GRYNKIEWICZ G., M. POENIE, R.Y. TSIEN, 1985. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450
- GUDERMANN, T., R. GROSSE, G. SCHULTZ, 2000. Contribution of receptor/G protein signaling to cell growth and transformation. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 361: 345-362



- GUHA M., M.A. O'CONNELL, R. PAWLINSKI, A. HOLLIS, P. MCGOVERN, S-F. YAN, D. STERN, N. MACKMAN, 2001. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor  $\alpha$  expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood* 98: 1429-1439
- GUTKIND J.S., 1998. The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.* 273: 1839-1842
- GUTKIND J.S., 2000. Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G-protein coupled receptors. *Sci STKE* 2000 (40): RE1
- GUYTON K.Z., Y. LIU, M. GOROSPE, Q. XU, N.J. HOLBROOK, 1996. Activation of mitogen-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 271: 4138-4142
- HAGEMANN C. & J.L. BLANK, 2001. The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cellular Signalling* 13: 863-875
- HAGEMANN C. & U. RAPP, 1999. Isotype-specific functions of Raf-kinases. *Exp. Cell Res.* 253: 34-46
- HENNING S.W. & D.A. CANTRELL, 1998. GTPases in antigen receptor signalling. *Curr. Opin. Immunol* 10: 322-329
- HERLAAR E. & Z. BROWN, 1999. P38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol. Med. today* 5: 439-447
- HIPPENSTIEL S., S. SOETH, B. KELLAS, O. FUHRMANN, J. SEYBOLD, M. KRÜLL, C. V. EICHEL-STREIBER, M. GOEBELER, S. LUDWIG, N. SUTTORP, 2000. Rho proteins and the p38-MAPK pathway are important mediators for LPS-induced interleukin-8 expression in human endothelial cells. *Blood* 95: 3044-3051
- IHLE J.N., 2001. The Stat family in cytokine signalling. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13: 211-217
- IKARASHI, Y., J. MOMMA, T. TSUCHIYA, A. NAKAMURA, 1996. Evaluation of skin sensitization potential of nickel, chromium, titanium and zirconium salts using guinea-pigs and mice. *Biomaterials* 17: 2103-2108
- IKURA M., 1996. Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *TIBS* 21: 14-17
- JACOB A., D. COONEY, M. PRADHAN, K.M. COGGESHALL, 2002. Convergence of signaling pathways on the activation of ERK in B cells. *J. Biol. Chem.* 277: 23420-23426
- JANEWAY, C.A. & P.T. TRAVERS, 1997. Immunologie. 2. Aufl. Heidelberg, Berlin, Oxford (Spektrum)
- JONULEIT H., J. KNOP, A.H. ENK, 1996. Cytokines and their effects on maturation, differentiation and migration of dendritic cells. *Arch. Dermatol. Res.* 289: 1-8
- JONULEIT H., U. KÜHN, G. MÜLLER, K. STEINBRINK, L. PARAGNIK, E. SCHMITT, J. KNOP, A.H. ENK, 1997. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur. J. Immunol.* 27: 3135-3142
- JORDAN J.D., E.M. LANDAU, R. IYENGAR, 2000. Signaling networks: the origins of cellular multitasking. *Cell* 103: 193-200
- KATAYAMA N., M. NISHIKAWA, F. KOMADA, N. MINAMI, S. SHIRAKAWA, 1990. A role for calmodulin in the growth of human hematopoietic progenitor cells. *Blood* 75: 1446-1454.
- KERANEN L.M., E.M. DUTIL, A.C. NEWTON, 1995. Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr. Biol.* 5: 1394-1403
- KIM J., M-Y. YOON, S-L. CHOI, I. KANG, S-S. KIM, Y-S. KIM, Y-K. CHOI, J. HA, 2001. Effects of stimulation of AMP-activated protein kinase on insulin-like growth factor 1- and epidermal growth factor-dependent extracellular signal-regulated kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 276: 19102-19110

- KIMBER I. & M. CUMBERBATCH, 1992. Stimulation of Langerhans cell migration by tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha). *J. Invest. Dermatol.* 99: 48S-50S
- KIMBER, I. & R. DEARMAN, 2002. Allergic contact dermatitis: the cellular effectors. *Contact Dermatitis* 46: 1-5
- KLEE C.B., H. REN, X. WANG, 1998. Regulation of the Calmodulin-stimulated protein phosphatase Calcineurin. *J. Biol. Chem.* 273: 13367-13370
- KOLCH W., 2000. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.* 351: 289-305
- KONTNY E., M. ZIÖLKOWSKA, A. RYZEWSKA, W. MASLINSKI, 1999. Protein kinase C-dependent pathway is critical for the production of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6). *Cytokine* 11: 839-848
- KOSKI G.K., G.N. SCHWARTZ, D.E. WENIG, B.J. CZERNIECKI, C. CARTER, R.E. GRESS, P.A. COHEN, 1999. Calcium mobilization in human myeloid cells results in acquisition of individual dendritic cell-like characteristics through discrete signaling pathways. *J. Immunol.* 163: 82-92
- KUBICEK M., M. PACHER, D. ABRAHAM, K. PODAR, M. EULITZ, M. BACCARINI, 2002. Dephosphorylation of Ser-259 regulates Raf-1 membrane association. *J. Biol. Chem.* 277: 7913-7919
- KÜHN U., P. BRAND, J. WILLEMSSEN, H. JONULEIT, A.H. ENK, R. VAN BRANDWIJK-PETERSHANS, J. SALOGA, J. KNOP, D. BECKER, 1998. Induction of tyrosine phosphorylation in human MHC class II-positive antigen-presenting cells by stimulation with contact sensitizers. *J. Immunol.* 160: 667-673
- KUROSAWA M., S. NUMAZAWA, Y. TANI, T. YOSHIDA, 2000. ERK signaling mediates the induction of inflammatory cytokines by bufalin in human monocytic cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278: C500-C508
- KYRIAKIS J.M. & J. AVRUCH, 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Phys. Rev.* 81: 807-869
- KYRIAKIS, J.M., 1997. Making the connection: coupling of stress-activated ERK/MAPK (extracellular-signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase) core signalling modules to extracellular stimuli and biological responses. *Biochem. Soc. Symp.* 64: 29-48
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- LANDER H.M., 1996. Cellular activation mediated by nitric oxide. *Methods* 10: 15-20
- LANDER H.M., D.P. HAJAR, B.L. HEMPSTEAD, U.A. MIRZA, B.T. CHAIT, S. CAMPBELL, L.A. QUILLIAM, 1997. A molecular redox switch on p<sup>21</sup> ras. *J. Biol. Chem.* 272: 4323-4326
- LANDER H.M., J.S. OGIESTE, K.K. TENG, A. NOVOGRODSKY, 1995. p21<sup>ras</sup> as a common signaling target of reactive free radicals and cellular redox stress. *J. Biol. Chem.* 270: 21195-21198
- LAPTEVA N., Y. ANDO, M. NIEDA, H. HOHJOH, M. OKAI, A. KIKUCHI, G. DYMSHITS, Y. ISHIKAWA, T. JUJI, K. TOKUNAGA, 2001. Profiling of genes expressed in human monocytes and monocyte-derived dendritic cells using cDNY expression array. *Br. J. Haematol.* 114: 191-197
- LEE S., M. EOM, S.J. LEE, S. KIM, H. PARK, D. PARK, 2001.  $\beta$ Pix-enhanced p38 activation by Cdc42/Rac/PAK/MKK3/6-mediated pathway. *J. Biol. Chem.* 276: 25066-25072
- LEE S.A., J.K. PARK, E.K. KANG, H.R. BAE, K.W. BAE, H.T. PARK, 2000. Calmodulin-dependent activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases contribute to c-fos expression by calcium in PC12 cells: modulation by nitric oxide. *Mol. Brain Res.* 75: 16-24

- LEWIS R.S., 2001. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 497-521
- LI Y.Q., C.S.T. HUI, M. COSTABILE, D. GOH, C.J. DER, A. FERRANTE, 1999. Regulation of lymphotoxin production by the p<sup>21</sup>ras-raf-MEK-ERK cascade in PHA/PMA-stimulated Jurkat cells. *J. Immunol.* 162: 3316-3320
- LIEBMANN C., 2001. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: Paradigms of multiplicity. *Cell. Signal.* 13: 777-785
- LIU K.D., S.L. GAFFEN, M.A. GOLDSMITH, 1998. Jak/STAT signalling by cytokine receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 271-278
- LUDWIG S., A. HOFFMEYER, M. GOEBELER, K. KILIAN, H. HÄFNER, B. NEUFELD, J. HAN, R.R. RAPP, 1998. The stress inducer arsenite activates mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 via a MAPK kinase 6/p38-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 273: 1917-1922
- LYAKH L.A., G.K. KOSKI, W. TELFORD, R.E. GRESS, P.A. COHEN, N.R. RICE, 2000. Bacterial lipopolysaccharide, TNF- $\alpha$ , and calcium ionophore under serum-free conditions promote rapid dendritic cell-like differentiation in CD14<sup>+</sup> monocytes through distinct pathways that activate NF-kappa B. *J. Immunol.* 165: 3647-3655
- MANOME H., S. AIBA, H. TAGAMI, 1999. Simple chemicals can induce maturation and apoptosis of dendritic cells. *Immunology* 98: 481-490
- MCLEISH K.R., W.L. DEAN, S.R. WELLHAUSEN, G.T. STELZER, 1989. Role of intracellular calcium in priming of human peripheral monocytes by bacterial lipopolysaccharide. *Inflammation* 13: 681-692
- MCLELLAN A.D., R.V. SØRG, L.A. WILLIAMS, D.N.J. HART, 1996. Human dendritic cells activate T lymphocytes via CD40:CD40 ligand-dependent pathway. *Eur. J. Immunol.* 26: 1204-1210
- MELENDEZ A.J. & J.M. ALLEN, 2002. Phospholipase D and immune receptor signalling. *Immunology* 14: 49-55
- MICHAL G., 1999. Zelluläre Kommunikation. In: G. MICHAL (Hrsg.). Biochemical Pathways – Biochemie Atlas. Heidelberg, Berlin (Spektrum): 201-207
- MITEV V. & L. MITEVA, 1999. Signal transduction in keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 8: 96-108
- MURASAWA S., Y. MORI, Y. NOZAWA, H. MASAKI, K. MARUYAMA, Y. TSUTSUMI, Y. MORIGUCHI, Y. SHIBASAKI, Y. TANAKA, T. IWASAKA, M. INADA, H. MATSUBARA, 1998. Role of Calcium-sensitive tyrosine kinase Pyk2/CAK $\beta$ /RAFTK in Angiotensin II-induced Ras/ERK signaling. *Hypertension* 32: 668-675
- NADAL-WOLLBOLD F., M. PAWLOWSKI, S. LÉVY-TOLEDANO, E. BERROU, J-P. ROSA, M. BRYCKAERT, 2002. Platelet ERK2 activation by thrombin is dependent on calcium and conventional protein kinases C but not Raf-1 or B-Raf. *FEBS Letters* 531: 475-482
- NADIF KASRI N., G. BULTNYNCK, I. SIENAERT, G. CALLEWAERT, C. ERNEUX, L. MISSIAEN, J.B. PRYS, H. DE SMEDT, 2002. The role of calmodulin for inositol 1,4,5-trisphosphate receptor function. *Biochim. Biophys. Acta* 1600: 19-31
- NAGAYAMA H., K. SATO, H. KAWASAKI, M. ENOMOTO, C. MORIMOTO, K. TADOKORO, T. JUJI, S. ASANO, T. TAKAHASHI, 2000. IL-12 responsiveness and expression of IL-12 receptor in human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 165: 59-66
- NAKAOKA H., D.M. PEREZ, K.J. BAEK, T. DAS, A. HUSAIN, K. MISONO, M.J. IM, R.M. GRAHAM, 1994. Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function. *Science* 264: 1593-1596

- NATARAJAN V., W.M. SCRIBNER, M. AL-HASSANI, S. VEPA, 1998. Reactive oxygen species signaling through regulation of protein tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *Environ. Health Perspect.* 106: 1205-1212
- NEISIUS U., P. BRAND, S. PLOCHMANN, J. SALOGA, J. KNOP, D. BECKER, 1999. Detection of increased tyrosine phosphorylation in murine Langerhans cells after stimulation with contact sensitizers. *Arch. Dermatol. Res.* 291: 22-27
- NEWTON A.C., 1995. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* 270: 28495-28498
- NEWTON A.C., 1997. Regulation of protein kinase C. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 161-167
- NEWTON A.C., 2001. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem. Rev.* 101: 2353-2364
- NEWTON A.C., 2003. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem. J.* 370: 361-371
- NOSAKA Y., A. ARAI, E. KANDA, T. AKASAKI, H. SUMIMOTO, N. MIYASAKA, O. MIURA, 2001. Rac is activated by tumor necrosis factor  $\alpha$  and is involved in activation of ERK. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 285: 675-679
- OUTHIRIARADJOU B., Z. NAOR, R. SEGER, 2001. Role of dynamin, Src, and Ras in the protein kinase C-mediated activation of ERK by gonadotropin-releasing hormone. *J. Biol. Chem.* 276: 4554-4563
- PETERSON E.J., J.L. CLEMENS, N. FANG, G.A. KORETZKY, 1998. Adaptor proteins in lymphocyte antigen-receptor signaling. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 337-344
- PIGUET P.F., G.E. GRAU, C. HAUSER, P. VASSALLI, 1991. Tumor necrosis factor is a critical mediator in hapten-induced irritant and contact hypersensitivity reactions. *J. Exp. Med.* 173: 673-679
- RAINGEAUD J., A.J. WHITMARSH, T. BARRETT, B. DÉRIJARD, R.J. DAVIS, 1996. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell Biol.* 16: 1247-1255
- RAINGEAUD J., S. GUPTA, J.S. ROGERS, M. DICKENS, J. HAN, R.J. ULEVITCH, R.J. DAVIS 1995. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.* 270: 7420-7426
- RENART J., J. REISER, G.R. STARK, 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3116-3120
- RENZ H., J. DOMENICO, E.W. GELFAND, 1991. IL-4-dependent up-regulation of IL-4 receptor expression in murine T and B cells. *J. Immunol.* 146: 3049-3055
- RHEE S.G. & Y.S. BAE, 1997. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 272: 15045-15048
- ROBERTS, D.W. & J-P. LEPOITTEVIN, 1998. Hapten-protein interactions. In: J-P. LEPOITTEVIN, D.A. BASKETTER, A. GOOSSENS, A-T. KARLBERG (Hrsg.), Allergic contact dermatitis. The molecular basis. Berlin, Heidelberg, New York (Springer Verlag): 81-111
- ROGERS P.D., R.E. KRAMER, S.W. CHAPMAN, J.D. CLEARY, 1999. Amphotericin B-induced interleukin-1 $\beta$  expression in human monocytic cells is calcium and calmodulin dependent. *J. Infect. Dis.* 180: 1259-1266
- ROMANI N., A. LENZ, H. GLASSEL, H. STOSSEL, U. STANZL, O. MAJDIC, P. FRITSCH, G. SCHULER, 1989b. Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J. Invest. Dermatol.* 93: 600-609

- ROMANI N., S. GRUNER, D. BRANG, E. KÄMPGEN, A. LENZ, B. TROCKENBACHER, G. KONWALINKA, P.O. FRITSCH, M. STEINMAN, G. SCHULER, 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 180: 83-93
- ROMANI N., S. KOIDE, M. CROWLEY, M. WITMER-PACK, A.M. LIVINGSTONE, C.G. FATHMAN, K. NABA, R.M. STEINMAN, 1989a. Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones: intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 169: 1169-1178
- RØTTINGEN J.A. & J.G. IVERSEN, 2000. Ruled by waves? Intracellular and intercellular calcium signalling. *Acta Physiol. Scand.* 169: 203-21
- RUTAULT K., C.A. HAZZALIN, L.C. MAHADEVAN, 2001. Combinations of ERK and p38 MAPK inhibitors ablate tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) mRNA induction. *J. Biol. Chem.* 276: 6666-6674
- SALLUSTA F. & A. LANZAVECCHIA, 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *J. Exp. Med.* 179: 1109-1118
- SALLUSTO F., M. CELLA, C. DANIELI, A. LANZAVECCHIA, 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: Downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182: 389-400
- SANTINI M.P., C. TALORA, T. SEKI, L. BOLGAN, G.P. DOTTO, 2001. Cross talk among calcineurin, Sp1/Sp3, and NFAT in control of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression in keratinocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 9575-9580
- SATO K., H. NAGAYAMA, K. TADOKORO, T. JUJI, T.A. TAKAHASHI, 1999. Extracellular signal-regulated kinase, stress-activated protein kinase/cJun N-terminal kinase, and p38<sup>mapk</sup> are involved in IL-10-mediated selective repression of TNF- $\alpha$ -induced activation and maturation of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 162: 3865-3872
- SATO T., M. NAKAFUKU, Y. KAZIRO, 1992. Function of Ras as a Molecular Switch in Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* 267: 24149-24152
- SCHEYNIUS A., 1998. Immunological Aspects. In: J-P. LEPOITTEVIN, D.A. BASKETTER, A. GOOSSENS, A-T. KARLBERG (Hrsg.). Allergic contact dermatitis. The molecular basis. Berlin, Heidelberg, New York (Springer Verlag): 4-17
- SCHINDLER, C. & J.E. DARNELL, 1995. Transcriptional responses to polypeptide ligands: The JAK-STAT pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 621-651
- SCHMID-ALLIANA A., L. MÈNOU, S. MANIÉ, H. SCHMID-ANTOMARCHI, M-A. MILLET, S. GURIATO, B. FERRUA, B. ROSSI, 1998. Microtubule integrity regulates src-like and extracellular signal-regulated kinase activities in human pro-monocytic cells. *J. Biol. Chem.* 273: 3394-3400
- SCHMIDT M., M. GOEBELER, G. POSERN, S.M. FELLER, C.S. SEITZ, E-B. BRÖCKER, U.R. RAPP, S. LUDWIG, 2000. Ras-independent activation of the Raf/MEK/ERK pathway upon calcium-induced differentiation of keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 275: 41011-41017
- SCHMITT J.M. & P.J.S. STORK, 2000.  $\beta$ 2-Adrenergic receptor activates extracellular signal-regulated kinases (ERKs) via the small G protein Rap1 and the serine/threonine kinase B-Raf. *J. Biol. Chem.* 275: 25342-25350
- SCHÖNWASSER D.C., R.M. MARAIS, C.J. MARSHALL, P.J. PARKER, 1998. Activation of the mitogen-activated protein kinase / extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel and atypical protein kinase C isotypes. *Mol. Cell. Biol.* 18: 790-798

- SENALDI G., P. POINTAIRE, P-F. FIGUET, G.E. GRAU, 1994. Protective Effect of N-acetylcysteine in hapten-induced irritant and contact hypersensitivity reactions. *J. Invest. Dermatol.* 102: 934-937
- SHORNICK L.P., A.K. BISARYA, D.D. CHAPLIN, 2001. IL-1 $\beta$  is essential for Langerhans cell activation and antigen delivery to the lymph nodes during contact sensitization: evidence for a dermal source of IL-1 $\beta$ . *Cell. Immunol.* 211: 105- 112
- SHORT S.M., J.L. BOYER, R.L. JULIANO, 2000. Integrins regulate the linkage between upstream and downstream events in G protein-coupled receptor signaling to mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 275: 12970-12977
- SICHERI F., I. MOAREFI, J. KURIYAN, 1997. Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* 385: 602-609
- SMITHGALL T.E., S.D. BRIGGS, S. SCHREINER, E.C. LERNER, H. CHENG, M.B. WILSON, 2000. Control of myeloid differentiation and survival by Stats. *Oncogene* 19: 2612-2618
- SODERLING T.R., 1999. The Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *TIBS* 24: 232-236
- STEINMAN R.M. & J. SWANSON, 1995. The endocytic activity of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 182: 283-288
- STREB H., R.F. RVINE, M.J. BERRIDGE, I. SCHULZ, 1983. Release of Ca<sup>2+</sup> from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 306: 67-69
- SUTOR S.L., B.T. VROMAN, E.A. ARMSTRONG, R.T. ABRAHAM, L.M. KARNITZ, 1999. A phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway that differentially regulates c-Raf and A-Raf. *J. Biol. Chem.* 274: 7002-7010
- TAKANAMI-OHNISHI Y., S. AMANO, S. KIMURA, S. ASADA, A. UTANI, M. MARUYAMA, H. OSADA, H. TSUNODA, Y. IRUKAYAMA-TOMOBE, K. GOTO, M. KARIN, T. SUDO, Y. KASUYA, 2002. Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in contact hypersensitivity. *J. Biol. Chem.* 277: 37896-903
- TEUNISSEN, M.B., 1992. Dynamic nature and function of epidermal Langerhans cells in vivo and in vitro: a review, with emphasis on human Langerhans cells. *Histochem. J.* 24: 697-716
- TUSCHL H. & R. KOVAC, 2001. Langerhans cells and immature dendritic cells as model systems for screening of skin sensitizers. *Toxicol. In Vitro* 15: 327-331
- TUSCHL H., R. KOVAC, E. WEBER, 2000. The expression of surface markers on dendritic cells as indicators for the sensitizing potential of chemicals. *Toxicol. In Vitro* 14: 541-549
- UNDERWOOD D.C., R.R. OSBORN, C.J. KOTZER, J.L. ADAMS, J.C. LEE, E.F. WEBB, D.C. CARPENTER, S. BOCHNOWICZ, H.C. THOMAS, D.W.P. HAY, D.E. GRISWOLD, 2000. SB 239063, a potent p38 MAP kinase inhibitor, reduces inflammatory cytokine production, airways eosinophil infiltration, and persistence. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293: 281-288
- VAN DEN BLINK B., N.P. JUFFERMANS, T. TEN HOVE, M.J. SCHULTZ, S.J.H. VAN DEVENTER, T. VAN DER POLL, M.P. PEPPELENBOSCH, 2001. P38 mitogen-activated protein kinase inhibition increases cytokine release by macrophages in vitro and during infection in vivo. *J. Immunol.* 166: 582-587
- VERHASSELT V., C. BUELENS, F. WILLEMS, D. DE GROOTE, N. HAEFFNER-CAVAILLON, M. GOLDMAN, 1997. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells. *J. Immunol.* 158: 2919-2925
- VERHASSELT V., M. GOLDMAN, F. WILLEMS, 1998. Oxidative stress up-regulates IL-8 and TNF- $\alpha$  synthesis by human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 28: 3886-3890
- VILLALONGA P., C. LOPEZ-ALCALA, M. BOSCH, A. CHILOECHES, N. ROCAMORA, J. GIL, R. MARAIS, C.J. MARSHALL, O. BACHS, N. AGELL, 2001. Calmodulin binds to K-Ras, but not to H- or N-Ras, and modulates its downstream signaling. *Mol. Cell. Biol.* 21: 7345-54.

- WANG B., H. FUJISAWA, L. ZHUANG, S. KONDO, G.M. SHIVJI, C.S. KIM, T.W. MAK, D. N. SAUDER, 1997. Depressed Langerhans cell migration and reduced contact hypersensitivity response in mice lacking TNF receptor p75. *J. Immunol* 159: 6148-6155
- WEINLICH G., M. HEINE, H. STOSSEL, M. ZANELLA, P. STOITZNER, U. ORTNER, J. SMOLLE, F. KOCH, N.T. SEPP, G. SCHULER, N. ROMANI, 1998. Entry into afferent lymphatics and maturation in situ of migrating murine cutaneous dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 110: 441-448
- WELKER P., J. GRABBE, T. ZUBERBIER, A. GRUTZKAU, B.M. HENZ, 2001. GM-CSF downmodulates c-kit, Fc(ε)RI(α) and GM-CSF receptor expression as well as histamine and tryptase levels in cultured human mast cells. *Arch. Dermatol. Res.* 293: 249-258
- WONG S.K. & E.M. ROSS, 1994. Chimeric muscarinic cholinergic: beta-adrenergic receptors that are functionally promiscuous among G proteins. *J. Biol.Chem.* 269: 18968-18976
- WURSTER A.L., T. TANAKA, M.J. GRUSBY, 2000. The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene* 19: 2577-2584
- XU W., S.C. HARRISON, M.J. ECK, 1997. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385: 595-602
- YOKOZEKI H., M. GHOREISHI, S. TAKAGAWA, K. TAKAYAMA, T. SATOH, I. KATAYAMA, K. TAKEDA, S. AKIRA, K. Nishioka, 2000. Signal transducer and activator of transcription 6 is essential in the induction of contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.* 191: 995-1004
- YUNG Y., Y. DOLGINOV, Z. YAO, H. RUBINFELD, D. MICHAEL, T. HANOCH, E. ROUBINI, Z. LANDO, D. ZHARHARY, R. SEGER, 1997. Detection of ERK activation by a novel monoclonal antibody. *FEBS Letters* 408: 292-296
- ZAHN S., 2002. Mechanismus der funktionell relevanten Kopplung von Kontaktallergenen in dendritischen Zellen. Dissertation Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- ZHANG S. & M.H. KAPLAN, 2000. The p38 mitogen-activated protein kinase is required for IL-12-induced IFN-γ expression. *J. Immunol.* 165: 1374-1380
- ZHANG W., T. CHEN, T. WAN, L. HE, N. LI, Z. YUAN, X. CAO, 2000. Cloning of DPK, a novel dendritic cell-derived protein kinase activating the ERK1/ERK2 and JNK/SAPK pathways. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 274: 872-879
- ZHU W., J.S. DOWNEY, J. GU, F. DI PADOVA, H. GRAM, J. HAN, 2000. Regulation of TNF Expression by multiple mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Immunol.* 164: 6349-6358
- ZISSU D., 2002. The sensitizing potential of various biocides in the guinea pig maximization test. *Contact Dermatitis* 46: 224-227

## 7 Abkürzungen

APC	Antigen-präsentierende Zellen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2 bis-aminophenoxy-ethyl-tetraacetat
BAC	Benzalkoniumchlorid
BCA	Bicinchoninsäure
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
$[Ca^{2+}]_i$	freie cytoplasmatische Calcium-Konzentration
CD	“cluster of differentiation”
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cys	Cystein
DAG	Diacylglycerin
DC	dendritische Zellen
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNCB	1-Chlor-2,4-Dinitrothiocyanobenzol
DNFB	Dinitrofluorbenzol
DPK	“dendritic cell derived protein kinase”
DTAF	Dichlorotriazinylamino-Fluorescein
ECL	“enhanced chemiluminescence”
EDTA	Ethylen-diamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-( $\beta$ -aminoethylether)-tetraacetat
ERK	“extracellular regulated protein kinase”
FACS	“fluorescence activated cell sorter”
FCS	“foetal calf serum”
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	“forward scatter”
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GM-CSF	Granulocyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
HLA	“human leucocyte antigen”
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1RA	IL-1-Rezeptor Antagonist
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
Jak	Janus Kinase
JNK	“cJun N-terminal kinase”
kD	kilo Dalton
KÜ	Kulturüberstand
LPS	Lipopolysaccharid
LC	Langerhanszellen
MAPK	“mitogen activated protein kinase”
MAPKAPK	“mitogen activated protein kinase activated protein kinase”
MAPKK	MAPK Kinase
MAPKKK	MAPKK Kinase



---

MCI/MI	Chlormethylisothiazolon/Methylisothiazolon
MHC	“major histocompatibility complex”
mRNA	“messenger” Ribonucleinsäure
NiSO <sub>4</sub>	Nickelsulfat
NO	Stickstoffmonoxid
P-	Phospho-
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBMC	“peripheral blood mononuclear cells”
PBS	“phosphate buffered saline”
PDK-1	“phosphoinositid-dependent kinase-1”
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PI	Propidiumiodid
PI <sub>3</sub> -K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B (AKT)
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
PVDF	Polyvenylidenfluorid
RPA	“RNase protection assay”
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SSC	“side scatter”
STAT	“signal transducer and activator of transcription”
TBS	“Tris buffered saline”
T <sub>C</sub>	cytotoxische T-Zellen
TFP	Trifluoperazine
T <sub>H</sub>	T-Helferzellen
Thr	Threonin
TMB-8	3,4,5-Trimethoxybenzoic Acid 8-(Diethylamino)octyl Ester
TNP	Trinitrophenyl
TNF	Tumornekrosefaktor
TNCB	2, 4, 6-Trinitrochlorbenzol
TPBS	“Tween-Tris buffered saline”
tTG	Gewebstransglutaminase

Diplom-Biologin  
Schulstraße 33  
65474 Bischofsheim  
Tel.: 06144 - 33 44 77  
e-mail: evalk@gmx.de

## Lebenslauf

### PERSÖNLICHES

Name                      Elke Valk  
Geboren                  am 1.3.1972 in Bonn-Bad Godesberg  
Staatsangehörigkeit    deutsch

### HOCHSCHULAUFBILDUNG

Seit 1/2000              Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universitäts-Hautklinik der  
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz  
Anfertigung der Dissertation an der Johann Wolfgang Goethe-  
Universität, Frankfurt am Main, Fachbereich Pharmazeutische Chemie  
"Frühe Mechanismen der Signaltransduktion in dendritischen Zellen  
während der Aktivierung durch Kontaktallergene"  
28.11.1997              Diplom Biologie, Diplomarbeit in den Fachbereichen Mikrobiologie  
(Prof. Klemme) und Lebensmitteltechnologie (Prof. Kunz)  
1991-1997              Studium der Biologie an der Rheinische Friedrich-Wilhelms  
Universität, Bonn

### SCHULISCHE AUSBILDUNG

1982-1991              Amos Comenius Gymnasium Bonn  
1978-1982              Grundschule Heiderhof Bonn

### ANDERE TÄTIGKEITEN

7-12/1999              Mitarbeit im Forschungsschwerpunkt Meeresbiotechnologie an der  
Fachhochschule Ostfriesland Emden  
2/1998-6/1999        Mitarbeiterin in der Reproduktionsabteilung der VG Bild-Kunst, Bonn

Bischofsheim, den 4.7.2003