

Mechanismus der funktionell relevanten Kopplung von  
Kontaktallergenen in dendritischen Zellen

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14  
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Sabine Zahn  
geb. in Lindau am Bodensee

Frankfurt, 2002

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

Dekan:	Prof. Dr. W.Müller
Erster Gutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Dieter Steinhilber
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. med. Jürgen Knop
Datum der Disputation:	22.08.2003

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden in der Zeit vom März 2000 bis September 2002 an der Universitäts-Hautklinik der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz erarbeitet und im Rahmen des Sonderforschungsbereiches „Analyse und Modulation allergischer und autoimmunologischer Krankheiten“, SFB 548 (PD Dr. D. Becker), gefördert.

## **Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht bzw. zur Veröffentlichung eingereicht:**

S. Bruchhausen and S. Zahn, E. Valk, J. Knop and D. Becker, 2002. Thiol antioxidants block the activation of antigen-presenting cells by contact sensitizers. *J. of Invest. Derm.*, eingereicht.

D. Becker, E. Valk, S. Zahn, P. Brand and J. Knop, 2002. Coupling of contact sensitizers to thiol groups is a key event for the activation of monocytes and monocyte-derived dendritic cells. *J. of Invest. Derm.*, in press.

P. Brand, S. Plochmann, E. Valk, S. Zahn, J. Knop and D. Becker, 2002. Activation and translocation of p38 mitogen-activated protein kinase after stimulation of monocytes with contact sensitizers, *J. of Invest Derm.*, **119**, 99-106.

S. Zahn, E. Valk, J. Knop and D. Becker, 2002. Binding and activation of tissue transglutaminase by TNCB in dendritic cells, *J. of Biolog. Chem.*, eingereicht.

E. Valk, S. Zahn, J. Knop and D. Becker, 2002. JAK/STAT pathways are not involved in the direct activation of antigen presenting cells by contact sensitizers. *Archives of Derm. Res.*, **294**(4):163-7.

## **Kongreßbeiträge:**

- S. Zahn, E. Valk, J. Knop, D. Becker. Analysis of TNP-groups in proteins in DC after stimulation with TNCB. 28. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, Berlin, 15. Februar 2002. Poster und Abstrakt, *Archives of Derm. Res.*, **294**(1/2), 27.
- S. Zahn, E. Valk, J. Knop, D. Becker: Analyse von TNP-Gruppen in Proteinen dendritischer Zellen nach Stimulation mit TNCB. 22. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie, Bochum, 13. März 2002. Poster und Abstrakt, *Pneumologie*, **56**, S25.

## **Danksagung:**

Herrn Prof. Dr. Dieter Steinhilber sowie Herrn Prof. Dr. Jürgen Knop möchte ich für ihr Interesse und die Bereitschaft seitens des Fachbereichs Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften und Medizin danken, diese Dissertation zu betreuen und die Gutachten zu erstellen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Becker für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die wissenschaftliche Betreuung, sowie für die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Allen Kollegen der Arbeitsgruppen des SFB 548 und SFB 432 danke ich für die stete Anleitung und die sehr schöne Zusammenarbeit.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Familie und folgenden Personen für die Mithilfe in den verschiedenen Phasen meiner Promotion:

Elke Valk für die sehr gute Zusammenarbeit im Labor,  
meinem Freund David Novotny und  
meinem Bruder Roland Zahn für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	8
1.1	<i>Allergien</i> .....	8
1.1.1	Sensibilisierungsphase .....	11
1.1.2	Auslösephase .....	12
1.2	<i>Kontaktallergene</i> .....	12
1.3	<i>Signaltransduktionsmechanismen</i> .....	14
1.3.1	Phosphorylierung .....	16
1.3.2	MAP Kinasen.....	18
1.3.3	Transglutaminasen.....	20
1.4	<i>Zielsetzung</i> .....	23
2	MATERIAL UND METHODEN.....	24
2.1	<i>Versuchsmaterial</i> .....	24
2.1.1	Geräte.....	24
2.1.2	Reaktionsgefäße und Materialien .....	24
2.2	<i>Verwendete Chemikalien</i> .....	24
2.3	<i>Medien</i> .....	26
2.4	<i>Puffer und Lösungen</i> .....	27
2.5	<i>Antikörper</i> .....	30
2.5.1	Antikörper für Proteinbiochemie.....	30
2.5.2	Antikörper für Durchflußzytometrie und Immunhistochemie.....	30
2.5.3	Isotypische Antikörper.....	31
2.6	<i>Aktivatoren</i> .....	31
2.6.1	Kontaktallergene .....	31
2.6.2	Sonstige Zellaktivatoren.....	31
2.7	<i>Inhibitoren</i> .....	31

3	METHODEN .....	32
3.1	<i>Isolation humaner Zellen aus peripherem Blut</i> .....	32
3.1.1	Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC).....	32
3.1.2	Anreicherung von Monozyten aus PBMC durch Kurzzeitadhärenz ..	33
3.1.3	Anreicherung von dendritischen Zellen aus PBMC .....	33
3.2	<i>Zellstimulation</i> .....	33
3.2.1	Haptenisierung .....	33
3.2.2	Inhibition der Zellaktivierung .....	34
3.3	<i>Fluoreszenzmikroskopie</i> .....	34
3.4	<i>Durchflußzytometrie</i> .....	35
3.4.1	Durchflußzytometrische Phänotypisierung der Zellen.....	36
3.4.2	Durchflußzytometrische Bestimmung der Zellreaktivität.....	37
3.4.3	Durchflußzytometrische Bestimmung der Zellviabilität.....	37
3.5	<i>Proteinbiochemie</i> .....	38
3.5.1	Zellaufschluß zur Proteingewinnung .....	38
3.5.2	Proteingehaltsbestimmung.....	38
3.5.3	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) .....	39
3.5.4	Western Blotting durch Elektrottransfer.....	40
3.5.5	Detektion.....	42
3.6	<i>Immunpräzipitation</i> .....	43
3.7	<i>Massenspektrometrische Analyse</i> .....	43
3.8	<i>tTG Aktivitäts Assay</i> .....	44
3.9	<i>Statistische Auswertung</i> .....	45
4	ERGEBNISSE.....	46
4.1	<i>Phänotyp der generierten Zellen</i> .....	46
4.1.1	Monozyten.....	46
4.1.2	Phänotyp der generierten unreifen dendritischen Zellen.....	47
4.1.3	Phänotyp der generierten reifen dendritischen Zellen.....	48

4. 2	<i>Zelluläre Lokalisation von TNCB nach Stimulation</i> .....	49
4. 2. 1	Immunzytochemische Detektion der TNCB-gelabelten Zellen.....	49
4. 2. 2	Flowzytometrische Detektion der TNCB-markierten Zellen.....	51
4. 3	<i>NAC blockiert die Bindung von TNP-Gruppen</i> .....	54
4. 4	<i>Identifizierung von TNP-gekoppelten Proteinen</i> .....	62
4. 5	<i>Immunpräzipitation der tTG</i> .....	64
4. 5. 1	Bindung von TNCB an tTG.....	64
4. 5. 2	Die tTG wird nicht phosphoryliert .....	66
4. 6	<i>ERK1/2 MAP Kinase Phosphorylierung und Inhibitor der tTG</i> .....	68
4. 7	<i>In vitro tTG Aktivitäts Assay</i> .....	72
5	DISKUSSION.....	74
5. 1	<i>Verwendete Modellzellen</i> .....	74
5. 2	<i>Intrazelluläre Lokalisation von TNCB</i> .....	75
5. 3	<i>Thiolantioxidantien inhibieren die Tyrosinphosphorylierung</i> .....	77
5. 4	<i>Identifikation von Aktin und dem Thyroidhormon Bindeprotein</i> .....	80
5. 5	<i>Identifikation der Gewebstransglutaminase</i> .....	81
5. 6	<i>ERK1/2 MAP Kinase Phosphorylierung</i> .....	82
5. 7	<i>Aktivierung der tTG</i> .....	83
5. 8	<i>Inhibition der tTG</i> .....	84
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	86
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	88
8	LITERATURVERZEICHNIS .....	91

# 1 Einleitung

## 1.1 Allergien

Allergien sind Überreaktionen des Immunsystems gegen harmlose Moleküle (Allergene), bei denen die Zellen des Immunsystems eine Schädigung von körpereigenem Gewebe verursachen. 1963 teilten COOMBS und GELL die Allergien aufgrund ihrer unterschiedlichen Mechanismen und Ausprägungen in vier Gruppen ein (Coombs, 1963). Typ I Reaktionen werden auch als Allergien vom Soforttyp bezeichnet, da sich die Symptome in einer sensibilisierten Person bereits wenige Minuten nach dem Allergenkontakt bemerkbar machen können. Die während der Sensibilisierungsphase gebildeten allergenspezifischen Antikörper der Klasse IgE binden an hochaffine IgE-Rezeptoren auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten und werden bei erneutem Allergenkontakt kreuzvernetzt (Plaut et al., 1989). Dies löst eine Entzündungsreaktion aus (Schwartz et al., 1987). Wichtige Beispiele für Typ I Allergien sind die allergische Rhinitis, Bronchialasthma und die Nahrungsmittelallergien.

Allergien vom Typ II und III beruhen ebenfalls auf der Bildung allergenspezifischer Antikörper, allerdings gehören diese den Klassen IgG und IgM an. Bei einer Typ II Allergie binden diese Antikörper Komplement-vermittelt an die Oberfläche von Zellen und induzieren die Lyse. Typ III Allergien sind charakterisiert durch die Ablagerung kleiner Allergen-Antikörper-Komplexe, die eine Entzündungsreaktion auslösen können (Male, 1993).

Die Typ IV Reaktion wird auch als Allergie vom verzögerten Typ bezeichnet, da die Symptome erst 24-48 Stunden bzw. bis zu 21 Tagen nach Kontakt mit dem Allergen auftreten. Ein Beispiel für eine Typ IV Allergie ist die Kontaktallergie, eine Überempfindlichkeitsreaktion der Haut auf niedermolekulare, chemisch reaktive Substanzen. Diese können aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften in ausreichender Konzentration in die Epidermis eindringen und hier an körpereigene Proteine koppeln (Basketter et al., 1995). Kontaktallergene können kovalente Bindungen mit freien Amino- bzw. Thiolgruppen von Aminosäuren (z.B. Lysin, Cystein, Methionin) bzw. schwächere, koordinative Bindungen eingehen (Roberts et al., 1983). Durch diese Bindung kommt es zur Modifikation der körpereigenen Proteine, so dass diese vom Immunsystem als "Fremd" erkannt

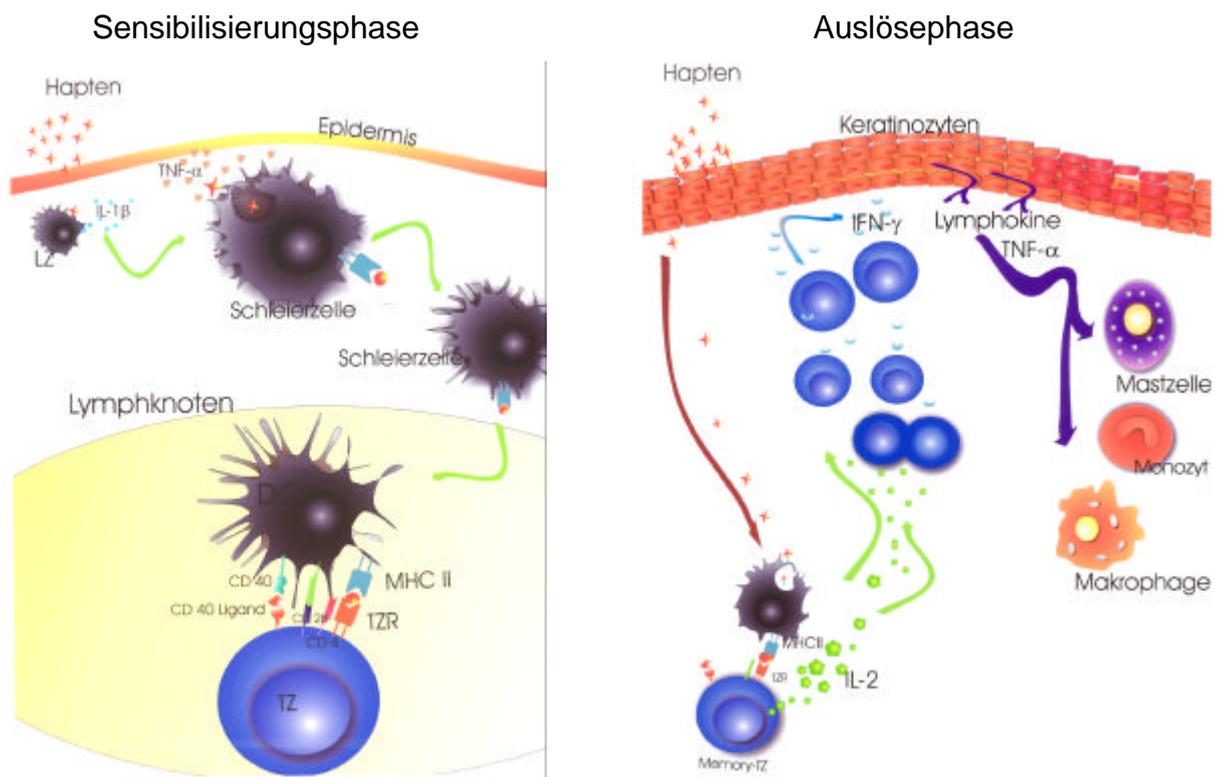
werden. Für eine solche Substanz, die erst nach Kopplung an ein Trägerprotein ("Carrier") immunogen wird, prägte LANDSTEINER in den 30er Jahren den Begriff Hapten (Landsteiner, 1936). Mit zunehmender Industrialisierung wächst die Zahl der potentiellen Kontaktallergene stetig an. Sie sind in unserer Umwelt z.B. als Bestandteile von Modeschmuck (Nickel, Kobalt) (Ikarashi et al., 1996; Savolainen, 1996), als Konservierungsmittel in Arzneistoffen (z.B. Thiomersal) (Schafer et al., 1995) und Kosmetika (z.B. Chlormethylisothiazolon) (Aguirre Martin-Falero et al., 1990; de Groot and Herxheimer, 1989). Während aber fast alle Menschen gegen experimentelle Kontaktallergene, wie z.B. Dinitrofluorbenzol (DNFB) sensibilisiert werden können (Frosch et al., 1996a), führen die anderen Haptene nur bei einem Teil der Exponierten zur Entstehung einer Kontaktallergie. Die Ursachen hierfür sind noch nicht geklärt, wahrscheinlich sind aber sowohl genetische, als auch Umweltfaktoren für die Entstehung einer Kontaktallergie verantwortlich.

Anders als bei den Allergie-Typen I-III, die auf allergenspezifischen Antikörpern beruhen, ist die Voraussetzung für die Entstehung einer Typ IV-Allergie das Vorhandensein allergenspezifischer T-Lymphozyten. Experimentell wurde die Bedeutung der T-Zellen durch die Übertragung einer Kontaktallergie mittels Transfer von T-Zellen aus einem Spender- auf ein Empfängertier gezeigt (Milon et al., 1981; Turk, 1979).

Damit naive, allergenspezifische T-Zellen mit einem Hapten in Kontakt treten können, muss das Kontaktallergen von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC) aufgenommen, prozessiert und in die T-Zellareale des Parakortex im Lymphknoten transportiert werden (Kripke et al., 1990). Diese Funktion erfüllen die Langerhanszellen, die eine zentrale Rolle in der Epidermis spielen (Teunissen, 1992).

Paul LANGERHANS beschrieb 1868 erstmals Zellen mit dendritischer Morphologie in der Epidermis. Die nach ihm benannten Langerhanszellen bilden ein Netzwerk in der Epidermis, das eindringende Pathogene, aber auch Kontaktallergene abfängt. Langerhanszellen (LC) werden heute aufgrund ihrer Morphologie und Funktion den dendritischen Zellen zugeordnet, sie entsprechen einem unreifen Stadium dieser Zellen (Romani et al., 1989a; Romani et al., 1989b). In vitro sind frisch isolierte LC zwar in der Lage, Antigene durch Phagozytose aufzunehmen und zu prozessieren, sie sind aber nur relativ schwache T-Zellaktivatoren (Pure et al., 1990; Romani et al.,

1989a; Schuler et al., 1985). Durch Kultivierung verlieren die Zellen ihre Phagozytosefähigkeit und beginnen MHC-Klasse II und kostimulatorische Moleküle auf der Zelloberfläche stärker zu exprimieren (Heufler et al., 1988; Kampgen et al., 1991; Witmer-Pack et al., 1988). Nach vollständiger Ausreifung sind sie in der Lage, eine Primäraktivierung naiver T-Zellen zu induzieren (Streilein and Grammer, 1989).



**Abb. 1 Die Stadien einer verzögerten kontaktallergischen Reaktion**

Die erste Phase, die Sensibilisierungsphase, beinhaltet die Aufnahme, die Prozessierung und Antigenpräsentation des Antigens (Ag) durch lokale antigenpräsentierende Zellen. In der zweiten Phase, der Auslösephase, sezernieren die geprimten  $T_H1$ -Zellen bei einer erneuten Exposition mit dem externen Stimulus, Mediatoren. Diese aktivieren lokale Endothelzellen und locken auf diese Weise inflammatorische Zellen, hauptsächlich Makrophagen, zur Einwanderung an. Zu dieser Zeit werden die Läsionen sichtbar. Modifiziert nach: Janeway, 2001.

### 1. 1. 1 Sensibilisierungsphase

In der Sensibilisierungsphase der Kontaktallergie binden Haptene in der Epidermis sowohl an lösliche Proteine, als auch an Oberflächenproteine von Zellen, wahrscheinlich sogar direkt an LC. Die so entstandenen Hapten-Protein-Komplexe werden von den LC internalisiert (Shelley and Juhlin, 1977), prozessiert und über MHC-Klasse II-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert. Die Interaktion mit Haptenen löst in der Haut eine Reihe von Reaktionen aus. Innerhalb von 15 Minuten nach Kontakt mit dem starken Hapten DNFB beginnen epidermale Zellen (EC) mit der Produktion und Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  (Enk and Katz, 1992). Dieses Zytokin stimuliert in Keratinozyten die Bildung von TNF- $\alpha$  (Kimber and Cumberbatch, 1992a). Beide Faktoren induzieren gemeinsam das Auswandern der LC aus der Epidermis (Kimber and Cumberbatch, 1992b). Unterstützt wird die Migration durch eine Herunterregulation von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. E-Cadherin (Jakob and Udey, 1998; Kimber and Cumberbatch, 1992b), durch die Produktion von Matrix Metalloproteasen (Kobayashi, 1997) und die Hochregulation von Integrinen (Price et al., 1997) und "homing" Rezeptoren wie dem CD44-Molekül (Weiss et al., 1997). Mit der Auswanderung aus der Epidermis in die lymphatischen Organe beginnt die Ausreifung der LC (Larsen et al., 1990). Die Auswanderung der LC aus der Epidermis ist ein Prozeß, der durch verschiedene, starke Reize oder Traumata ausgelöst werden kann, z.B. durch UV-Bestrahlung (Burnham et al., 1993) und Hautirritation (Willis et al., 1990).

Die schnelle Produktion und Sekretion von IL-1 $\beta$  ist jedoch eine charakteristische Reaktion der EC auf Kontaktallergene (Enk and Katz, 1992). Den Abschluss der Sensibilisierungsphase bildet die in den parakortikalen Regionen des drainierenden Lymphknotens stattfindende Interaktion der "ausgereiften LC", die hier als interdigitierende dendritische Zellen bezeichnet werden, mit naiven, haptenspezifischen T-Zellen (Macatonia et al., 1986; Macatonia et al., 1987). In den 80er Jahren war man der Überzeugung, dass die Kontaktallergie v.a. von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen geprägt ist, die IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  sezernieren (T<sub>H</sub>1-Zellen) (Cher and Mosmann, 1987; Fong and Mosmann, 1989). Neuere Untersuchungen im Mausmodell zeigen allerdings, dass die Depletion von CD4<sup>+</sup> Zellen die Entstehung

einer Kontaktallergie nicht verhindern kann. Eine mildere Verlaufsform der Kontaktallergie wurde jedoch durch Depletion der CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen erreicht, was die Bedeutung dieser Zellen für die Entstehung einer Kontaktallergie im murinen System belegt (Gocinski and Tigelaar, 1990; Xu et al., 1997a). Durch die Interaktion von haptensbeladenen, interdigitierenden dendritischen Zellen mit naiven, haptenspezifischen T-Zellen im Lymphknoten, kommt es zur Proliferation und Differenzierung der spezifischen T-Zellklone und zur Bildung langlebiger Memory-T-Zellen, die durch den Körper zirkulieren.

### **1. 1. 2 Auslösephase**

Bei erneutem Haptenkontakt wird in einer sensibilisierten Person meist innerhalb von 24-48 Stunden eine lokale Entzündungsreaktion ausgelöst. Diese Reaktion beruht auf der Aktivierung, der nun vorhandenen haptenspezifischen Memory-T-Zellen. Die aktivierten T-Zellen bilden eine Vielzahl von Interleukinen, wie z.B. IL-2, das die T-Zellproliferation fördert und IFN- $\gamma$ , das in Keratinozyten die Zytokinsynthese induziert und die Anlockung von Monozyten, Mastzellen und anderer, nicht antigenspezifischer Zellen zum Entzündungsherd bewirkt. Die Folge ist eine unspezifische Zerstörung des umliegenden Gewebes, die sich in der Haut als Ekzem manifestiert.

Während die morphologischen, phänotypischen und funktionellen Veränderungen von Langerhanszellen in der Sensibilisierungsphase der Kontaktallergie relativ gut charakterisiert sind, weiß man nur sehr wenig über die molekularen Mechanismen, die diesen Veränderungen zugrunde liegen.

## **1. 2 Kontaktallergene**

Die Anzahl potentieller Kontaktallergene steigt mit zunehmender Industrialisierung stetig an. Dabei sind die sensibilisierenden Allergene weit verbreitet. Häufige Allergene sind Bestandteile von Modeschmuck (Nickel, Kobalt, Palladium, Chrom (Ikarashi et al., 1996; Savolainen, 1996) oder Duftstoffe in Parfum (Bertrand et al., 1997). Auch äußerlich anzuwendende Arzneistoffe (Thiomersal als Konservierungsmittel) und Externagrundlagen (Chlormethylisothiazolon als Konservierungsmittel in Kosmetika) können aufgrund ihrer irritierenden und sensibilisierenden Eigenschaften Auslöser eines allergischen Kontaktekzems sein

(Frosch, 1995; Schulz, 1988). Bei fast allen Kontaktallergenen handelt es sich um kleine (<500 kD), lipophile, chemisch reaktive Moleküle oder Ionen, die allein zu klein sind um als Allergene zu wirken. Sie benötigen ein Trägerprotein, an das sie kovalent oder koordinativ binden, um eine Sensibilisierung zu bewirken (Murtaugh et al., 1984; Roberts et al., 1983). Solche Moleküle, die erst nach Kopplung an ein Protein immunogen wirksam werden, nennt man nach Landsteiner Hapten (Landsteiner, 1936).

Kontaktallergene dringen wegen ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften in die Epidermis ein und koppeln dort an körpereigene Proteine (Basketter et al., 1995). Diese Kopplung geschieht an freie Amino- bzw. Thiolgruppen von Aminosäuren (z.B. Lysin, Cystein, Methionin) (Roberts et al., 1983) und führt zur Modifikation der körpereigenen Proteine, die nun vom Immunsystem als "Fremd" erkannt werden. Haptene können auch an zellmembranassoziierte Moleküle binden. Dies gilt vor allem für Metallionen, die direkt mit Proteinen des MHC-Klasse II-Komplexes reagieren können, wie Nickel mit der Aminogruppe lysinhaltiger Proteine (Frosch et al., 1996a; Frosch et al., 1996b).

Das jeweilige Kontaktallergen muß auf der Haut in einer bestimmten Mindestkonzentration vorliegen, um eine Sensibilisierung zu bewirken. Auf der anderen Seite gibt es eine obere Konzentration, ab der die Sensibilisierungsfähigkeit nicht mehr gesteigert werden kann. So wurde anhand von Fällen mit 2,4-Dinitrochlorbenzol (DNCB) gezeigt, dass die Inzidenz der Sensibilisierung gesenkt wurde, je größer das betreffende Hautareal war, auf das DNFB aufgetragen wurde (White et al., 1986). DNFB ist auch als Kontaktallergen beschrieben und bindet in den ersten 15 Minuten nach der Inkubation intrazellulär in humanen Langerhanszellen (Hunger et al., 2001). DNFB und DNFB gehören wie auch 2,4,6-Trinitrochlorbenzol (TNCB) zu den aromatischen Kohlenwasserstoffen. Alle drei Haptene sind Derivate der Pikrinsäure (Abb. 2) und lösen sowohl human als auch murin eine starke Kontaktallergie aus. Diese Allergene werden häufig als Modellhaptene verwendet.

## Aromatische Kohlenwasserstoffe



Abb. 2 Kekulé-Formeln von Pikrinsäurederivaten: TNCB, DNCB, DNFB

### 1.3 Signaltransduktionsmechanismen

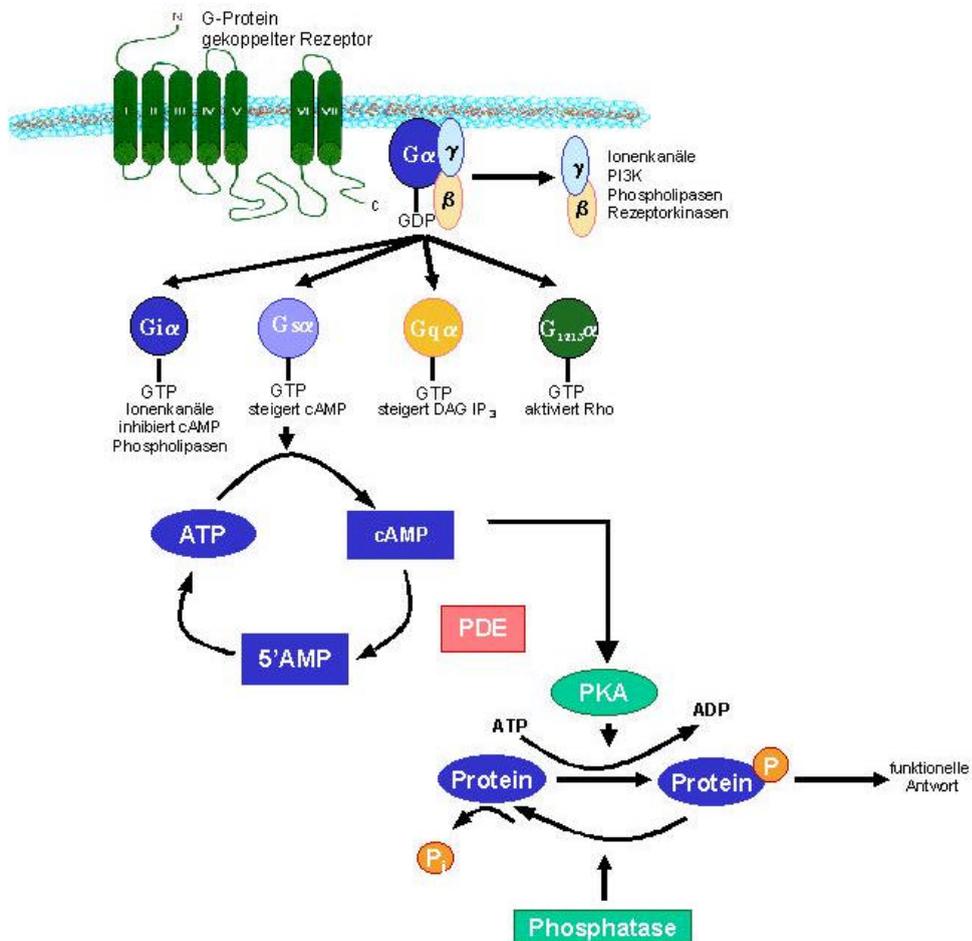
Damit eine Zelle adäquat auf äußere Reize reagieren kann, müssen externe Stimuli in Signale umgewandelt und zum Zellkern weitergeleitet werden. Einer Vielzahl von Stimuli steht jedoch nur eine begrenzte Zahl von Signaltransduktionswegen in der Zelle gegenüber. Aufgrund der Vernetzung dieser Signaltransduktionswege untereinander und durch zelltypspezifische Unterschiede, kann derselbe Stimulus in verschiedenen Zellpopulationen unterschiedliche Reaktionen bewirken. Auslöser der Signaltransduktion sind häufig lösliche Botenstoffe, wie Hormone und Neurotransmitter. Für die Zellen des Immunsystems sind vor allem Zytokine und Wachstumsfaktoren von Bedeutung. Mit Ausnahme der Steroidhormone und NO, die in Zellen eindringen können und intrazellulär Signalketten aktivieren (Giguere et al., 1988; Lander et al., 1997), wirken diese Botenstoffe über membranständige Rezeptoren.

Ein zentrales Grundprinzip aller Signaltransduktionsmechanismen ist die Verstärkung des ursprünglichen Stimulus mit Hilfe von Enzymkaskaden. Eine solche Verstärkung ist die Bildung von kleinen, zytoplasmatischen Signalmolekülen, den sogenannten

"Second Messenger" Molekülen, z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, zyklisches AMP (cAMP) und zyklisches GMP (cGMP), Inositol-3-Phosphat ( $\text{IP}_3$ ), Diacylglycerin (DAG) und Arachidonsäure, aber auch Gase, wie z.B. NO.

In den 70er Jahren beschrieb SUTHERLAND die Bildung von cAMP nach Hormonstimulation in der Leber (Sutherland, 1972) und formulierte das "Second Messenger Konzept". Durch das integrale Membranprotein Adenylatzyklase (AC) wird aus ATP cAMP gebildet. Die Adenylatzyklase selbst wird nur in Anwesenheit von GTP aktiviert (Rodbell, 1980), was zur Entdeckung der trimeren G-Proteine (GTP-bindende Proteine) führte. Trimere G-Proteine bestehen aus den Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , die an der Plasmamembran lokalisiert sind (Birnbaumer, 1992). Bindet ein Ligand an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, wird das stimulatorische  $G_s$ -Protein aktiviert und die  $\alpha_s$ -Untereinheit bindet GTP. Dies bewirkt die Abspaltung der  $\alpha_s$ -Untereinheit, die die AC aktiviert. Bei diesem Prozeß hydrolysiert die  $\alpha_s$ -Untereinheit GTP zu GDP, dissoziiert von der AC und steht wieder als Bestandteil eines  $G_s$ -Proteins zur Verfügung. Auf diese Weise können während der Ligandenbindung an den Rezeptor mehrere  $G_s$ -Proteine aktiviert werden, die ihrerseits die Stimulation vieler Moleküle AC und damit die Bildung von cAMP bewirken. So kommt es bereits auf Ebene der Bildung von "Second Messenger" Molekülen zu einer Verstärkung des ursprünglichen Signals.

Neben diesen aktivierenden  $G_s$ -Proteinen werden auch G-Proteine mit inhibitorischer Funktion beschrieben ( $G_i$ -Proteine) (Bourne et al., 1991; Bushfield et al., 1990). Solche  $G_i$ -Proteine sind mit inhibitorisch wirkenden Rezeptoren assoziiert. Ihre Aktivierung führt zur Bindung von GTP an die  $\alpha_i$ -Untereinheit, die daraufhin dissoziiert und wahrscheinlich indirekt die AC inhibiert. Auf diese Weise ist es möglich, den cAMP-Gehalt der Zelle abzusenken.



**Abb. 3 Signalweiterleitung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren**

G-Protein gekoppelte Rezeptoren vermitteln Signale durch eine Konformationsänderung im Rezeptor, die zur Aktivierung von  $\alpha$ -Untereinheiten der G-Proteine führt. Dies induziert einen Wechsel von GDP zu GTP an  $G\alpha$ -Untereinheiten und eine Dissoziation der  $\alpha$ -Untereinheit vom  $\beta\gamma$ -Heterodimer. Der  $GTP\alpha$ -Komplex vermittelt intrazelluläre Signale entweder direkt durch Ionenkanäle und Kinasefunktionen, oder indirekt über Effektormoleküle, wie die Phospholipase C und die Adenylatcyclase (AC). Modifiziert nach: Gudermann und Gutkind, 2000 (Gudermann et al., 2000; Gutkind, 2000).

### 1.3.1 Phosphorylierung

Ein weiterer zentraler Mechanismus der Signalweiterleitung ist die Übertragung von Phosphatgruppen. Diese Phosphorylierungskaskaden werden von Proteinkinasen katalysiert, die den endständigen  $\gamma$ -Phosphatrest von ATP auf Serin/Threonin (Serin/Threonin-Kinase) oder auf Tyrosin-Reste (Tyrosin-Kinase) anderer Proteine

übertragen. Reguliert werden diese Kinase-Reaktionen durch antagonistisch wirkende Phosphatasen (Kharitonov et al., 1997), die ebenfalls in Serin/Threonin-Phosphatasen und in Tyrosin-Phosphatasen unterteilt werden. Die Phosphorylierung bewirkt bei einigen Enzymen eine Aktivierung, doch der gleiche Prozeß inhibiert die Funktion anderer Enzyme.

Die Tyrosinphosphorylierung ist ein wichtiger Mechanismus der Signaltransduktion in den Zellen des Immunsystems (Calautti et al., 1995; Lin et al., 1995; Silvennoinen et al., 1996; Yan and Berton, 1996; Yousefi et al., 1994). Induziert wird sie über Oberflächenrezeptoren, die entweder intrinsische Protein Tyrosin-Kinase (PTK) Aktivität besitzen, oder an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran mit einer PTK assoziiert sind. Zu den Tyrosin-Kinase-gekoppelten Rezeptoren gehören z.B. der B-Zell- und der T-Zell-Rezeptorkomplex (Weiss and Littman, 1994). Man unterscheidet zwei wichtige Familien von PTK, 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 (Pawson, 1997; Sicheri et al., 1997; Xu et al., 1997b). N-terminal befindet sich eine Myristylierungssequenz, die das Anhängen von Fettsäuren und damit die Verankerung des Proteins in der Membran ermöglicht. Zwei weitere, zwischen den Familienmitgliedern konservierte Bereiche, sind die sogenannten SH-Domänen („Src-homology domain“). Über ihre SH2-Domäne interagieren Kinasen mit tyrosinphosphorylierten Proteinen. Die Funktion der SH3-Domäne ist nicht genau bekannt, möglicherweise erhöht sie die Affinität der Kinase zu ihrem Liganden (Pawson, 1997). Brábeck et al. zeigen, dass die SH3-Domäne vermutlich einen negativen, regulatorischen Effekt auf die Kinaseaktivität besitzt, der über direkten Kontakt zwischen der SH3-Domäne und der Kinasedomäne vermittelt wird (Brabek et al., 2002). SH-Domänen sind als Phosphotyrosin-Bindedomänen auch ein wichtiger Bestandteil vieler Signalmoleküle, die nicht zur Familie der *Src*-Kinasen gezählt werden.

Die Rezeptoren für Wachstumsfaktoren können als Beispiele für Rezeptor Tyrosin-Kinasen aufgeführt werden (Miyajima et al., 1992). Die Bindung eines Liganden bewirkt die Dimerisierung des Rezeptors, so dass sich die zytoplasmatischen Regionen mit intrinsischer PTK-Aktivität gegenseitig phosphorylieren können (Ballotti et al., 1989).

Über diese Phosphotyrosinreste werden z.B. Src-Kinasen aus dem Zytoplasma rekrutiert, die hochaffin über ihre SH2-Domänen an den Rezeptor binden (Mustelin and Burn, 1993). Dies ist der Beginn einer Phosphorylierungskaskade, die häufig über die Phospholipase C (PLC) zur Bildung der "Second Messenger" DAG und IP<sub>3</sub> (Bansal and Majerus, 1990) und auch zur Induktion Ca<sup>2+</sup>-abhängiger Prozesse führt (Berridge, 1993).

Eine weitere Klasse von Proteinen, die am Rezeptorkomplex beteiligt sein können, sind die Adaptor-Proteine, wie z.B. Shc und Grb2 (Lowenstein et al., 1992; Nagai et al., 1995). Diese kleinen Proteine bestehen u. a. aus SH2- und SH3-Domänen und besitzen selbst keine enzymatische Aktivität. Ihre Aufgabe ist es, an andere Signalmoleküle zu binden, die keine SH-Domänen besitzen, und diese so in den Rezeptorkomplex einzubinden. Zu den Proteinen, die durch Adaptoren an den Rezeptor rekrutiert werden, gehören GTPasen, die als intrazelluläre Schalter fungieren, indem sie zwischen einem aktiven (GTP) und inaktiven (GDP) Zustand wechseln. Den Ras- und Rho-Familien der GTPasen ist gemeinsam, dass sie zum Austausch von GTP und GDP auf die Funktion von Guanin Nukleotid Austauschfaktoren (z.B. Sos) angewiesen sind (Buday et al., 1994).

### 1. 3. 2 MAP Kinasen

Ein Beispiel für die Bedeutung der hier aufgeführten Signalmoleküle ist die durch Wachstumsfaktoren induzierte Aktivierung der MAP Kinase („mitogen activated protein kinase“) ERK (Izquierdo et al., 1993; Schlaepfer et al., 1998). 1991 wurde von STURGILL et al. eine Serin/Threonin Kinase beschrieben, deren besonderes Merkmal ihre Aktivierung durch duale Phosphorylierung an einem Threonin- und Tyrosinrest innerhalb eines Thr-Glu-Tyr-Motivs ist (Sturgill and Wu, 1991). Die Aktivierung dieser als MAP Kinase oder als ERK („extracellular signal regulated kinase“) bezeichneten Kinase erfolgte z.B. durch Wachstumsfaktoren über Rezeptor Tyrosin-Kinasen nach dem oben beschriebenen Mechanismus. Die MAP Kinase ERK kommt in fünf Isoformen vor (Robinson and Cobb, 1997) unter anderem (p44 ERK1 und p42 ERK2) und wurde als prolinabhängige Serin/Threonin Kinase identifiziert, die das Sequenzmotiv Ser-Thr-Pro in Proteinen erkennen und phosphorylieren kann (Gonzalez et al., 1991). Eine weitere Isoform ERK1b wurde von Yung et al. in COS7-Zellen entdeckt (Yung et al., 2000). Zu den wichtigsten Substraten von ERK gehören

zytoplasmatische Proteine, wie Phospholipase A2 (Lin et al., 1993), aber auch Transkriptionsfaktoren (z B. Elk-1 und ATF-2) (Marais et al., 1993). Die MAPK dient dabei als Verbindungsglied zwischen Zytoplasma und Zellkern, da sie nach Aktivierung aus dem Zytoplasma in den Nukleus einwandern kann (Schmid-Alliana et al., 1998).

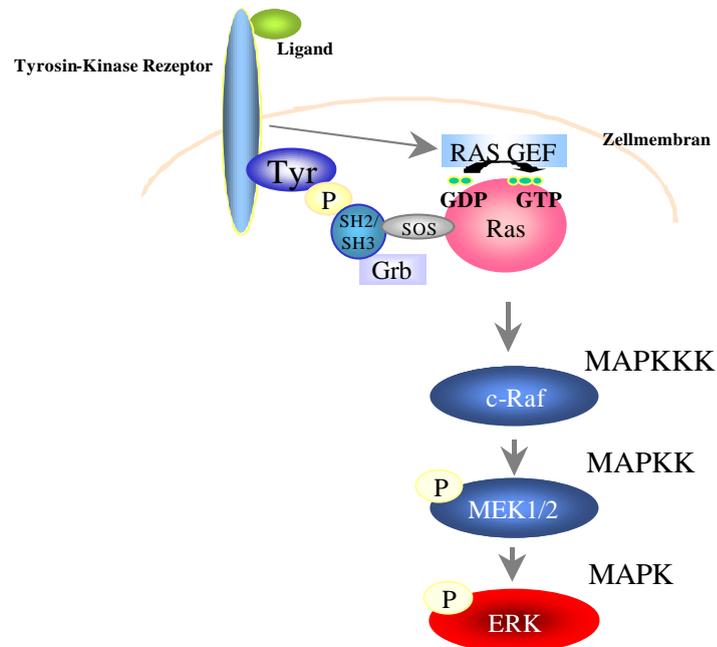


Abb. 4 Modell der Aktivierung von MAP Kinasen.

Außer der Reaktion von Zellen auf lösliche Botenstoffe können auch andere Arten von Stimuli, wie z.B. zellulärer Streß, zu einer Zellaktivierung führen. 1993 beschrieben Hibi et al. eine Serin/Threonin Kinase, die durch UV-Bestrahlung aktiviert wurde und den Transkriptionsfaktor cJun phosphorylierte (Hibi et al., 1993). Auch diese als JNK („cJun N-terminal kinase“) bezeichnete Kinase wird durch duale Phosphorylierung innerhalb eines Thr-Pro-Tyr Motivs aktiviert (Derijard et al., 1994). Infolgedessen werden ERK und JNK in der Familie der MAPK zusammengefaßt (Kyriakis et al., 1994). Die beiden Hauptformen von JNK (46/54 kD) werden von zwei distinkten Genen mit 83% Sequenzhomologie kodiert (Kallunki et al., 1994).

Die Serin/Threonin Kinase p38 kann aufgrund ihrer Aktivierung durch duale Phosphorylierung (innerhalb eines Thr-Gly-Tyr-Motivs) der Familie der MAPK zugeordnet werden (Han et al., 1994; Rouse et al., 1994). Auf Streßsituationen wie oxidativen Streß (Guyton et al., 1996; Huot et al., 1997), osmotischen Schock

(Galcheva-Gargova et al., 1994), Hitzeschock (Rouse et al., 1994), proinflammatorische Zytokine (Raingeaud et al., 1995; Ridley et al., 1997) und Endotoxine (Raingeaud et al., 1996; Scherle et al., 1998) reagieren Zellen mit dem Einschalten des p38-abhängigen Signaltransduktionsweges. Die aktivierte Kinase reguliert die Genexpression auf der Ebene der Transkription durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, z.B. ATF-2 (Raingeaud et al., 1995) und Elk-1 (Raingeaud et al., 1996).

Am Beispiel der MAP Kinasen wird deutlich, wie extrazelluläre Stimuli synergistische Signalwege einschalten und so eine Verstärkung des ursprünglichen Signals bewirken. Dennoch stellen die MAP Kinasen kein redundantes System dar. Aufgrund ihrer Substratspezifität und ihrer Aktivierung durch teilweise überlappende Signaltransduktionswege, können je nach Zelltyp und Stimulus distinkte Reaktionen ausgelöst werden.

### 1.3.3 Transglutaminasen

Die Gewebstransglutaminase (tTG), eine  $\text{Ca}^{2+}$ - und thiolabhängige Acyltransferase, ist ein weiterer Vertreter der G-Proteine. Sie ist ein  $G_{\text{T}}$ -Enzym mit dualer Funktion und besitzt sowohl eine enzymatische Transamidierungsaktivität, als auch die Möglichkeit GTP zu binden, vergleichbar mit anderen klassischen G-Proteinen (Folk, 1980).

Bisher wurden sieben verschiedene Transglutaminase Isoformen in Säugern charakterisiert: TG1 (oder TG K), TG2 (oder tTG), TG3 (oder TG E), TG X, coagulations Faktor XIII, Band 4.2. und Prostata TG. Vier Transglutaminasen (TG,1,2,3 und X) werden während der terminalen Differenzierung und der Apoptose von humanen epidermalen Keratinozyten exprimiert und synthetisiert (De Laurenzi and Melino, 2001).

Die Transamidierungsaktivität der tTG katalysiert die kovalente Bindung von primären Aminogruppen an Glutaminreste anderer Proteine. Wahrscheinlich moduliert diese Bildung von kovalenten Bindungen eine Reihe von Prozessen, unter anderem die Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrix, Endozytose, Differenzierung und Apoptose (Aeschlimann et al., 1995; Aeschlimann et al., 1993; Davies et al., 1980; Oliverio et al., 1997; Piacentini et al., 1991). Eine abweichende enzymatische Aktivität der tTG führt zu neurodegenerativen Störungen. Dies weist

darauf hin, dass eine ausbalancierte Regulation der tTG Aktivität notwendig für die Aufrechterhaltung normaler zellulärer Funktionen ist (Lesort et al., 2000).

Bei vielen Zelltypen wird die tTG auf einem niedrigen Niveau exprimiert und steigt nur durch eine lange Exposition eines externen Stimulus an (Antonyak et al., 2001; Tucholski et al., 2001). Ein solch beständiger Induktor ist die Retinsäure (RA) (Sporn and Roberts, 1983) (Chiocca et al., 1988), die ihren zellulären Effekt auf die Bindung von Rezeptoren der Retinsäurefamilie (RARs) begründet. Retinsäure-gebundene RARs wirken als Transkriptionsaktivatoren, die an RA-Motive in verschiedenen Genen binden. Deletionsanalysen des tTG Promoters identifizierten zwei RA-Antwortmotive, die notwendig für die RA induzierte tTG-Transkription sind (Pfahl et al., 1994). RA agiert als direkter Regulator der tTG Genexpression - ein Effekt, der häufig durch cAMP potenziert wird (Chiocca et al., 1988; Murtaugh et al., 1984). Andere Regulatoren wie TGF- $\beta$  und IL-6 induzieren die Expression der tTG (Lu et al., 1995), doch die Identität dieser Faktoren und ihre Notwendigkeit für die RA-vermittelte tTG-Expression ist nicht geklärt.

Die enzymatische Aktivität der tTG kann durch die Bindung von Cofaktoren, wie z.B. GTP und  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert werden. Studien haben gezeigt, dass die tTG in ihrer katalytischen Transamidase-Aktivität im GTP-gebundenen Zustand inhibiert war, wohingegen die GTP-Hydrolyse und die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  jedoch die Transamidierung verstärken (Achyuthan and Greenberg, 1987; Singh et al., 1995).

Andere Arbeitsgruppen berichten, dass GTP und GDP die Transamidase-Aktivität inhibieren (Lai et al., 1996), was darauf hindeutet, dass die GTP-Bindung für die Transamidierung nicht der spezifische Regulator sein kann, eventuell jedoch als Vermittler der Signaltransduktion dient. Ein Beispiel dafür ist die Stimulation der Phospholipase C Aktivität, die über den  $\alpha_1$ -adrenergen Rezeptor vermittelt wird. Sie wird beeinflusst durch ein 80kD GTP-bindendes Protein, das als tTG identifiziert wurde (Nakaoka et al., 1994). Adrenerge Rezeptoren sind Mitglieder einer Rezeptorsuperfamilie, die über die Kopplung von G-Proteinen wirken (Franke et al., 1992; Wong and Ross, 1994).

Durch die RA wird sowohl ERK als auch die PI3K aktiviert. Doch nur die PI3K-Aktivität ist für eine RA induzierte tTG-Expression notwendig. Die Inhibition der PI3K oder der tTG Aktivität bewirkt, dass die RA statt einer Differenzierung – die Apoptose auslöst. Der Überlebenseffekt der PI3K beruht vermutlich auf der Tatsache, dass sie

die tTG-Expression hochreguliert. Die GTP-Bindung an die tTG ist von der PI3K abhängig (Antonyak et al., 2002). Der Inkorporationsprozess von Polyaminen durch die enzymatische Aktivität der tTG wird dosisabhängig mit kompetitiven Inhibitoren, wie z.B. Cystamin und Monodansylcadaverin (MDC) (N-(5-Aminopentyl)-5-dimethylaminonaphthalene1-sulfonamide), vermindert (Chandrashekar and Mehta, 2000). MDC wirkt als Inhibitor effektiv auf das Proteincrosslinking der tTG ein. MDC stellt einen potentiellen Inhibitor bei der Endocytose dar und stimuliert die Synthese von Phosphatidylinositolen. MDC bindet an die aktive Seite der tTG, dem Cysteinrest (Cys<sup>277</sup>) (Lee et al., 1993; Mian et al., 1995) und verhindert so die Enzymaktivität.

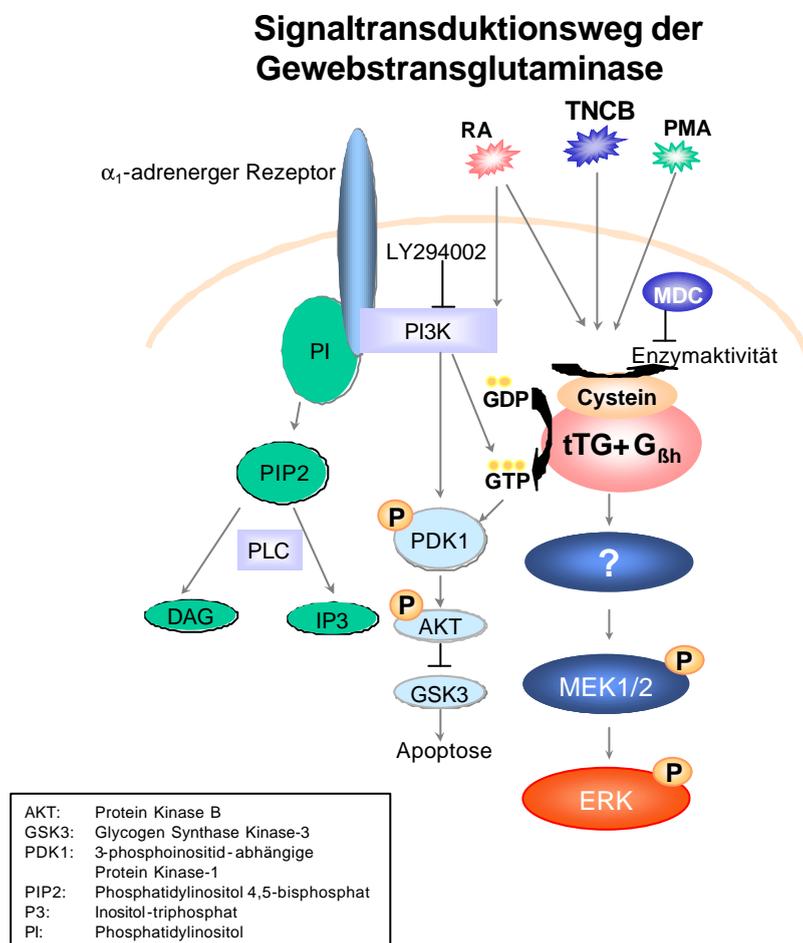


Abb. 5 Signaltransduktionsweg der Gewebstransglutaminase. Modifiziert nach Antonyak et al., 2002 (Antonyak et al., 2002; Vanhaesebroeck and Alessi, 2000).

#### 1.4 Zielsetzung

Langerhanszellen spielen, als wichtigste antigenpräsentierende Zellen der Epidermis, eine zentrale Rolle in der Sensibilisierungsphase der Kontaktallergie.

Ziel der Arbeit war es, die Bindungsstellen des Modellhaptens TNCB zu identifizieren und die nachgeschalteten Signaltransduktionswege biochemisch zu untersuchen.

Zunächst sollte die Frage nach einer intra- oder extrazellulären Bindung des TNCB mittels Immunhistochemie ermittelt werden. Durch biochemische und massenspektrometrische Analysen sollten gebundene und zugleich phosphorylierte Proteine identifiziert und ihre zentrale Rolle innerhalb der Signalkaskaden nach Stimulation mit verschiedenen Kontaktallergenen analysiert werden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden involvierte Proteine identifiziert und um zu klären, welche Rolle sie in diesem Modell haben könnten, wurden sie funktionell analysiert. Dabei bot ein Protein einen vielversprechenden Ansatz – die Gewebstransglutaminase (tTG).

Die Bedeutung der identifizierten tTG und ihre Interaktion mit TNCB sollte mittels Immunpräzipitation untersucht werden. Außerdem sollte in einer vergleichenden Studie die spezifische Inhibition der tTG über nachgeschaltete Signalwege im Western Blot gemessen werden. Untersuchungen zur Expression und Aktivität der tTG nach Inhibition und Kontaktallergenbehandlung, sowie zur Aktivierung weiterer Kinasen sollten Aufschluss über die Bedeutung der tTG auf Kontaktallergen-induzierte Signaltransduktionswege geben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchsmaterial

#### 2.1.1 Geräte

Elektrophorese-Kammer:	Fa. Phase
Eppendorfcentrifuge:	Biofuge fresco, Fa. Heraeus
FACScalibur:	Fa. Becton Dickinson
Fluoreszenzmikroskop:	Diaplan, Fa. Leica
Laborzentrifuge:	Megafuge 10, Fa. Heraeus
Megafuge 1.0R:	Fa. Heraeus
Semi Dry Blotapparatur:	Trans-Blot SD, Fa. Bio-Rad

#### 2.1.2 Reaktionsgefäße und Materialien

- 6-Wellplatten, Fa. Greiner
- 24-Wellplatten, Fa. Greiner
- 96-Wellplatten, Fa. Greiner
- Eppendorfreaktionsgefäße, 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

### 2.2 Verwendete Chemikalien

*Amersham:*

ECL Plus Western Blot Detektionssystem, # RPN2132

*Boehringer Mannheim:*

EDTA Natriumsalz, # 808 261

Phenylmethylsulfonylfluorid, # 837 091

Streptavidin Quantum Red Konjugat, # S-2899

*Merck:*

2-Mercaptoethanol, # 15433  
di-Natriumhydrogenphosphat, # 106586.500  
Dodecylsulfat Natriumsalz (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  
Natriumdihydrogenphosphat, # 106346.1000  
Natriumhydroxyd-Plätzchen, # 106498  
Salzsäure, # 1.00316.1000  
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, # 101549  
Tris(hydroxymethyl)-amino-methanhydrochlorid, # 101547.100

*Roth:*

Ammoniumperoxodisulfat, # 9592  
Ammoniumsulfat, # 9212.1  
Saponin, # 9622.1  
Dimethylsulfoxid, # 4720.1  
TEMED, # 2367  
NaCl, # 3957.2  
Acrylamid/ Bisacrylamid-Stammlösung; Rotiphorese Gel 30, # 3029.1  
Glycin, # 3908.2  
Glycerin, # 3783.1

*Seromed-Biochrom:*

Ficoll Separating Solution, Dichte 1,077, # L6115  
HEPES, # L1603

*Sigma:*

Rinderserumalbumin (BSA), # A6793

Fötale Kälberserum (FCS), # 9605.23

Natrium-Orthovanadat, # S-6508

Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), # P8139

Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20), # P1379

Prestained SDS Molecular Weight Marker, # MWM-105A

Propidium Iodid, # P4170

Triton X-100, # X-100

*Upjohn:*

Prostaglandin E<sub>2</sub>

*Sandoz:*

Lekomax<sup>®</sup>300/GM-CSF

*Strathmann:*

TNF- $\alpha$ , # 9511510

IL-1 $\beta$ , # 9511180

IL-4, # 9511230

### **2.3 Medien**

*RPMI 1640*

Fertigpulver wurde mit 10l Aqua bidest angesetzt. Der pH-Wert des Mediums wurde überprüft und das Medium anschließend mit einem Sterilfilter (Vacu-Top, 500ml, 0,2 $\mu$ m, membraPure, Bodenheim, Deutschland) sterilfiltriert und in sterilen Flaschen bei 4°C gelagert. Für die Differenzierung und die anschließende Ausreifung der dendritischen Zellen wurde dem Medium 5% autologes Serum, GM-CSF, IL-4 bzw. zusätzlich IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und Prostaglandin E<sub>2</sub> zugegeben.

*X-VIVO15*

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

## 2.4 Puffer und Lösungen

### *PBS-Heparin*

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

### *PBS-EDTA*

5mM EDTA in PBS

### *Trypanblau:*

0,1% (w/v) Trypanblau

1x PBS

### *Lysepuffer:*

Hepes	50mM, pH 7,2
NaCl	150mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5mM
EDTA	1mM
Glycerol	10% (v/v)
Triton X-100	1% (v/v) in Aqua dest.

### *Proteaseinhibitoren:*

- Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 2mM in Ethanol absolut
- Trasylol® 500 000 KIE: Aprotinin (Fa. Bayer) 10µg/ml

### *Phosphataseinhibitor:*

- Aktiviertes Natrium-Orthovanadat 2mM  
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-Gel 10% :*

*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*

1M 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: 10 x TPBS*

PBS

0,1% Tween-20

in Aqua dest.

*Blocking Puffer und Puffer für Primärantikörper*

Roti-Block 10% (v/v)  
in Aqua dest., Fa. Roth

*Stripping Puffer*

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

*Puffer für Durchflußzytometrie und Fluoreszenzmikroskopie:*

*Saponin für die Permeabilisierung*

Saponin 0,25% in PBS/1% FCS

*Waschpuffer*

1 x PBS  
2% FCS

*PFA-Fixierungslösung*

4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS

*Eindecklösung für Zytopräparate*

DAKO Fluorescentmounting Medium 15mM NaN<sub>3</sub>

*Coomassie Lösung zum Färben der SDS-Page Gele*

ad Aqua dest.  
0,1% Coomassie  
10% Essigsäure  
50% EtOH

*Entfärber für Coomassie Gele*

ad Aqua dest.  
Essigsäure 7,5%  
EtOH 25%

## 2.5 Antikörper

### 2.5.1 Antikörper für Proteinbiochemie

Primärantikörper:

Spezifität	Klon	Ak-Klasse	Verdünnung	Bezugsquelle
Phosphotyrosin	4G10	Maus IgG2b	1:1000	Upstate, # 05-321
Phospho-MEK1/2	Polyklonal	Kaninchen IgG	1:1000	NEB, # 9121
Lyn	Antiserum	Kaninchen IgG	1:50	Santa Cruz, # sc-50
Phospho-p38	Antiserum	Kaninchen IgG	1:1000	NEB, # 9211
Trinitrophenyl	Polyklonal	Hamster IgG	1:2000	Pharm./BD, # 11121D
Phospho-p42/44 ERK1/2	Monoklonal	Maus IgG	1:1000	NEB, # 9105
Tissue Transglutaminase	Polyklonal	Ziege IgG	1:2000	Upstate, # 06-471

Tabelle 1

Sekundärantikörper:

Spezifität	Konjugat	Verdünnung	Bezugsquelle
Ziege anti-Maus IgG (H+L)	HRP	1:5000	Dianova, # 115-035-100
Ziege anti-Kaninchen IgG	HRP	1:1000	Santa Cruz, # sc-2004
Kaninchen anti-Ziege IgG	HRP	1:4000	Santa Cruz, # sc-2768
Ziege anti-Hamster IgG	HRP	1:2000	Santa Cruz, # sc-2443

Tabelle 2

### 2.5.2 Antikörper für Durchflußzytometrie und Immunhistochemie

Primärantikörper:

Spezifität	Klon	Ak-Klasse	Verdünnung	Bezugsquelle
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
HLA-DR	YE2/36HLK	Ratte IgG2a	1:10	Serotec, # MCA71S
Phosphotyrosin-FITC	PY20	Maus IgG2b	1:10	Leinco, # P113

Tabelle 3

Sekundärantikörper:

Spezifität	Konjugat	Verdünnung	Bezugsquelle
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
Ziege anti-Hamster IgG (H+L)	FITC	1:50	Santa cruz, # 2446
Esel anti-Maus	PE	1:100	Dianova, # 715-116-151
Esel anti-Maus IgG (H+L)	Rhodamin Red	1:100	Dianova, # 715-295-150

Tabelle 4 Sekundärantikörper für FACS und Immunhistochemie.**2.5.3 Isotypische Antikörper**

Antikörper	Bezugsquelle
Isotyp IgG2b; Maus	Southern
Isotyp IgG2a; Maus	Pharmingen
Isotyp IgG1; Maus	Pharmingen
IgG; Kaninchen	Jackson

Tabelle 5 Isotypische Antikörper.**2.6 Aktivatoren****2.6.1 Kontaktallergene**

Chlormethylisothiazolon / Methylisothiazolon (MCI/MI): 0,01%, Fa. Hermal

Trinitrochlorbenzol (TNCB): 10µM, Polyscience, Warrington, PA

**2.6.2 Sonstige Zellaktivatoren**

N-Hydroxymaleimide (NHM): 2,2mM in Medium

N-Ethylmaleimide (NEM): 0,08mM in Medium

Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA): 1mg/ml in DMSO

Retinsäure (RA): 0,01mM in DMSO

**2.7 Inhibitoren**

N-Acetylcystein: Stammlösung 2mM in DMSO

Monodansylcadaverin: Stammlösung 2mM in DMSO

### **3 Methoden**

#### **3.1 Isolation humaner Zellen aus peripherem Blut**

##### **3.1.1 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 10ml „Buffy Coat“ Blut vermischt. Danach wurde das Heparin-Blut mit 10ml Ficoll-Hypaque 1.077 Lösung unterschichtet. Nach Dichtezentrifugation (20min, 900xg, RT, ohne Bremse) wurde das Plasma abgenommen und für die Kultivierung der Monozyten und DC aufbewahrt (siehe 3.1.2, 3.1.3). Dazu wurde das Plasma hitzeinaktiviert (45min, 56°C) und durch hochtourige Zentrifugation (1630xg, 10min, RT) von ausgefallenen Proteinen befreit.

Die Interphase wurde in neue Zentrifugenröhrchen abgenommen und auf 50ml mit PBS/EDTA 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, 408xg, 4°C) und die so isolierten PBMC in Medium mit 3% FCS resuspendiert und gezählt.

### 3. 1. 2 Anreicherung von Monozyten aus PBMC durch Kurzzeitadhärenz

Mononukleäre Zellen stellen ein Gemisch verschiedener Zellpopulationen dar, mit einem Anteil von 5% bis 25% Monozyten. Um die Monozyten zu separieren, wurde ihre Adhärenzfähigkeit auf Polystyrol-Platten ausgenutzt. Zellkulturschalen wurden für 5min im Brutschrank mit FCS-haltigem Medium (RPMI/3%FCS) präinkubiert, um einen Großteil der unspezifischen Bindestellen abzublocken. Danach wurden  $1 \times 10^6$  der aufgereinigten PBMC pro  $1 \text{ cm}^2$  in die vorbereiteten Kulturschalen pipettiert und 45min im Brutschrank inkubiert. Nun ließen sich die nicht-adhärennten Zellpopulationen leicht von den Monozyten durch mehrfaches, vorsichtiges Abspülen mit vorgewärmten PBS ( $37^\circ\text{C}$ ) abtrennen.

Um ein möglichst schonendes Ablösen der Monozyten aus den Kulturschalen zu erreichen, wurden die Monozyten über Nacht in autologem Plasma kultiviert. Danach ließen sich die Zellen durch kräftiges Spülen mit einer Glaspipette ernten.

### 3. 1. 3 Anreicherung von dendritischen Zellen aus PBMC

Um die DC zu separieren, wurde ihre Adhärenzfähigkeit auf Polystyrol-Platten ausgenutzt. Es wurden  $1 \times 10^6$  der aufgereinigten PBMC in Kulturschalen ( $0,8 \text{ cm}^2$ ) pipettiert und 45min im Brutschrank inkubiert. Nun ließen sich die nicht-adhärennten Zellpopulationen leicht von den Monozyten durch mehrfaches Abspülen mit PBS abtrennen. Mit 5% autologem Serum, GM-CSF (800U/ml), IL-4 (1000U/ml) wurde den unreifen DC nach 7 Tagen Kultur ein Stimulations-Cocktail zur Ausreifung zugegeben: IL-1 $\beta$  (10ng/ml), TNF- $\alpha$  (10ng/ml) und Prostaglandin E $_2$  (1 $\mu\text{g/ml}$ ). Für zwei weitere Tage wurden die Zellen kultiviert und an Tag 9 geerntet (Jonuleit et al., 1997).

## 3. 2 Zellstimulation

### 3. 2. 1 Haptenisierung

Humane Monozyten und dendritische Zellen wurden mit sechs verschiedenen Stimulatoren in subtoxischen Konzentrationen behandelt:

- MCI/MI 10 $\mu\text{M}$
- RA 100 $\mu\text{M}$
- TNCB 10 $\mu\text{M}$

- PMA            30nM
- NHM           2,2mM
- NEM            80µM

Die Zellen wurden auf  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml Medium eingestellt und 1h im Wasserbad bei 37°C präinkubiert. Danach wurde die Haptenisierung durch Zugabe der Kontaktallergene und Aktivatoren gestartet und die Zellen für 10min bei 37°C in Gegenwart der Stimulatoren weiter inkubiert. Die Haptenisierung wurde auf Eis abgestoppt.

### 3.2.2 Inhibition der Zellaktivierung

Zur Inhibition der Zellaktivierung wurden die Zellen vor der Haptenisierung mit den entsprechenden Inhibitoren vorinkubiert:

Reaktion	Inhibitor	Präinkubationszeit
Transamidase Funktion von tTG	MDC (1mM)	8min
Inhibition von Thiolen	NAC (1mM)	10min
Inhibition von Thiolen	Cystein (1mM)	10min

Tabelle 6 Inhibitoren.

### 3.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die intra- und extrazelluläre Lokalisation von TNCB wurde auf Einzelzellebene mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Die DC wurden auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml Medium eingestellt und für 10min bei 37°C stimuliert. Für die Präparation wurden die Diagnostika-Objektträger mit 10 Kammern in 1% Alcianblau aufgekocht und 15min bei RT inkubiert, anschließend mit aqua dest. gespült und getrocknet. 50µl der Zellsuspension wurde in die Kammern pipettiert, die Zellen für 1h bei RT auf dem Objektträger adheriert und mit 4% Paraformaldehyd 20min bei RT fixiert, um die Morphologie der DC zu erhalten. Danach wurden die Zellen, wie unter 3.4.2. beschrieben, entweder permeabilisiert für intrazelluläre Färbungen oder mit PBS/2%FCS für extrazelluläre Färbungen behandelt und mit Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert. Als Fluorochrome fanden DTAF (grüne Fluoreszenz) und Rhodamin (rote Fluoreszenz) Verwendung, die sich durch ihre Farbstabilität und geringes Überstrahlen in das jeweils andere

Spektrum auszeichnen. Nach der Färbung wurden die Präparate mit einem glycerolhaltigen Medium eingedeckt. Anschließend konnten die Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop optisch ausgewertet und zur Dokumentation fotografiert werden.

### **3.4 Durchflußzytometrie**

Die Durchflußzytometrie ermöglicht die Identifizierung und Untersuchung verschiedener Zellpopulationen aus gemischten Suspensionen. Die Unterscheidung der Zellpopulationen konnte zum einen aufgrund ihrer Oberflächenmarker mittels Immunfluoreszenz erfolgen, zum anderen aufgrund der Größe und Granularität der Zellen.

Dabei werden die Zellen in Suspension mit fluorochromkonjugierten Antikörpern markiert, die spezifisch für ein bestimmtes Oberflächenmolekül sind, und im FACS („fluorescence activated cell sorter“) ausgewertet. Die Zellen wurden in einer Trägerflüssigkeit durch eine sehr feine Kapillare gesogen und an zwei Lasern vorbeigeleitet (Argonlaser, HeNe-Laser) und ermöglichen so eine 4-5 Farben-Analyse, sowie das Sortieren von Partikeln mit gewünschten Eigenschaften. Über einen Diodenlaser lassen sich Farbstoffe verwenden, deren Anregung nicht bei den üblichen 488 nm (blau), sondern bei 635 nm (rot) liegt. Die Detektion der so angeregten roten bis ultraroten Fluoreszenzen erfolgt räumlich und zeitlich getrennt von den mit dem ersten Laser angeregten Farbstoffen. 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. Häufig verwendete Fluorochrome sind die Fluorescein-Derivate, Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und Dichlorotriazinylamino-Fluorescein (DTAF) und weiterhin das R-Phycoerythrin (PE). FITC und DTAF werden zur Emission von Licht der Wellenlänge 530nm (grün) angeregt, das im FL-1-Kanal gemessen wird, während PE rotes Licht von 575nm ausstrahlt und im FL-2-Kanal dargestellt wird. Aufgrund dieser getrennten Filter sind Mehrfachfärbungen möglich, so dass sich Zellen sehr genau charakterisieren lassen.

Die Differenzierung der Zellpopulationen aufgrund ihrer Größe und Granularität ergibt sich aus der Streuung, die das Laserlicht beim Auftreffen auf eine Zelle erfährt. Dabei wird das Laserlicht gleichzeitig in Strahlrichtung (FSC, „forward scatter“) und in einem Winkel von 90° gemessen (SSC, „side scatter“). Die Lichtintensität in Strahlrichtung wird von der Zellgröße, die Streustrahlung von der Granularität der Zelle bestimmt. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit Hilfe der Cell Quest Pro Software.

### 3. 4. 1 Durchflußzytometrische Phänotypisierung der Zellen

Um einen schnellen Überblick über die Qualität der Aufreinigung zu erhalten, wurden die Zellen einer Doppelmarkierung zur Phänotypisierung und anschließender FACS-Analyse unterzogen. Dazu wurden in 7 FACS-Röhrchen jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen eingesetzt und nach folgendem Schema gefärbt:

	1. Primär-AK	2. Primär-AK	1. Sekundär-AK	2. Sekundär-AK
Isotypkontrolle	Isotyp Maus (MKD6) 50µl KÜ	Isotyp Ratte (4F7) 50 µl KÜ	α-Ms DTAF (8µg/ml) PBS/FCS) 30 µl	α-Rt-PE (5µg/ml) PBS/FCS) 30µl
Kompensation	Isotyp Maus	α-HLA-DR (34µg/ml) PBS/FCS) 30 µl	α-Ms DTAF (8µg/ml) PBS/FCS) 30 µl	α-Rt-PE (5µg/ml) PBS/FCS) 30µl
T-Zellen	α-CD3 50µl KÜ	α-HLA-DR (34µg/ml) PBS/FCS) 30 µl	α-Ms DTAF (8µg/ml) PBS/FCS) 30µl	α-Rt-PE (5µg/ml) PBS/FCS) 30µl
Monozyten	α-CD14 50µl KÜ	α-HLA-DR (34µg/ml) PBS/FCS) 30 µl	α-Ms DTAF (8µg/ml) PBS/FCS) 30µl	α-Rt-PE (5µg/ml) PBS/FCS) 30µl
B-Zellen	α-CD19 (1:50 in PBS/FCS) 30µl	α-HLA-DR (34µg/ml) PBS/FCS) 30µl	α-Ms DTAF (8µg/ml) PBS/FCS) 30µl	α-Rt-PE (5µg/ml) PBS/FCS) 30µl
Reife DC	α-CD83 (1:100 in PBS/FCS) 30µl	α-HLA-DR (34µg/ml) PBS/FCS) 30µl	α-Ms DTAF (8µg/ml) PBS/FCS) 30µl	α-Rt-PE (5µg/ml) PBS/FCS) 30µl
DC gesamt	α-CD86 (1:200 in PBS/FCS) 30µl	α-HLA-DR (34µg/ml) PBS/FCS) 30µl	α-Ms DTAF (8µg/ml) PBS/FCS) 30µl	α-Rt-PE (5µg/ml) PBS/FCS) 30µl

Tabelle 7 Phänotypisierung von dendritischen Zellen.

Die Zellen wurden in den angegebenen Volumina der Primärantikörper 1 und 2 resuspendiert und 20min auf Eis inkubiert. Danach wurden alle Ansätze in 500µl FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert (3min, 408xg, 4°C) und in obengenannter Menge Sekundärantikörper aufgenommen. Danach erfolgte eine Inkubation von 15min lichtgeschützt auf Eis. Überschüssige Sekundärantikörper wurden durch

erneutes Waschen mit 500µl FACS-Puffer entfernt und die Zellen schließlich zur Messung in 200µl PBS/2%FCS 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 als Verschiebung im FL-1-Kanal sichtbar wurden. Zur Auswertung wurden die Zellen im „Dot-Blot“ (FL-2 gegen FL-1) dargestellt und mittels Quadrantenstatistik der Prozentsatz der einzelnen Zellpopulationen bestimmt.

#### **3. 4. 2 Durchflußzytometrische Bestimmung der Zellreaktivität**

Die DC wurden nach Stimulation auf die Induktion von Tyrosinphosphorylierung und auf die Bindung von TNCB mittels FACS untersucht. Für jeden FACS-Ansatz wurden  $1 \times 10^5$  Zellen benötigt. Diese wurden in 500µl Saponin-Puffer permeabilisiert bei intrazellulären Färbungen und in 500µl in PBS/2%FCS gewaschen bei extrazellulären Färbungen und abzentrifugiert (3min, 408xg, 4°C). Die Inkubation mit Primärantikörpern für intrazelluläre Färbungen (angesetzt in 0,25% Saponin, 25µl je Ansatz) und für extrazelluläre Färbungen (angesetzt in PBS/2%FCS, 25µl je Ansatz) erfolgte für 20min auf Eis. Danach wurden die Zellen in Saponin-Puffer oder PBS/2%FCS gewaschen und für 15min mit den entsprechenden fluorchrommarkierten Sekundär-Reagenzien auf Eis inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 200µl PBS/2%FCS aufgenommen und die Fluoreszenzintensitäten im FACS gemessen.

#### **3. 4. 3 Durchflußzytometrische Bestimmung der Zellviabilität**

Die Viabilität von Zellen ließ sich durchflußzytometrisch mit Hilfe des roten Fluorchroms Propidiumjodid (PI) feststellen. Nekrotische oder beschädigte Zellen nahmen diesen Stoff auf, während die Membranen vitaler Zellen hierfür undurchlässig waren. Das PI interkalierte in DNA-Doppelsstränge der toten Zellen, die sich im FACS durch eine deutliche Verschiebung im roten FL-2-Kanal von vitalen Zellen abgrenzen ließen. Für jeden FACS-Ansatz wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in PBS/FCS benötigt. Die Zellen wurden pelletiert (5min, 408xg, 4°C) und in 250µl PBS/FCS resuspendiert. Zu diesem Volumen wurden 2,5µl einer PI-Stammlösung (100µg/ml) gegeben (Endkonzentration 1µg/ml) und kurz resuspendiert. Nach 45sec wurden die

Ansätze mit 750µl PBS/FCS abgestoppt, abzentrifugiert, in 200µl FACS-Puffer aufgenommen und sofort im FACS (FL-2-Kanal) gemessen.

### **3.5 Proteinbiochemie**

#### **3.5.1 Zellaufschluß zur Proteingewinnung**

Zur Proteingewinnung wurden pro Stimulationsbedingung  $1 \times 10^6$  dendritische Zellen oder  $8 \times 10^6$  Monozyten eingesetzt. Die Zellen wurden nach der Haptenisierung entweder in Medium gewaschen (Gesamtzelllysate) oder in 0,25% saponinhaltigem PBS resuspendiert und zytoplasmatische Zellbestandteile durch einmaliges Waschen entfernt (permeabilisierte Zellen). 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 der 30min Zelllyse wurden die Zelltrümmer durch hochtouriges zentrifugieren (10min, 13000U/min, 4°C) pelletiert und das klare, proteinhaltige Lysat (ca. 50µl) in ein Eppendorfgefäß überführt. Für die Proteinbestimmung wurden 5µl Lysat entnommen und der Rest bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### **3.5.2 Proteingehaltsbestimmung**

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. Die Lichtabsorption ist bei einem Proteingehalt von 20µg/ml bis 2000µg/ml direkt proportional zur Proteinmenge. Für die Proteingehaltsbestimmung wurden 100µl Standardlösung bzw. eine 1:20 Verdünnung des Lysats in FACS-Röhrchen vorgelegt. Danach wurden 2ml Reaktionsmix zugegeben und für 30min bei 37°C inkubiert. Nachdem die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurde die Absorption mit einem Photometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg,

Deutschland) bei 562nm bestimmt. Der Standard diente zur Berechnung einer linearen Regressionsgeraden mit der der Proteingehalt der Lysate bestimmt wurde.

### 3. 5. 3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Proteine lassen sich unter denaturierenden Bedingungen entsprechend ihres Molekulargewichtes in einem Gel elektrophoretisch auftrennen. Das als Gelmatrix verwendete Acrylamid polymerisierte unter Zugabe von Methylenbisacrylamid und eines Katalysators zu einem Gel aus, dessen Porengröße sich durch die Konzentration an Acrylamid und Bisacrylamid genau einstellen ließ. Kleine Proteine wanderten relativ schnell durch die Gelporen, während die Wanderung hochmolekularer Proteine behindert wurde.

Eine Fokussierung der Proteinproben im Gel erhielt man durch Verwendung eines Sammelgels. Um die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht zu ermöglichen, wurden die Tertiär- und Sekundärstrukturen der Proteine vor der Elektrophorese aufgebrochen. Dazu wurden die Zellysate mit einem SDS- und mercaptoethanolhaltigen Puffer aufgekocht. Das SDS lagerte sich an die Proteine an und verlieh ihnen eine negative Gesamtladung, die größer war als die Ladung der nativen Proteine. Durch diese negative Gesamtladung wurde die Migrationsrichtung der Proteine im elektrischen Feld zur Anode hin festgelegt.

#### 3. 5. 3. 1 Anfertigung eines 10% igen Polyacrylamid-Maxi-Gels

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:

Lösung A	3,1ml
entgastes Aqua bidest.	13,5ml
SDS 20%	120µl
Acrylamid Gel 30	8,7ml
APS 10%	100µl

Tabelle 8 Trenngel

Die Zugabe der APS-Lösung erfolgte als letztes, da APS als Starter für die Polymerisierung eingesetzt wurde. Die Gellösung wurde in den vorbereiteten Gelaufbau gegossen und mit 10ml Isopropanol überschichtet. Das organische Lösungsmittel bewirkte zum einen den luftdichten Abschluß des Gels, zum anderen die Ausbildung einer glatten Oberfläche. Die Polymerisationsreaktion des Trenngels war nach etwa 30min abgeschlossen. Danach wurde das Isopropanol abgesaugt und durch Aqua dest. ersetzt.

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

Tabelle 9 Sammelgel

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.

### **3. 5. 3. 2 Probenaufbereitung**

Die Lysate wurden auf Eis aufgetaut und die Proteinkonzentration jeder Probe auf 100µg/40µl eingestellt. Die Lysate wurden mit 1/3 Volumen SDS-Probenpuffer, 4-fach konzentriert, 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.

### **3. 5. 4 Western Blotting durch Elektrotransfer**

Als Western Blotting bezeichnet man den Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen aus einem Polyacrylamid Gel auf eine Membran. Dieses Prinzip wurde 1979 von Renart beschrieben und 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 in Methanol benetzt und anschließend wurde das Methanol mit Aqua dest. abgespült und die Membran im Anodenpuffer mit 10% Methanol für 5min äquilibriert. In dieser Zeit wurde das Gel aus seiner Halterung gelöst und das Sammelgel entfernt.

#### Blotaufbau:

1. Anode, benetzt mit Anodenpuffer
2. 4 Stücke Whatmanpapier, in Anodenpuffer
3. Membran, äquilibriert in Anodenpuffer
4. Gel
5. 4 Stücke Whatmanpapier, in Kathodenpuffer
6. Kathode, benetzt mit Kathodenpuffer
7. Bleigewicht

Whatmanpapier, Membran und Gel wurden luftblasenfrei aufgelegt. Der Elektrotransfer wurde bei 250mA durchgeführt. Die im Gel aufgetrennten, negativ geladenen Proteine wanderten mit dem Stromfluß zur Anode, wo sie auf der PVDF-Membran fixiert wurden. Dieser Vorgang war nach 55min abgeschlossen. Die Effizienz des Transfers ließ sich mit Hilfe des gefärbten Molekulargewichtsmarkers abschätzen, dessen Banden nun nicht mehr im Gel, sondern auf der Membran sichtbar waren. Die Membran wurde in TPBS-Puffer überführt und für etwa 5min äquilibriert.

### **3. 5. 5 Detektion**

#### **3. 5. 5. 1 Blocken unspezifischer Bindestellen der PVDF-Membran**

Die Detektion von Signaltransduktionselementen auf Western Blot Ebene erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörper. Zuvor wurden alle Bindestellen der Membran mit einem unspezifischen Protein geblockt. Hierzu wurde entweder Blotto verwendet (4% w/v Magermilchpulver in TPBS, pH 7,4) oder Roti-Block (Roth, Karlsruhe), mit dem die Membran für mindestens 2h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert wurde. Anschließend wurde das Blocking Reagenz durch Waschen mit TPBS-Puffer entfernt.

#### **3. 5. 5. 2 Detektion mittels „enhanced Chemiluminescence“**

Die im Gel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennten Proteine konnten nach dem Elektrottransfer auf eine Membran mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Die eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper und deren Verdünnungen sind in Tabelle I und II 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 einmaliges Waschen in TPBS für 10min entfernt. Anschließend wurde die Membran mit Sekundärantikörper, verdünnt in 4ml 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. Nach der Zugabe eines Peroxidase-Substrates (z.B. ECL-Kit, Fa. Amersham) kam es zur Substratumsetzung durch die Peroxidase. Dazu wurden die beiden Komponenten des ECL<sup>+</sup> Detektions-Kits 40:1 zu einem Gesamtvolumen von 2ml gemischt. Die PVDF-Membran wurde mit der ECL-Lösung gleichmäßig benetzt. Anschließend wurde die Membran in halbtrockenem Zustand in eine Plastikfolie eingeschweißt. An den Membranbereichen, wo es zur Antikörperbindung gekommen war, wurde das Substrat zur Lichtemission angeregt, die als Schwärzung auf einem Röntgenfilm sichtbar wurde.

### **3. 5. 5. 3 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 45min bei 50°C in Stripping Puffer inkubiert. Die Membran wurde fünfmal gewaschen und mit Blockierungsreagenzien blockiert. Anschließend konnte eine weitere Antikörperfärbung durchgeführt werden.

### **3. 6 Immunpräzipitation**

Die Methode der Immunpräzipitation eignet sich zur Isolierung spezifischer Proteine aus Gesamtzellysat. Mit spezifischen Antikörpern, die an Trägerpartikel fixiert sind, lassen sich individuelle Proteine binden. Die Antikörper können entweder kovalent an Agarose gebunden sein oder aber indirekt über die Bindung von Agarosegekoppeltem Protein A oder Protein G (abhängig von der Spezies und Subklasse des verwendeten Antikörpers) an Staphylococccen. Nichtgebundene Proteine können durch mehrmaliges Waschen entfernt werden. Anschließend lassen sich unter hohen Salz- oder Detergenzkonzentrationen die gebundenen Proteine wieder eluieren. 25µl Sepharose wurden zweimal in Lysepuffer gewaschen, dazu wurden 200µg Gesamtprotein gegeben und mit Lysepuffer auf 1ml aufgefüllt. Es wurden 1µg spezifischer Antikörper zugegeben und der Immunpräzipitationsansatz für 3h bei 4°C bei Head-over-end-Rotation inkubiert. Nicht gebundene Proteine wurden durch Waschen in Lysepuffer entfernt. Die NaCl-Konzentration des Lysepuffers wurde auf 500mM erhöht, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Die Sepharose-Pellets wurden mit 2x 20µl 1x Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) für je 15min bei RT inkubiert, um die gebundenen Proteine von den Antikörpern zu lösen. Die Immunpräzipitate wurden für 5min bei 95°C aufgekocht und anschließend in einer SDS-PAGE aufgetrennt.

### **3. 7 Massenspektrometrische Analyse**

Zur Identifikation wurde auf einer 10% SDS-PAGE 500µg Lysat geladen, mit Coomassie Lösung 30min inkubiert und anschließend die Proteinbanden aus dem

Coomassie-Gel ausgeschnitten. Die Identifikation der Proteine wurde von der Firma ESPLORA GmbH, Darmstadt durchgeführt. Die Proteine wurden reduziert, alkyliert und mit Trypsin verdaut. Das Peptid Massen Fingerprintig wurde mit einem Voyager DE PRO MALDI-TOF Instrument (Applied Biosystems) durchgeführt. Die MALDI-TOF-MS erlaubt eine schnelle und präzise Bestimmung der Molekulargewichte von Peptiden, Proteinen, Kohlenhydraten, Nucleinsäuren und synthetischen Polymeren bis zu Molekulargewichten von mehreren 100 kDa. Möglich wird dies durch ein neues Ionisierungsverfahren, das Matrix-unterstützte Laserdesorptionsverfahren, welches eine direkte Desorption intakter Molekülonen ermöglicht, ohne dass ein gasförmiger neutraler Zwischenzustand erforderlich ist. Dabei wird die Probe mit einem großen Überschuss einer Matrix (kleine, laserlichtabsorbierende organische Moleküle) verdünnt und einem intensiven Impuls kurzweilliger Laserstrahlung von wenigen Nanosekunden Dauer ausgesetzt. Die massenspektrometrische Analyse erfolgt durch Bestimmung der Ionen-Flugzeit in einem Flugzeit-Massenspektrometer. Zusätzlich lassen sich über den metastabilen Zerfall desorbierter Molekülonen, welcher in der feldfreien Driftregion eines Reflektor-Flugzeit-Massenspektrometers stattfindet, strukturelle Informationen, z.B. Peptidsequenzen, ermitteln. Datenbankrecherchen wurden mit dem Programm MS-Fit ausgeführt (<http://prospector.uscf.edu>).

### **3.8 tTG Aktivitäts Assay**

Vor der Behandlung mit Haptenen und Inhibitoren wurden die DC für 1h bei 37°C mit 2mM 5-(biotinamido)pentylamin (Pierce, Rockford, IL), einem biotinylierten Polyamin behandelt (Perry et al., 1995; Zhang et al., 1998). Es wird als Maßstab für die endogene tTG Aktivität eingesetzt. Die Gewebstransglutaminase (tTG) katalysiert den Einbau von primären Aminen in andere Proteine. Diese Funktion macht man hier zunutze.

Nach der Stimulation wurden die Zellen mit PBS/2%FCS und mit PBS/1%FCS/0,25% Saponin gewaschen und anschließend wie in Kapitel 3.5 beschrieben lysiert. Im Western Blot wurden die Zellen für 1h bei Raumtemperatur mit einem anti-biotin HRP-gekoppelten Antikörper (1:1000 in PBS/2%FCS, New England Biolabs) inkubiert. Die Inkorporation von Polyaminderivaten in Proteine zeigt sich nach einer Detektion mit dem anti-biotin HRP Antikörper im Western Blot

### **3.9 Statistische Auswertung**

Allen Experimenten lagen Zellen von jeweils anderen Blutspendern zugrunde, wodurch die Unabhängigkeit der Experimente gewährleistet war.

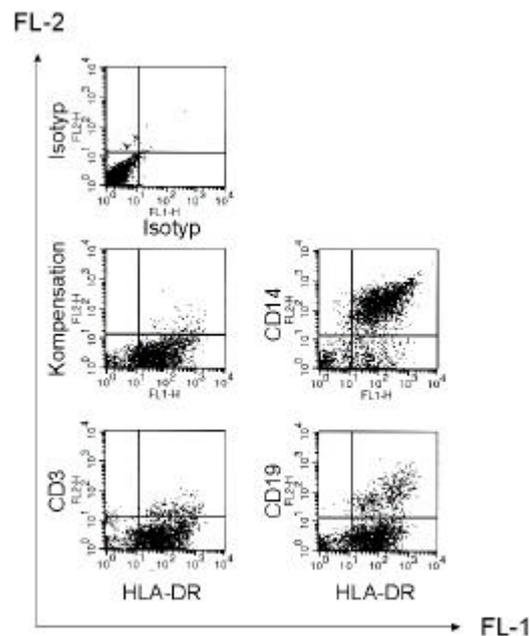
Die Auswertung der Versuche erfolgte mit Hilfe des Software Programms Microsoft Excel '97 und StatView '92-'98. Die in den Graphiken dargestellten Fehlerbalken entsprechen den Mittelwertabweichungen der Experimente.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Phänotyp der generierten Zellen

#### 4.1.1 Monozyten

Die Reinheit der durch Kurzzeitadhärenz aus PBMC isolierten Monozyten wurde nach Übernachtkultur der Zellen durchflußzytometrisch untersucht. In einer Doppelfärbung wurde sowohl die Expression des MHC-Klasse II-Moleküls HLA-DR, als auch die zelltypspezifischen Marker CD14 (Monozyten), CD3 (T-Zellen) und CD19 (B-Zellen) auf der Oberfläche der Zellen analysiert. Im Durchschnitt ließen sich durch die Methode der Kurzzeitadhärenz etwa 15% der eingesetzten PBMC gewinnen. Diese Zellpopulation umfaßte mehr als 70% CD14<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> Monozyten, zwischen 4% und 10% CD19<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> B-Zellen und einen sehr geringen Anteil von 1% CD3<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 6). Die Viabilität der aufgereinigten Monozyten lag gewöhnlich bei über 90% (ohne Abbildung).

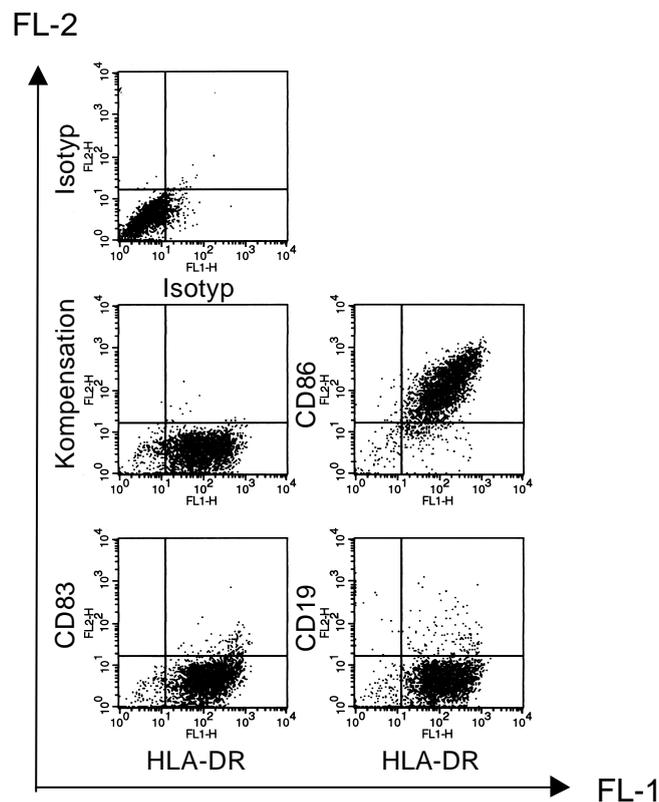


**Abb. 6 Phänotyp und Reinheit der durch Kurzzeitadhärenz isolierten Monozyten.**

Aus PBMC wurden adhärenente Zellen durch Inkubation auf Zellkulturschalen isoliert. Die adhärenente Zellen wurden über Nacht in autologem Plasma kultiviert und anschließend geerntet. Jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen wurden durchflußzytometrisch analysiert. Die Einstellung des FACS-Gerätes erfolgte mit Hilfe isotypischer Antikörper. HLA-DR-Moleküle wurden im FL-1-Kanal, zelltypspezifische Oberflächenmarker im FL-2-Kanal dargestellt. Gezeigt ist eine repräsentative Auswertung.

#### 4. 1. 2 Phänotyp der generierten unreifen dendritischen Zellen

Die isolierten Zellen wurden nach 45 Minuten Kultur in RPMI Medium mehrmals mit PBS gewaschen, mit einem Zytokincocktail in RPMI sieben Tage differenziert und durchflußzytometrisch untersucht. In einer Doppelfärbung wurde sowohl die Expression des MHC-Klasse II-Moleküls HLA-DR, als auch die zelltypspezifischen Marker CD86 (B-Zellen, dendritische Zellen), CD83 (reife dendritische Zellen), CD19 (B-Zellen) und CD14 (Monozyten) auf der Oberfläche der Zellen analysiert. Im Durchschnitt ließen sich durch diese Methode etwa 15% der eingesetzten PBMC als DC gewinnen. Die Zellpopulation umfasste <5% HLA-DR<sup>+</sup>/CD83<sup>+</sup> reife dendritische Zellen, >80% HLA-DR<sup>+</sup>/CD86<sup>+</sup> B-Zellen und unreife dendritische Zellen und zwischen 5%-10% HLA-DR<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> B-Zellen (Abb. 7).

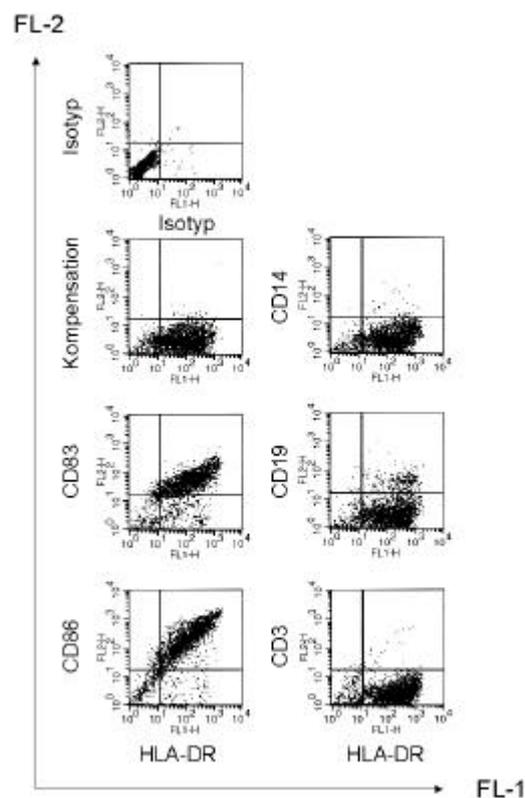


**Abb. 7 Phänotyp und Reinheit der isolierten unreifen dendritischen Zellen.**

Aus PBMC wurden adhärenente Zellen durch Inkubation auf Zellkulturschalen isoliert. Die Zellen wurden 45min in 5% autologem Plasma/RPMI adhäreniert, anschließend 3x gewaschen und über 7 Tage kultiviert. Jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen wurden durchflußzytometrisch analysiert. Die Einstellung des FACS-Gerätes erfolgte wie in Abb. 1 beschrieben. Gezeigt ist eine repräsentative Auswertung.

#### 4. 1. 3 Phänotyp der generierten reifen dendritischen Zellen

Die isolierten dendritischen Zellen wurden mit einem Cytokincocktail in RPMI sieben Tage differenziert, zwei weitere Tage ausgereift und durchflußzytometrisch untersucht. In einer Doppelfärbung wurde sowohl die Expression des MHC-Klasse II-Moleküls HLA-DR, als auch die zelltypspezifischen Marker CD86 (B-Zellen, dendritische Zellen), CD83 (reife dendritische Zellen), CD19 (B-Zellen) und CD14 (Monozyten) auf der Oberfläche der Zellen analysiert. Im Durchschnitt ließen sich durch diese Methode etwa 15% DC der eingesetzten PBMC gewinnen. Die Zellpopulation umfasste >70% HLA-DR<sup>+</sup>/CD83 reife dendritische Zellen, >80% HLA-DR<sup>+</sup>/CD86<sup>+</sup> B-Zellen und unreife dendritische Zellen und zwischen 4%-10% HLA-DR<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> B-Zellen, einen sehr geringen Anteil von 2% HLA-DR<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> Monozyten und an 1% HLA-DR<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 8).



**Abb. 8 Phänotyp und Reinheit der isolierten reifen dendritischen Zellen.**

Aus PBMC wurden adhärenente Zellen durch Inkubation auf Zellkulturschalen isoliert. Die Zellen wurden 45min in 5% autologem Plasma/RPMI adhärirt, anschließend 3x gewaschen und über 9 Tage kultiviert. Jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen wurden durchflußzytometrisch analysiert. Die Einstellung des FACS-Gerätes erfolgte wie in Abb. 1 beschrieben. Gezeigt ist eine repräsentative Auswertung.

## **4.2 Zelluläre Lokalisation von TNCB nach Stimulation**

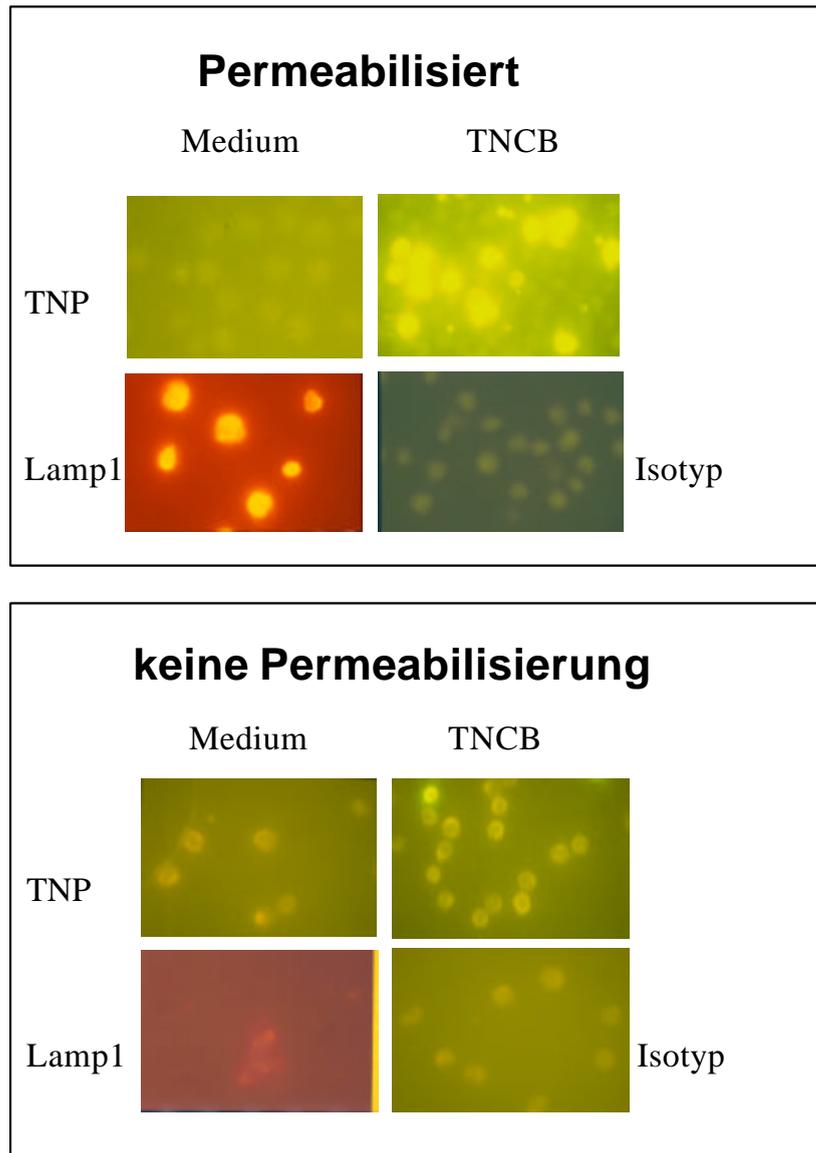
Um die Bindung des Modellhaptens TNCB an zelluläre Strukturen von dendritischen Zellen zu ermitteln, wurde die Frage geklärt, welche intra- oder extrazelluläre Präferenz Haptene besitzen.

### **4.2.1 Immunzytochemische Detektion der TNP-gelabelten Zellen**

Humane unreife und reife dendritische Zellen wurden mit dem Kontaktallergen TNCB stimuliert, um die Lokalisation der TNP-Gruppen in immunhistochemischen Färbungen zu detektieren.

Die 10 minütige Inkubation von DC mit TNCB zeigte eine relevante anti-TNP Färbung als grüne Fluoreszenz nur nach vorheriger Permeabilisierung mit dem Detergenz Saponin. Als Kontrolle für eine korrekte Permeabilisierung nach der Stimulation wurde der lysosomale Faktor Lamp1 bei jeder Färbung mitgeführt und mit Hilfe eines roten Fluoreszenzfarbstoffs im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zur Kontrolle des sekundären Antikörpers gegen TNP wurde ein Hamster-Isotyp verwendet (Abb. 9). Analoge Ergebnisse wurden auch für unreife DC erzielt (ohne Abbildung).

Wie in Abb. 9 gezeigt ist, konnte in den unstimulierten Mediumkontrollen weder mit noch ohne vorherige Permeabilisierung eine Färbung erzielt werden. Die mit TNCB behandelten Zellen zeigen nur nach der Permeabilisierung eine deutliche Fluoreszenz. Die Kontrolle, mit anti-Lamp1 zeigte einen deutlichen Nachweis dieses intrazellulären Antigens. Bei Zellen, die nach der Stimulation nicht mit dem Detergenz behandelt wurden, war weder grüne noch rote Fluoreszenz sichtbar.



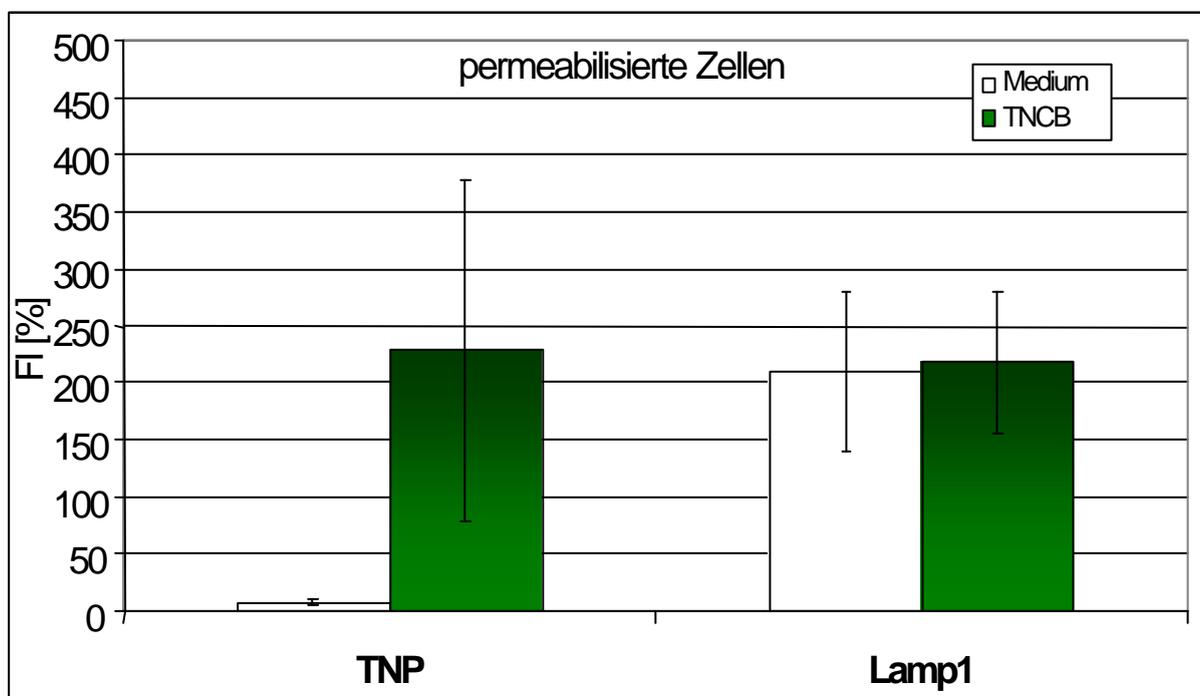
**Abb. 9 Zelluläre Lokalisation von TNCB in dendritischen Zellen.**

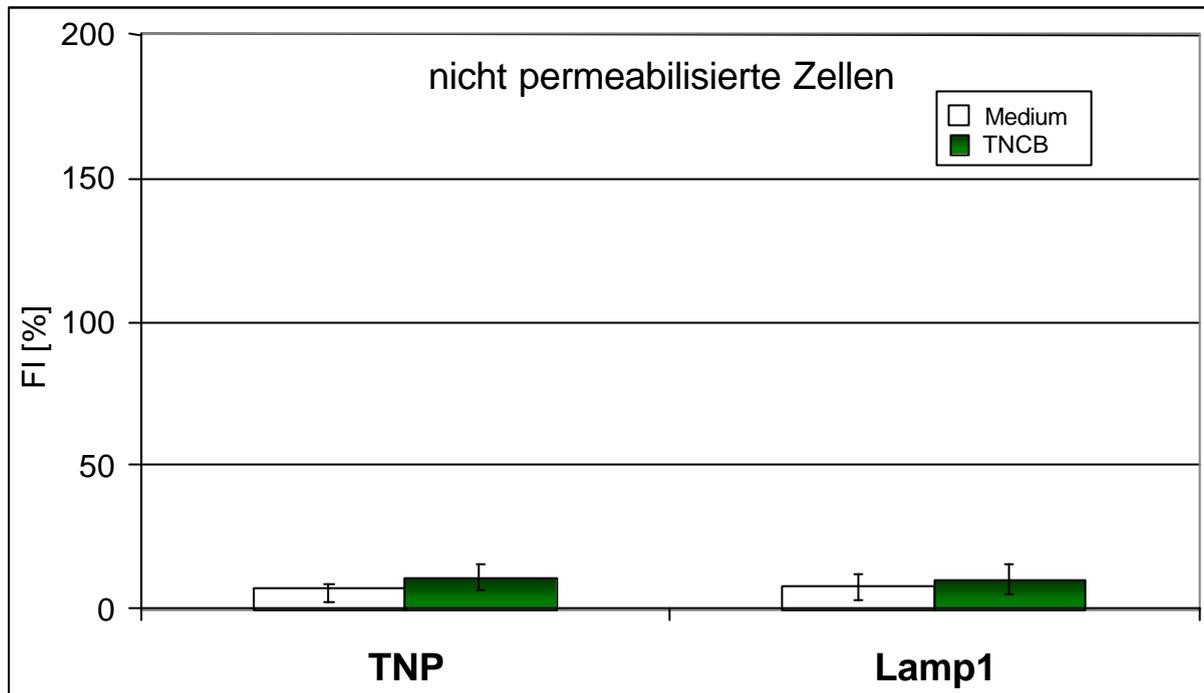
$1 \times 10^5$  reife DC wurden für 1 Stunde adhärirt, mit 4% PFA/PBS 20min bei RT inkubiert und zur intrazellulären Färbung mit 0,25% Saponin permeabilisiert. Zur extrazellulären Färbung wurde PBS/3%FCS als Puffer verwendet, anschließend wurden die Präparate mit Antikörpern gegen TNP und Lamp1 gefärbt und mit den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert. Im Fluoreszenzmikroskop stellte sich TNCB als grüne DTAF-Fluoreszenz und Lamp1 als rote Rhodamin-Färbung dar. Der Isotyp stellt die Kontrolle für den spezifischen sekundären Antikörper gegen TNP-Antikörper dar. Gezeigt ist eine repräsentative Auswertung von acht unabhängigen Experimenten.

#### 4. 2. 2 Flowzytometrische Detektion der TNP-markierten Zellen

Für humane unreife und reife dendritische Zellen des Blutes wurde eine Stimulation mit dem Kontaktallergen TNCB durchgeführt, um die intrazelluläre Lokalisation der TNP-Gruppen nach den immunhistochemischen Färbungen im FACS zu verifizieren. Mit durchflußzytometrischen Analysen konnte nach einer 10 minütigen Stimulation von DC eine erhöhte Fluoreszenzintensität der anti-TNP Färbung im FL-1-Kanal dargestellt werden. Als Kontrolle für eine korrekte Permeabilisierung wurde der lysosomale Faktor Lamp1 bei jeder Färbung mitgeführt.

Die Stimulation mit dem Kontaktallergen TNCB führte zu einem spezifischen Nachweis der gebundenen TNP-Gruppen nach der Permeabilisierung, während nicht permeabilisierte, stimulierte Zellen keine erhöhte Fluoreszenzintensität aufwiesen (Abb. 10 und Abb. 11). Die Färbung des lysosomalen Faktors Lamp1, als intrazelluläre Kontrolle, ist nach der Permeabilisierung positiv. Hamster anti-Maus CD154 wurde als Negativkontrolle für den sekundären Antikörper anti-Hamster DTAF gegen anti-Hamster TNP verwendet. Das Ergebnis war negativ (Daten nicht gezeigt).





**Abb. 10 Intra- und extrazelluläre Lokalisation von TNCB in unreifen DC.**

$1 \times 10^5$  unreife DC wurden mit 4% PFA/PBS 20min bei RT inkubiert und zur intrazellulären Färbung mit 0,25% Saponin permeabilisiert. Zur extrazellulären Färbung wurde 1%FCS/PBS als Puffer verwendet, anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen TNP und Lamp1 gefärbt. Nach Inkubation mit den entsprechenden Sekundärantikörpern wurden die Zellen gewaschen und durchflußzytometrisch analysiert. Gezeigt ist die mittlere prozentuale Fluoreszenzintensität von sechs unabhängigen Experimenten.

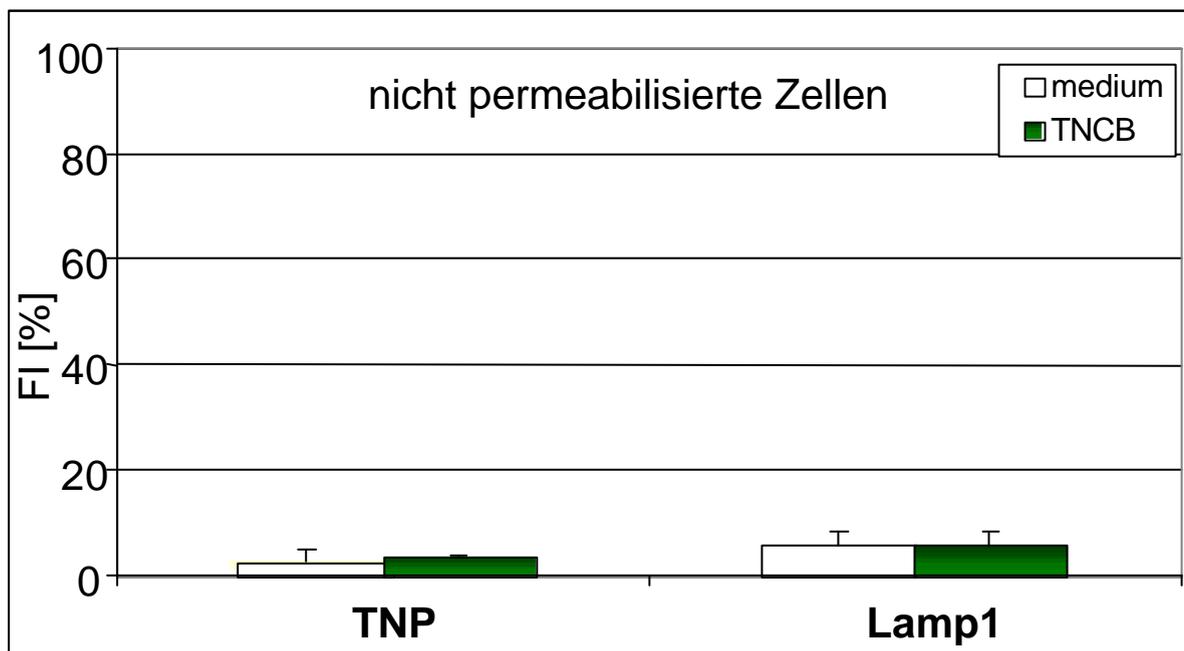
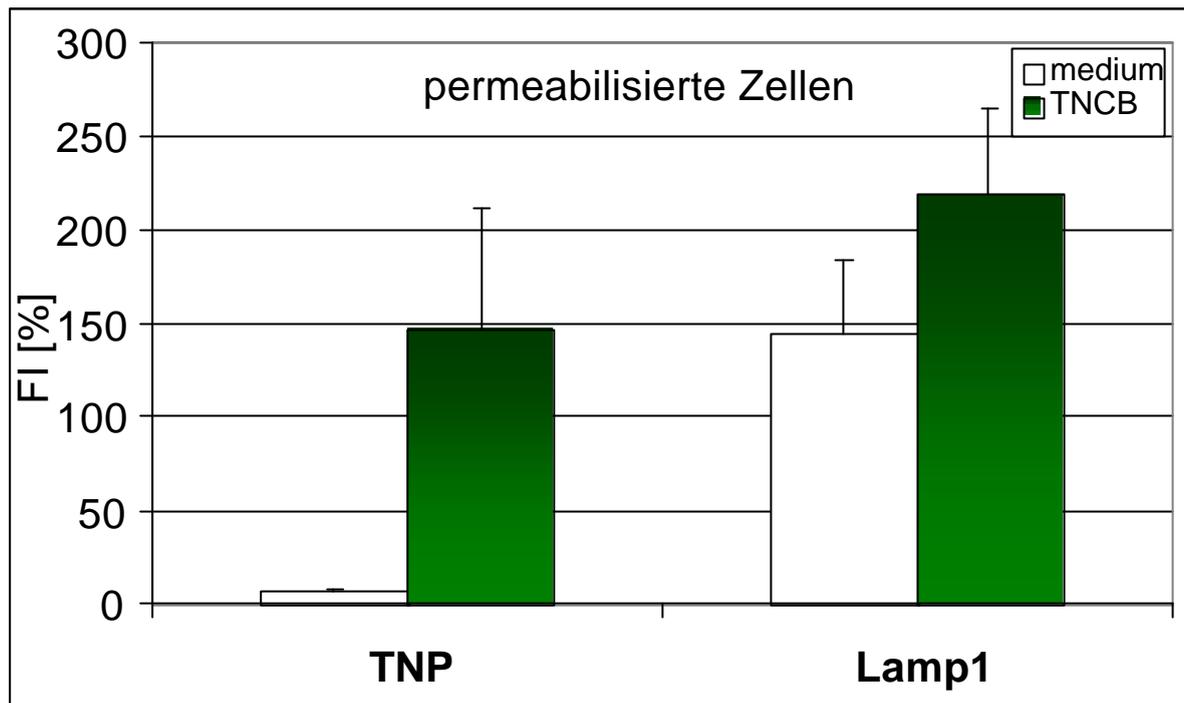


Abb. 11 Intra- und extrazelluläre Lokalisation von TNCB in reifen DC.

$1 \times 10^5$  reife DC wurden wie in Abb. 10 behandelt. Gezeigt ist die mittlere prozentuale Fluoreszenzintensität von neun unabhängigen Experimenten.

### 4.3 NAC blockiert die Bindung von TNP-Gruppen

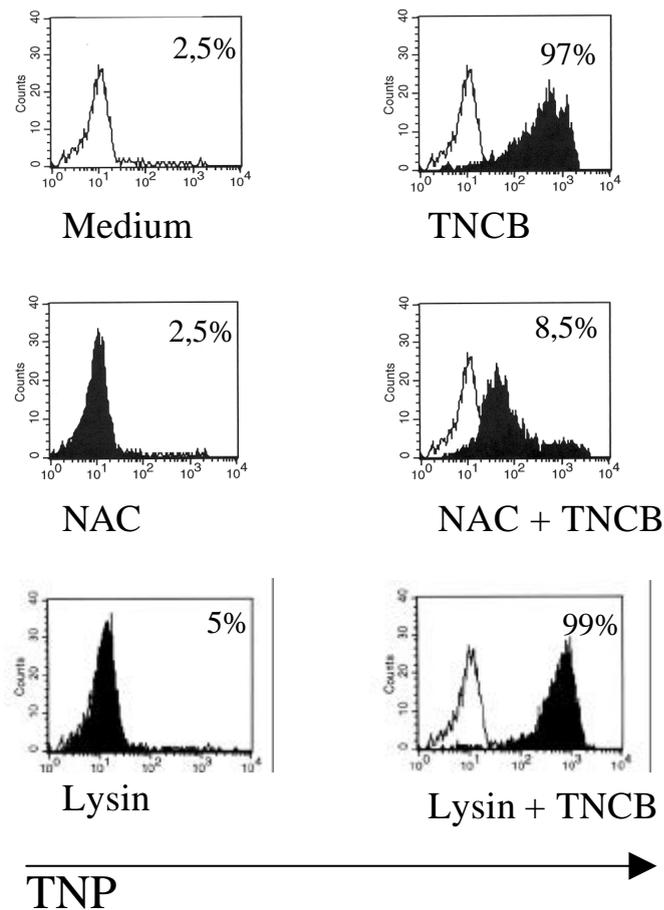
Zur Darstellung und auch zur Eingrenzung von Bindungspräferenzen des Kontaktallergens TNCB sollte eine Aussage über Sulfhydryl-Gruppen Dominanz oder Amino-Gruppen Bindung getroffen werden. Dazu wurden N-Acetylcystein (NAC) und Cystein als Bindungskompetitoren für Sulfhydryl-Gruppen und Lysin als Inhibitor für Amino-Gruppen eingesetzt.

Für humane Monozyten, dendritische Zellen und für epidermale Langerhanszellen der Maus konnte ein Anstieg an Phosphotyrosin (p-Tyr) als charakteristisches Merkmal für die Stimulation mit Kontaktallergenen definiert werden (Kühn *et al.*, 1998; Brand, 2002). Dieselbe Reaktion wurde nun auch nach einer 10 minütigen Stimulation bei dendritischen Zellen mit dem Kontaktallergen TNCB induziert. Die starke Tyrosinphosphorylierung, die sich biochemisch mit Hilfe eines p-Tyr spezifischen Antikörpers darstellen ließ, dient als Kontrolle für die Aktivierung (Abb. 13). Als direkter Nachweis für die Fähigkeit von NAC und Lysin die Bindung von starken Kontaktallergenen zu verhindern, wurde die Bindung von TNCB an monozytengenerierten DC analysiert.

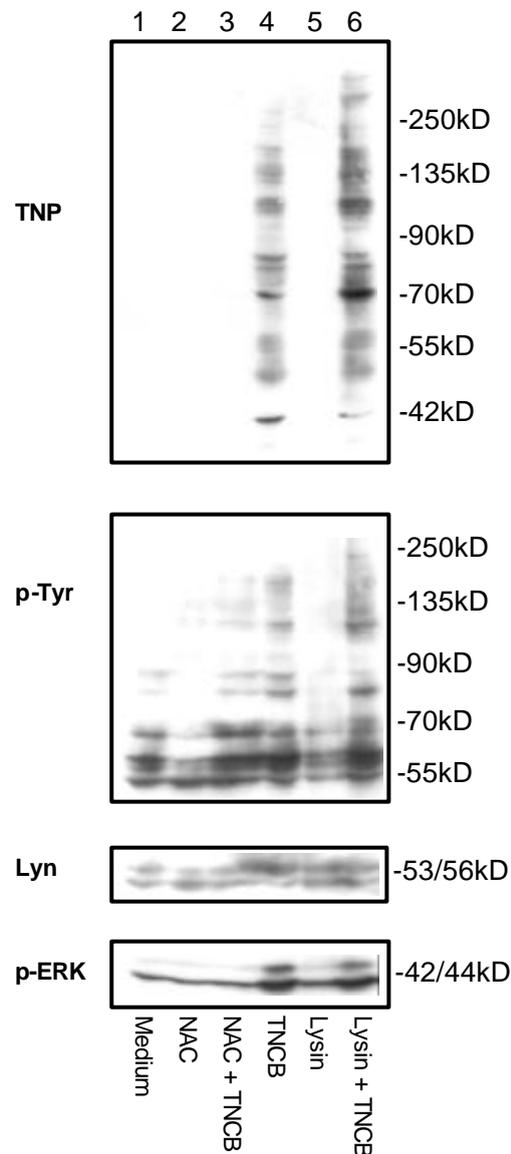
Unter der Verwendung eines spezifischen TNP-Antikörpers mittels flowzytometrischer Analyse konnte eine signifikante Bindung von intrazellulär gebundenem TNP-Gruppen an Proteine nach der Stimulation mit TNCB ermittelt werden. Durch Thiolantioxidantien wie NAC oder Cystein, jedoch nicht durch Lysin, konnte sowohl die Tyrosinphosphorylierung, als auch die Bindung von TNCB an intrazelluläre Proteine verhindert werden (Abb. 12).

Im Western Blot zeigt sich ein charakteristisches Muster von TNP-markierten Proteinen in den Zellen, die zuvor mit TNCB haptenisiert wurden. Subtoxische Konzentrationen des Kontaktallergens und der Inhibitoren reichten aus, um den Anstieg bzw. die Inhibition von p-Tyr zu induzieren. Die Bindung von TNCB ging mit einer erhöhten Tyrosinphosphorylierung, ebenso wie mit einer spezifischen ERK-Phosphorylierung einher. Die Phosphorylierung der ERK1/2 MAP Kinase dient als zusätzlicher, spezifischer Indikator der Aktivierung von DC und Monozyten. Die Stimulation mit TNCB konnte in Anwesenheit von NAC nahezu vollständig verhindert werden, mit Lysin war dies nicht möglich (Abb. 13).

Da Thiolantioxidantien eine haptentvermittelte Aktivierung inhibieren, ist die Bindung von thiolreaktiven Haptenen an Zellproteine für eine Initiation von intrazellulären Signalkaskaden essentiell. Aminogruppen besitzen in diesem Modell jedoch keinen meßbaren Einfluß auf die Effizienz der Bindung oder auf die Tyrosinphosphorylierung.

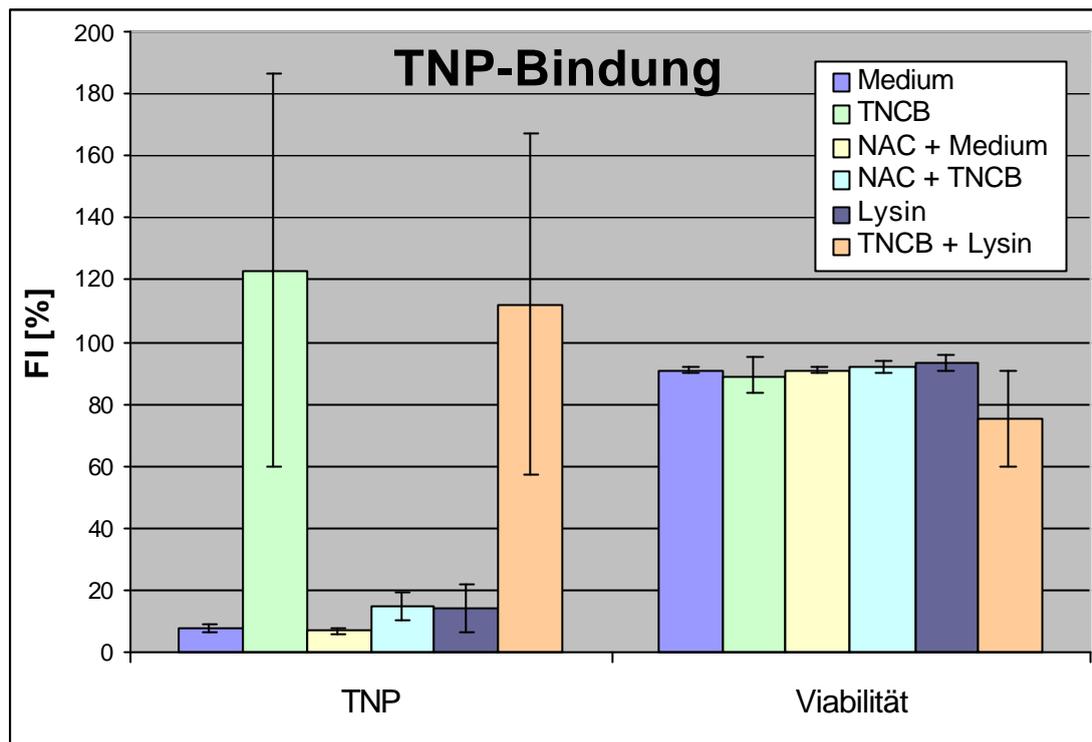


**Abb. 12 Die Bindung von TNCB an Proteine wird durch Thiolantioxidantien blockiert.**  $1 \times 10^5$  DC wurden zur intrazellulären Färbung mit 0,25% Saponin permeabilisiert. Zur extrazellulären Färbung wurde Medium als Puffer verwendet und anschließend mit Antikörpern gegen TNP gefärbt. Nach Inkubation mit den entsprechenden Sekundärantikörpern wurden die Zellen gewaschen und durchflußzytometrisch analysiert. In Form von Histogrammen ist die FL-1 Fluoreszenzintensität als Maß für die Menge an intrazellulärem TNP gezeigt. Die angegebenen Zahlenwerte geben den Median der Fluoreszenzintensitäten wieder. Gezeigt ist in diesem repräsentativen Experiment die prozentuale Fluoreszenzintensität von neun unabhängigen Experimenten mit vergleichbarem Ergebnis.



**Abb. 13 Western Blot zur Analyse TNP-gekoppelter und tyrosinphosphorylierter Proteine**

In Spur 1-6 sind die Lysate von jeweils  $1 \times 10^6$  reifen DC abgebildet. In Spur 1 wurde Lysat von unstimulierten DC als Mediumkontrolle aufgetragen. Vorinkubiert wurden DC in Spur 2,3 mit NAC (0,1mM) und in Spur 5,6 mit Lysin (0,5mM). Die Zellen der Spur 3,4,6 wurden anschließend für 10min mit TNCB ( $10 \mu\text{M}$ ) stimuliert. Das Lysat wurde aufgetragen ( $100 \mu\text{g}$ ), auf einem 10% Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis der TNP-Reste und Tyrosinphosphorylierung erfolgte mit TNP- und p-Tyr-spezifischen Antikörpern, die MAP Kinase ERK mit einem phosphospezifischen ERK-Antikörper, - als Ladungsabgleich diente Lyn.



**Abb. 14 FACS zur Analyse TNP-gekoppelter Proteine**

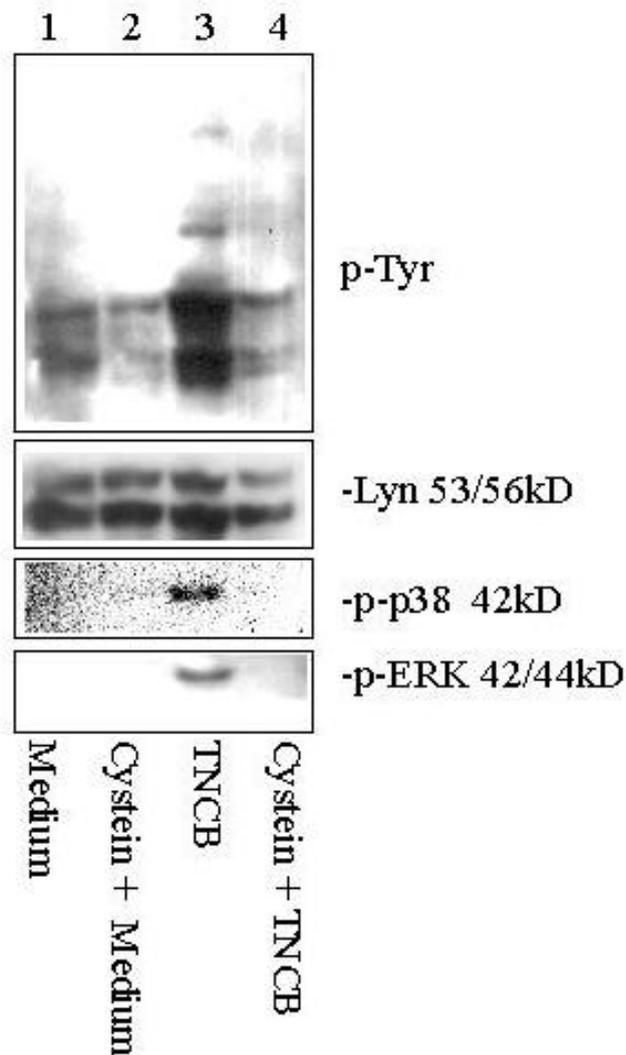
Balken 1-6 zeigen die TNP-Bindung in reifen DC. Balken 1 stellt Zellen von unstimulierten DC als Mediumkontrolle dar. Vorinkubiert wurden DC (Balken 3 und 4) mit NAC (0,1mM) und (Balken 5 und 6) mit Lysin (0,5mM). Die Zellen des 2., 4. und 6. Balkens wurden anschließend für 10min mit TNCB (10 $\mu$ M) stimuliert und durchflußzytometrisch gemessen. Der Nachweis der TNCB-Bindung erfolgte mit TNP-spezifischen Antikörpern. Die Viabilität belegt die Verwendung subtoxischer Konzentrationen. Gezeigt ist die prozentuale Fluoreszenzintensität von 12 unabhängigen Experimenten.

Die Inhibition der Tyrosinphosphorylierung und im speziellen der ERK-Phosphorylierung durch NAC, bestätigte sich auch bei Verwendung von Cystein. Hierzu wurden die dendritischen Zellen, wie in Abb. 13 und Abb. 14 beschrieben, behandelt und anschließend durchflußzytometrisch und biochemisch untersucht.

Unter der Verwendung eines spezifischen TNP-Antikörpers mittels flowzytometrischer Analyse konnte eine signifikante Bindung von intrazellulär gebundenem TNP-Gruppen an Proteine nach der Stimulation von DC mit subtoxischen Konzentrationen von TNCB (Abb. 17) ermittelt werden. Durch das Sulfhydrylgruppen-Reagenz Cystein konnte sowohl die Tyrosinphosphorylierung, als auch die Bindung von TNCB an intrazelluläre Proteine verhindert werden (Abb. 17).

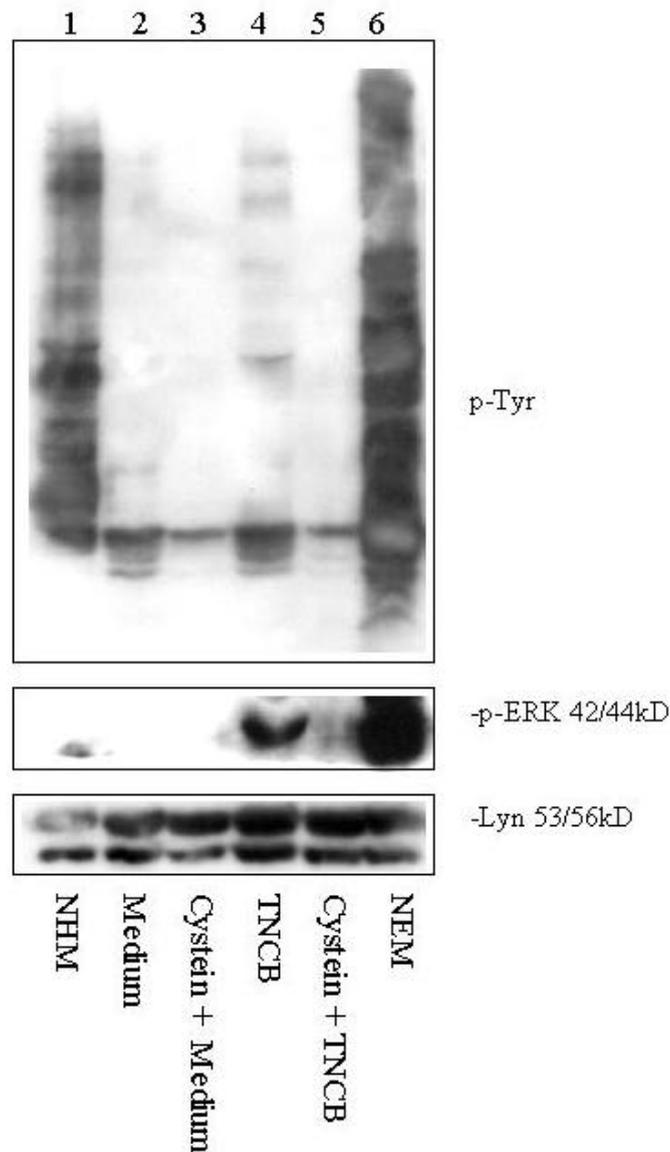
Im Western Blot zeigt sich sowohl bei DC als auch bei Monozyten ein charakteristisches Muster von p-Tyr-markierten Proteinen in den Zellen, die zuvor mit TNCB haptenisiert wurden. Mit der Bindung von TNCB konnte auch eine spezifische Phosphorylierung der ERK1/2 MAP Kinase dargestellt werden. Die Stimulation mit TNCB konnte in Anwesenheit von Cystein nahezu vollständig verhindert werden (Abb. 15 und Abb. 16).

Bei Monozyten zeigt sich im Western Blot Abb. 15 eine spezifische Phosphorylierung der p38 MAP Kinase, die durch das Thiolantioxidant Cystein inhibiert wurde.



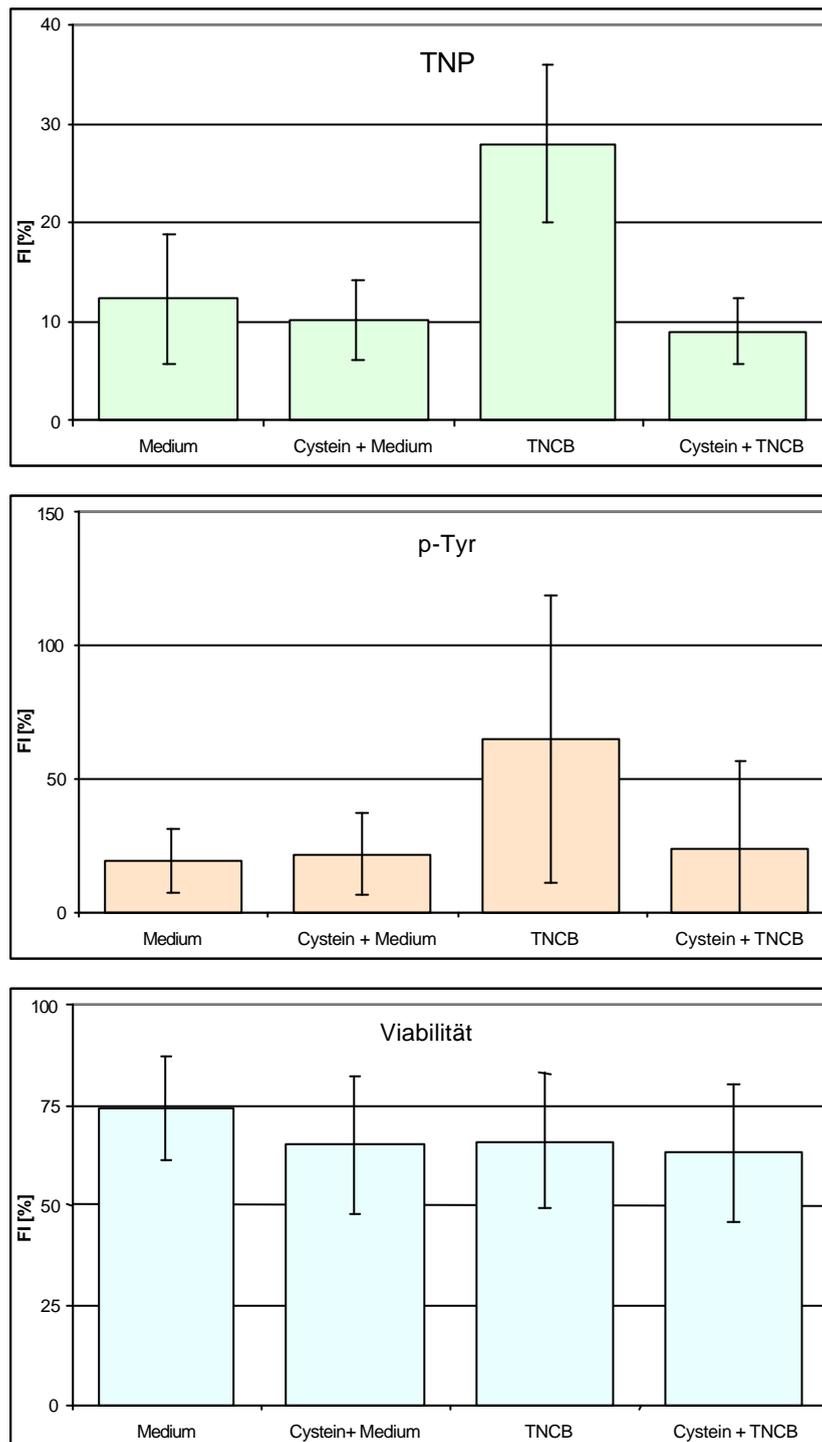
**Abb. 15** Western Blot zur Analyse p-Tyr-Inhibition durch Cystein

In Spur 1-4 sind die Lysate von jeweils  $5 \times 10^6$  Monozyten abgebildet. Spur 1 zeigt unstimulierte Monozyten als Mediumkontrolle. In Spur 2 und 4 wurden die Monozyten mit Cystein (1mM) vorinkubiert. Die Zellen der Spur 3 und 4 wurden anschließend für 10min mit TNCB ( $10 \mu\text{M}$ ) stimuliert, anschließend auf einem 10% Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis der Tyrosinphosphorylierung erfolgte mit p-Tyr (4G10) spezifischen Antikörpern, die MAP Kinasen ERK und p38 wurde mit einem phosphospezifischen ERK bzw. p38 Antikörper detektiert, als Ladekontrolle dient die Src-Kinase Lyn. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot von drei unabhängigen Experimenten.



**Abb. 16 Western Blot zur Analyse der Inhibition der Zellaktivierung durch Cystein und Aktivierung durch NHM und NEM, dargestellt anhand der Tyrosinphosphorylierung**

In Spur 1-6 sind die Lysate von jeweils  $1 \times 10^6$  reifen DC abgebildet. In Spur 1 wurde Lysat von NHM (2,2mM) stimulierten DC aufgetragen, in Spur 2 unstimulierte DC als Mediumkontrolle. Die DC in Spur 3 und 5 wurden mit Cystein (1mM) vorinkubiert. Die Zellen der Spur 4 und 5 wurden anschließend für 10min mit TNCB (10 $\mu$ M) stimuliert. Die Zellen der Spur 6 wurden mit NEM (80 $\mu$ M) stimuliert, anschließend auf einem 10% Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis der Tyrosinphosphorylierung erfolgte mit p-Tyr (4G10) spezifischen Antikörpern, die MAP Kinase ERK wurde mit einem p-ERK spezifischen Antikörper nachgewiesen, als Ladekontrolle diente die Src-Kinase Lyn. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot von drei unabhängigen Experimenten.



**Abb. 17 FACS zur Analyse von DC nach Inkubation mit Cystein und TNCB**

$1 \times 10^5$  reife DC wurden im FACS analysiert. Balken 1 stellt Zellen von unstimulierten DC als Mediumkontrolle dar. Vorinkubiert wurden DC (Balken 2 und 4) mit Cystein (1mM). Die Zellen (Balken 3 und 4) wurden anschließend für 10min mit TNCB ( $10 \mu\text{M}$ ) stimuliert und durchflußzytometrisch gemessen. Der Nachweis der TNP-Fluoreszenzintensität erfolgte mit TNP-spezifischen Antikörpern, der p-Tyr Antikörper zeigt die Gesamttyrosinphosphorylierung an. Die Viabilität belegt die Verwendung subtoxischer Konzentrationen. Gezeigt ist die prozentuale Fluoreszenzintensität von 4 unabhängigen Experimenten.

#### 4.4 Identifizierung von TNP-gekoppelten Proteinen

Um Proteine zu identifizieren, die sowohl aktiviert als auch gleichzeitig TNP-markiert sind, wurde ein Western Blot durchgeführt (Abb. 18). Das Mediumlysat (Bande 1) dient als Negativkontrolle, die TNCB behandelten Zellen (Bande 2) repräsentieren das spezifische Bindungsmuster der TNP-Antikörper. Das Lysat von TNCB behandelten Zellen (Bande 3) wurde in zwei Teile geschnitten und getrennt gefärbt, zum einen mit anti-TNP Antikörpern (Bande 3a) und zum anderen mit Phosphotyrosin Antikörper (Bande 3b). Hierdurch war die Möglichkeit gegeben, die exakte Höhe der Banden durch ein späteres Aneinanderfügen zu ermitteln. Einige der TNP-markierten Proteine besitzen ein nahezu identisches Molekulargewicht mit den tyrosinphosphorylierten Proteinen. Um diese potentiellen Banden zu identifizieren, wurde parallel zu jedem Western Blot ein Coomassie Gel zur massenspektrometrischen Analyse hergestellt. Die Tasche für das Coomassie Gel wurden mit 500µg Lysat anstelle der üblichen 100µg beladen.

Anschließend wurde die definierten Banden des Coomassie Gels von der Firma ESPLORA GmbH, Darmstadt analysiert. Die Proteine wurden reduziert, alkyliert und mit Trypsin verdaut. Das Peptid Massen Fingerprintig wurde mit einem Voyager DE PRO MALDI-TOF Instrument (Applied Biosystems) durchgeführt. In einem positiven Reflektor-Verfahren wurde eine alpha-cyano-4-hydroxycinnamic Säure als Matrix verwendet.

Die Analyse der Proteine ergab eine Identifikation von Aktin (40kD) (Accession-Nummer: 15277503) dem Thyroidhormon Bindeprotein (58kD) (Accession-Nummer: 266427) und der Gewebstransglutaminase (tTG, 74-80kD) (Accession Nummer 14770762). Die tTG wurde mit einer Identität von 25 Peptiden aus 26 analysiert. Eine 92% Übereinstimmung der analysierten Proteinsequenzdaten konnte mit den Sequenzen der tTG aus der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) erzielt werden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

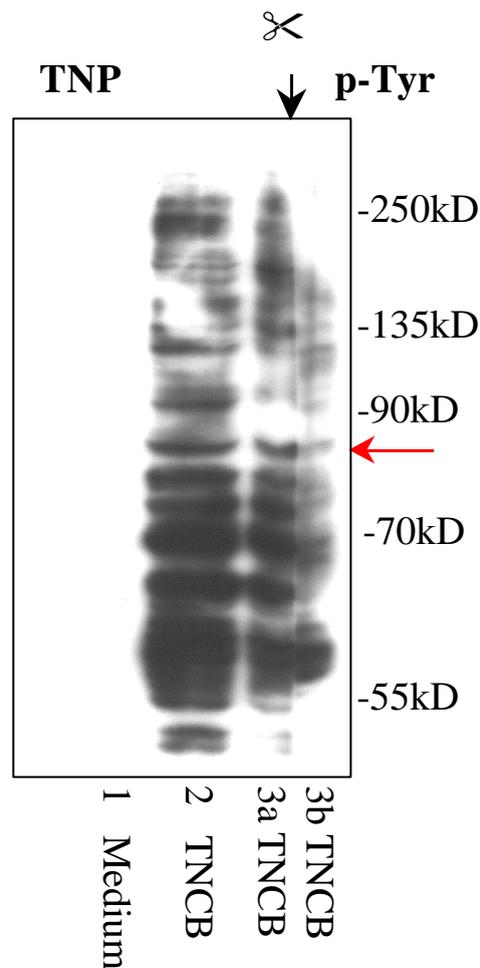


Abb. 18 Western Blot zur Analyse der TNP-gekoppelten und tyrosinphosphorylierten Proteine

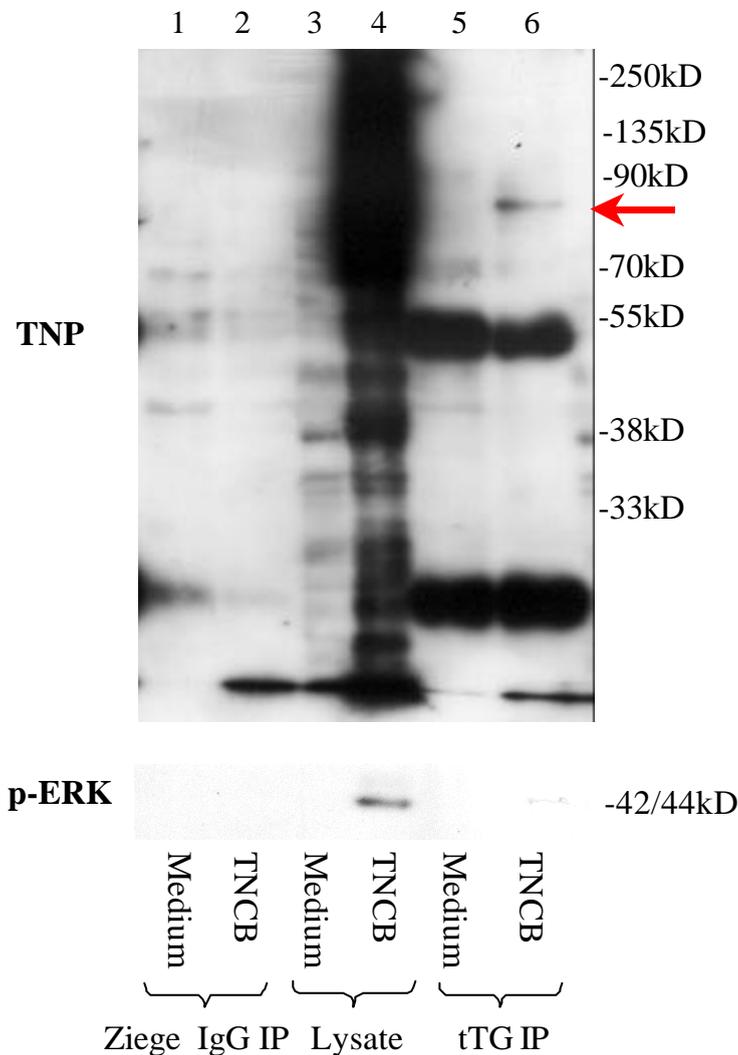
In Spur 1-3 sind die Lysate von jeweils  $1 \times 10^6$  DC abgebildet. In Spur 1 wurde Lysat von unstimulierten DC als Mediumkontrolle aufgetragen. Die Zellen der Spur 2 und 3 wurden in einem gemeinsamen Ansatz 10min mit TNCB ( $10 \mu\text{M}$ ) stimuliert und anschließend wurde das Lysat auf je  $100 \mu\text{g}$  pro Spur 2 und 3 verteilt. Die Lysate wurden auf einem 10% Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde auf der gesamten Länge der Spur 3 geschnitten und getrennt mit spezifischen Antikörpern gefärbt und anschließend detektiert. Der Nachweis der TNP-Reste und Tyrosinphosphorylierung erfolgte mit spezifischen Antikörpern. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot von drei unabhängigen Experimenten.

## **4.5 Immunpräzipitation der tTG**

### **4.5.1 Bindung von TNCB an tTG**

Um nachzuweisen, dass TNCB direkt an tTG bindet, wurden die Zellen 10 Minuten mit TNCB inkubiert (Abb. 19). Zur biochemischen Analyse wurden Gesamtllysate dendritischer Zellen mit einem Gewebstransglutaminase spezifischen Antikörper präzipitiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. In drei unabhängigen Versuchen zeigte die spezifische Bande der tTG bei 80kD ein TNP-gebundenes Signal und bestätigte somit die massenspektrometrische Analyse.

Es wurde ein anti-IgG Antikörper als IgG Kontrolle (Spur 1+2) und anti-tTG Antikörper (Spur 5+6) eingesetzt, in Spur 3 und 4 wurde Zelllysat aufgetragen. Die PVDF-Membranen wurden anschließend anti-TNP gefärbt und bei 80kD eine spezifische Bindung von TNCB an tTG detektiert. Es wurde keine Bande in der Mediumkontrolle gefunden (Spur 5).

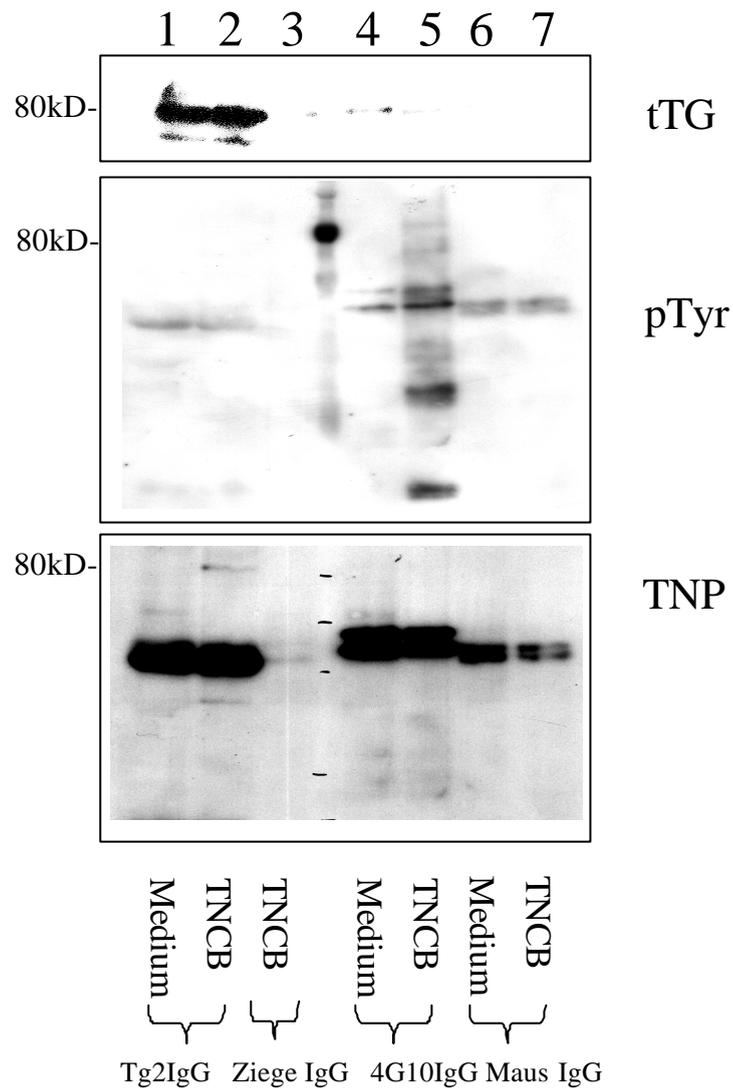


### Abb. 19 TNCB bindet direkt an tTG

$1 \times 10^6$  reife DC wurden mit TNCB ( $10 \mu\text{M}$ ) haptenisiert. Um die toxischen Effekte des Haptens auszuschließen, wurden die Ansätze nach 15 min gewaschen, lysiert und mit jeweils  $200 \mu\text{g}$  Protein aus jedem Ansatz zur Immunpräzipitation (IP) mit  $25 \mu\text{l}$  Sepharose A/G und 1ml Lysepuffer versetzt. In Spur 1 und 2 wurde ein unspezifischer anti-Ziege IgG bei der IP eingesetzt. Der spezifische Antikörper gegen tTG wurde in Spur 5 und 6 verwendet, Spur 3 und 4 zeigen Gesamtzelllysat. Der Blot wurde mit einem TNP-spezifischen Antikörpern auf die Bindung von TNCB untersucht und anschließend mit p-ERK-spezifischen Antikörper detektiert - zur Kontrolle für die Reaktivität der DC auf TNCB. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot von drei unabhängigen Experimenten.

#### **4. 5. 2 Die tTG wird nicht phosphoryliert**

Um zu untersuchen ob TNCB tatsächlich eine Phosphorylierung von tTG auslöst, wurden die Zellen 10 Minuten mit TNCB inkubiert (Abb. 20). Zur biochemischen Analyse wurde 200µg Gesamtlisat dendritischer Zellen mit einem Gewebstransglutaminase spezifischen Antikörper präzipitiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. In drei unabhängigen Versuchen zeigte die spezifische Bande der tTG bei 80kD ein TNP-gebundenes Signal. Es wurde ein anti-Ziege IgG-Antikörper als IgG-Kontrolle und anti-tTG Antikörper eingesetzt. Die PVDF-Membran wurde anschließend mit anti-Phosphotyrosin Antikörper gefärbt und bei 80kD wurde keine spezifische Bindung von Phosphotyrosin Antikörper an tTG detektiert. Es wurden keine unspezifischen Banden in den IgG Kontrolle gefunden. Die Verwendung des tTG-Antikörpers zeigt den gleichmäßigen Einsatz des Antikörpers bei der Präzipitation.



### Abb. 20 Die tTG wird nicht phosphoryliert

$1 \times 10^6$  reife DC wurden mit TNCB ( $10 \mu\text{M}$ ) haptenisiert und die Immunpräzipitation (IP) wie in Abb.19 beschrieben durchgeführt. In Spur 1 und 2 wurde der spezifische Antikörper gegen tTG verwendet, ein unspezifischer anti-Ziege IgG wurde in Spur 3 eingesetzt. In Spur 4 und 5 wurde ein Antikörper gegen p-Tyr und als Kontrolle ein Maus-IgG in Spur 6 und 7 verwendet. Der Blot wurde mit einem TNP-spezifischen Antikörper auf die Bindung von TNCB hin untersucht und nach dem „Strippen“ mit p-Tyr-spezifischen Antikörper detektiert. Ein Antikörper gegen die Gewebstransglutaminase dient als Ladekontrolle.

#### 4.6 ERK1/2 MAP Kinase Phosphorylierung und Inhibitor der tTG

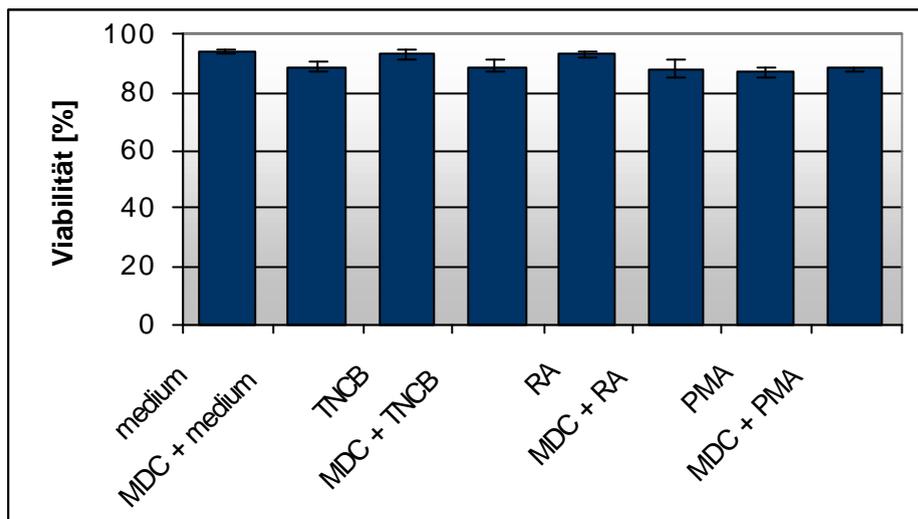
Der Hinweis auf eine Aktivierung des ERK1/2 MAP Kinase Signalweges durch TNCB in Abb.15 sollte im Zusammenhang mit der tTG näher untersucht werden. Die Auswirkung einer Stimulation von unreifen und reifen DC mit TNCB, RA und PMA auf die Aktivierung des ERK1/2 MAP Kinase Signalweges wurde mittels Western Blot untersucht.

Der Inhibitor Monodansylcadaverin (MDC) wurde in subtoxischen Konzentrationen ( Abb. 21) vor der Haptenisierung zugegeben, um eine spezifische Bindung der Stimulatoren an die enzymatische Stelle der tTG zu verhindern. DC wurden für 10 Minuten mit TNCB, PMA und RA behandelt. Nach der Zellyse wurde das Gesamtlisat durch SDS-PAGE analysiert und mit einem Antikörper im Western Blot gegen die aktivierte Form der ERK1/2 MAP Kinase gefärbt.

Bei unreifen dendritischen Zellen induzierte die TNCB und RA Behandlung eine starke ERK-Phosphorylierung (42/44kD). Diese konnte mit dem Inhibitor MDC in zwei verschiedenen Konzentrationen verhindert werden (Abb. 22). Ein erneutes Färben desselben Blots demonstriert, dass gleiche Proteinmengen der Src-Kinase Lyn detektiert wurden.

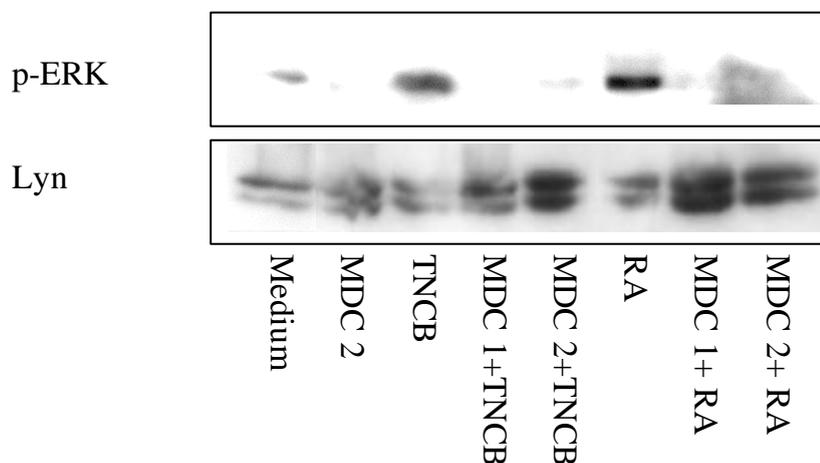
Die Behandlung mit TNCB, PMA und RA induziert eine starke ERK1/2 Phosphorylierung (42/44kD) bei reifen dendritischen Zellen (Abb. 23), unabhängig von der Behandlung mit TNCB, PMA und RA wurden gleiche Proteinmengen der Src-Kinase Lyn detektiert.

Die Relevanz der tTG für den ERK1/2 MAP Kinase Signalweg konnte durch die Behandlung der Zellen mit dem spezifischen tTG-Inhibitor MDC ermittelt werden. Wie in Abb. 22 und Abb. 24 gezeigt, erreicht die ERK-Phosphorylierung, wenn die Zellen mit MDC vorinkubiert wurden, nicht das ursprüngliche Niveau - MDC reduziert sie dosisabhängig. Als weiterer Hinweis auf eine Signalweiterleitung über die Enzymaktivität des Cysteinrestes der tTG, wurde ein tTG Aktivitäts Assay durchgeführt.



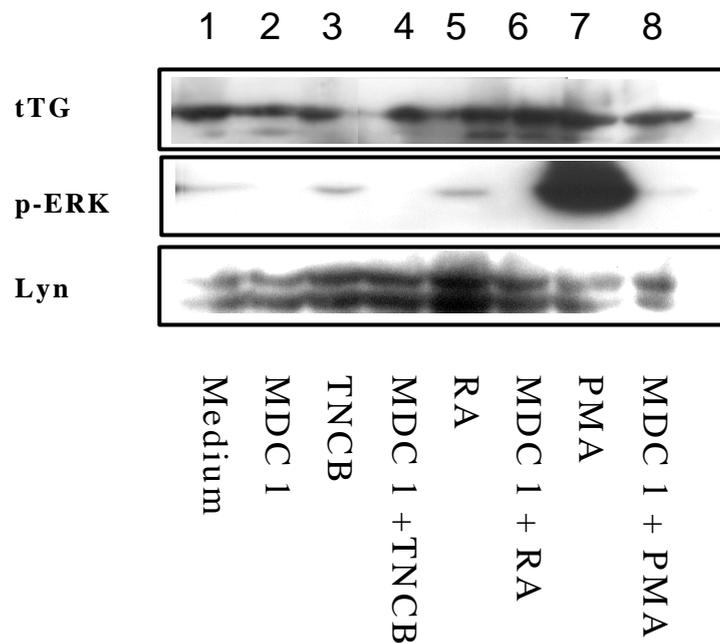
**Abb. 21 FACS Analyse der Viabilität der DC nach Inhibition und Stimulation**

$1 \times 10^5$  unreife DC wurden mit MDC (0,2mM) für 10min bei 37°C inhibiert und anschließend mit TNCB (10 $\mu$ M), RA (100 $\mu$ M) und PMA (30nM) stimuliert die Ansätze wurden nach 15min gewaschen. Die Viabilität lag bei >80%. Nach Inkubation mit Propidium Iodid wurden die Zellen gewaschen und durchflußzytometrisch analysiert. Gezeigt ist die mittlere prozentuale Fluoreszenzintensität von sieben unabhängigen Experimenten.



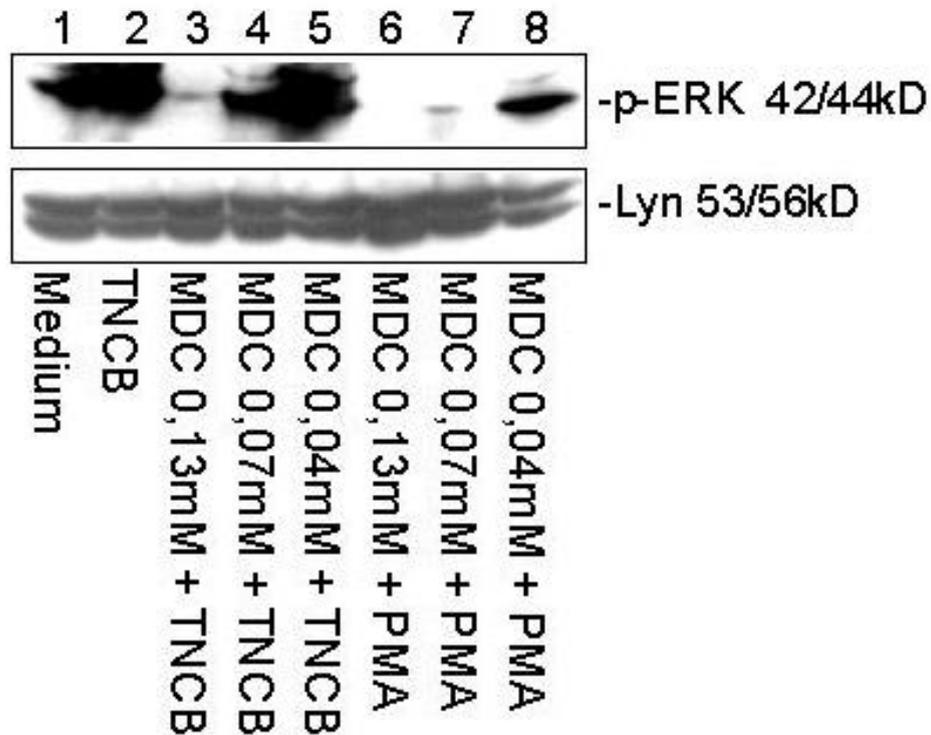
**Abb. 22 Western Blot Analyse unreifer DC nach Stimulation und Inhibition**

$1 \times 10^6$  unreife DC wurden mit MDC1 (0,2mM) und MDC2 (0,1mM) für 10min bei 37°C inhibiert und anschließend mit TNCB (10 $\mu$ M) und RA (100 $\mu$ M) stimuliert. Die Ansätze wurden nach 15min gewaschen, lysiert und jeweils 100 $\mu$ g der Gesamlysate auf einem 10% Gel durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Viabilität lag bei >72%. In Spur 1 und 2 wurden unstimulierte Lysate bzw. MDC eingesetzt. Der Blot wurde mit spezifischen Antikörpern gegen p-ERK gefärbt. Nach dem „Strippen“ wurde Lyn als Ladekontrolle detektiert. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot von drei unabhängigen Experimenten.



**Abb. 23 Western Blot Analyse reifer DC nach der Inhibition mit MDC**

$1 \times 10^6$  DC wurden mit MDC (0,2mM) für 10min bei 37°C inhibiert und anschließend mit TNCB (10 $\mu$ M), RA (100 $\mu$ M) und PMA (30nM) stimuliert. Um die toxischen Effekte des Haptens auszuschließen, wurden die Ansätze nach 15min gewaschen, lysiert und jeweils 100 $\mu$ g der Gesamtlysate auf einem 10% Gel durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Viabilität lag bei >82%. In Spur 1 und 2 wurden unstimulierte Lysate bzw. MDC eingesetzt. Der Blot wurde mit spezifischen Antikörpern gegen tTG und p-ERK gefärbt. Nach dem „Strippen“ wurde Lyn als Ladekontrolle detektiert. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot von fünf unabhängigen Experimenten.



#### Abb. 24 Western Blot Analyse der dosisabhängigen Inhibition von MDC

$1 \times 10^6$  DC wurden mit MDC (0,13mM, 0,07mM, 0,04mM) für 10min bei 37°C inhibiert und anschließend mit TNCB (10 $\mu$ M) und PMA (30nM) stimuliert und wie in Abb.23 weiterbehandelt. Die Viabilität lag bei >70%. In Spur 1 und 2 wurden unstimulierte Lysate bzw. MDC eingesetzt. Der Blot wurde mit spezifischen Antikörpern gegen p-ERK gefärbt. Nach dem „Strippen“ wurde Lyn als Ladekontrolle detektiert. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot von vier unabhängigen Experimenten.

#### 4.7 In vitro tTG Aktivitäts Assay

Um festzustellen, ob die ERK-Phosphorylierung mit einer in vitro tTG Aktivität korreliert, wurde 5-(biotinamido)pentylamin als Maßstab für die endogene tTG Aktivität verwendet. Die Gewebstransglutaminase (tTG) katalysiert als Acyltransferase den Einbau von primären Aminen in andere Proteine oder Polyamine. Diese Funktion der enzymatischen Aktivität macht man sich mit dem in vitro Aktivitäts Assay zunutze.

Um die in vitro Aktivität der tTG zu messen, wurden reife DC mit 5-(biotinamido)pentylamin eine Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> vorinkubiert und danach mit TNCB, RA und PMA stimuliert. Die Inkorporation von Polyaminderivaten in Proteine zeigt sich nach einer Detektion mit einem anti-biotin HRP Antikörper im Western Blot (Abb. 25). Die Zellen (Bande 2,4,6,8) wurden vor der Aktivierung mit MDC inhibiert.

Der Western Blot wurde mit anti-biotin HRP Antikörper inkubiert. Die mit TNCB, RA und PMA stimulierten Zellen zeigen eine deutliche tTG Aktivität. Diese konnte mit einer vorherigen MDC Inhibition verhindert werden. Anschließend wurde der Blot „gestrippt“ und mit einem Antikörper gegen tTG gefärbt. Die tTG-Expression wurde von Haptenen in diesen ersten 10 Minuten der Exposition nicht beeinflusst und ist konstitutiv nachweisbar. Die Behandlung mit dem Inhibitor MDC hatte keine Einwirkung auf die tTG-Expression bei DC.

Die Zellen haben nach der Inkubation mit den Substanzen TNCB, RA und PMA wiederum eine ERK-Phosphorylierung ausgelöst (Bande 3,5,7), die durch MDC inhibiert wurde.

Als Kontrolle diente die Src-Kinase Lyn. Diese Src-Kinase war in den unbehandelten DC stark exprimiert und zeigte keine Veränderung in den behandelten Zellen. Die Zellen, die mit den gleichen Aktivatoren behandelten wurden, zeigen im Western Blot die gleiche Menge an Proteinauftrag in Bezug auf die Src-Kinase Lyn.

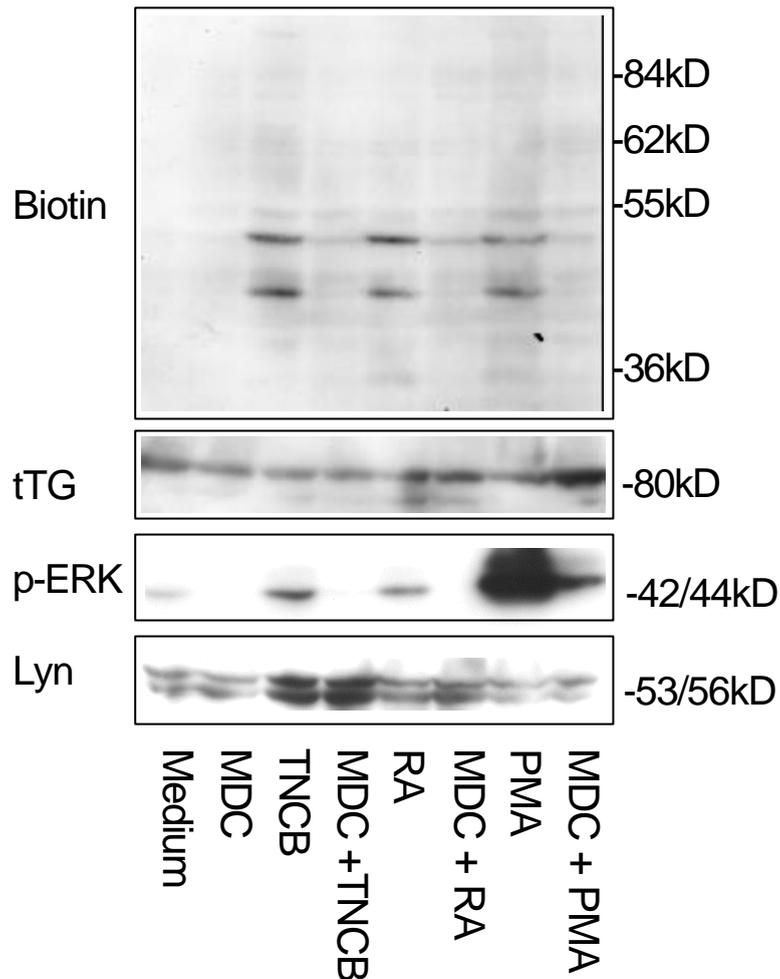


Abb. 25 Western Blot Analyse des tTG-katalysierten Einbau von 5-(biotinamido)pentylamin in Proteine als Maßstab der in vitro Aktivität

$1 \times 10^6$  DC wurden mit 5-(biotinamido)pentylamin für 1h inkubiert, anschließend mit MDC (0,2mM) für 10min inhibiert und mit TNCB (10 $\mu$ M), RA (100 $\mu$ M) und PMA (30nM) stimuliert. Um die toxischen Effekte der Aktivatoren auszuschließen, wurden die Ansätze nach 10min gewaschen, lysiert, die Lysate gewaschen und jeweils 100 $\mu$ g der Gesamtlisate auf einem 10% Gel durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Viabilität lag >84%. In Spur 1 und 2 wurden Lysate von unstimulierten bzw. mit MDC behandelten DC eingesetzt. Der Blot wurde sequentiell mit spezifischen Antikörpern gegen die biotinylierten Pentylamine, tTG und p-ERK gefärbt. Lyn wurde als Ladekontrolle detektiert. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot von fünf unabhängigen Experimenten.

## 5 Diskussion

Kontaktallergene sind niedermolekulare, chemisch reaktive Substanzen, die eine allergische Reaktion vom verzögerten Typ auslösen können. Im Gegensatz zu Proteinallergenen besitzen sie die Fähigkeit, in ausreichender Konzentration in die Epidermis einzudringen und hier kovalent an zelleigene Proteine zu binden (Janeway, 2001).

Langerhanszellen (LC) entsprechen unreifen dendritischen Zellen (DC) und bilden ein zelluläres Netzwerk in der Epidermis. Sie sind die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen (APC) der Haut und spielen eine zentrale Rolle in der Sensibilisierungsphase der allergischen Kontaktdermatitis. Die Kopplung von Haptenen an zelleigene, lösliche Proteine oder möglicherweise direkt an Langerhanszellen, induziert in diesen die Bildung proinflammatorischer Zytokine und führt schließlich zur Auswanderung der Langerhanszellen aus der Epidermis (Weinlich et al., 1998). Bisher konnte gezeigt werden, dass Kontaktallergene im Gegensatz zu nicht sensibilisierenden Substanzen eine starke Tyrosinphosphorylierung in humanen dendritischen Zellen des Blutes und in murinen Langerhanszellen induzieren (Kühn *et al.*, 1998).

### 5.1 Verwendete Modellzellen

Diese Untersuchungen wurden nun anhand humaner dendritischer Zellen, die als Modellzellen für kutane APC dienen, fortgeführt. Der Rückgriff auf eine Modellzellpopulation war aus mehreren Gründen sinnvoll.

Ein Nachteil bei der Verwendung von Langerhanszellen und unreifen dendritischen Zellen des Blutes bestand in einer niedrigen Zellzahl nach der Isolierung. Aus diesem Grund waren keine proteinbiochemischen Analysen mit reinen Langerhanszellpopulationen möglich und die Menge der Analysen mit unreifen dendritischen Zellen begrenzt. Zudem führte die Präparation von LC aus der Epidermis häufig zu einer Voraktivierung der Zellen, was die Untersuchung der Signaltransduktion erschwerte.

Humane, reife dendritische Zellen erwiesen sich als geeignete Modellzellen für kutane APC. Sie ließen sich durch die Methode der Kurzzeitadhärenz aus PBMC in ausreichender Zellzahl und Reinheit isolieren (Abb. 8). Kultivierte, reife DC konnten durch Zugabe von IL-4, GM-CSF und proinflammatorischer Zytokine generiert werden (Jonuleit et al., 1997). Sie waren für diese Untersuchungen geeignet, da die

---

Zellen mit zunehmender Kulturdauer ihre Aktivierbarkeit durch Haptene und Stimulatoren behalten haben. Hierbei zeigten unreife und reife DC auch weitgehend dieselben Reaktionsmuster nach Stimulation mit Kontaktallergenen und Aktivatoren.

## 5.2 Intrazelluläre Lokalisation von TNCB

Ziel dieser Studie war es, die intra- oder extrazelluläre Lokalisation von TNP-Resten des Kontaktallergens TNCB in der frühen Phase der Applikation darzustellen und die TNCB-Bindungsstrukturen in diesem in vitro Model zu identifizieren.

Kolde et al. beschreiben schon in den 80er Jahren, dass in Mäusen 2,4-Dinitrophenyl (DNP) Gruppen in der Epidermis nach epikutaner Applikation von Kontaktallergenen wie 2,4-Dinitrofluorbenzol (DNFB) und dem Tolerogen 2,4-Dinitrothiocyanobenzol (DNTB) im Elektronenmikroskop nachgewiesen werden konnten. Die intrazelluläre Lokalisation von DNP-Gruppen war nicht limitiert auf zytoplasmatische Organellen, die dem endozytotischen–lysosomalen System angehören. Die Applikation von DNTB induziert keine zelluläre und endozytotische Aktivierung von LC, wie dies bei DNFB zu sehen war. Die Daten lassen vermuten, dass Kontaktallergene in LC kein spezielles System zur Aufnahme vor der intrazellulären Prozessierung durch endozytotische–lysosomale Kompartimente und der Präsentation an ihrer Oberfläche benötigen (Kolde and Knop, 1988).

Hunger et al. analysiert 2,4-Dinitrochlorbenzol (DNCB) immunhistochemisch und flowzytometrisch intrazellulär in humanen Lymphozyten. Nach Haptenapplikation auf die Haut, waren die Oberflächenfärbungen der Lymphozyten der Probanden immer negativ (Hunger et al., 2001).

Diese Ergebnisse sind konform mit den Daten für das Hapten TNCB dieses in vitro Modells. Bei immunhistochemischen Färbungen (Abb. 9) konnte TNCB ausschließlich intrazellulär detektiert werden. Und auch in FACS-Analysen (Abb. 10 und Abb. 11) zeigen die Experimente einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenz an gebundenen TNP-Resten in unreifen und reifen dendritischen Zellen, wenn sie mit TNCB inkubiert und anschließend mit dem Detergenz Saponin permeabilisiert wurden. In der frühen Phase der Aktivierung werden die Antigene innerhalb der ersten 10 Minuten in DC passiv oder aktiv aufgenommen. Im Gegensatz dazu zeigt sich sowohl bei immunhistochemischen Färbungen, wie auch im FACS bei TNCB behandelten, nicht permeabilisierten Zellen keine Fluoreszenz. Kleine Mengen von

TNCB an der Zelloberfläche können nicht ausgeschlossen werden, sie liegen eventuell außerhalb des meßbaren Bereichs.

Die Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass in murinen LC Haptene eher intrazellulär lokalisiert sind und dort an viele verschiedene Proteine kovalent binden (Kolde and Knop, 1988). Dies ist an unreifen und reifen humanen DC nachzuvollziehen. Nach der Sensibilisierung mit Haptenen werden die Antigene in der frühen Phase *in vitro* intrazellulär aufgenommen, wie es auch schon *in vivo* für DNCB gezeigt wurde (Hunger et al., 2001).

Deutlich waren sowohl bei unreifen als auch bei reifen DC TNP-markierte Proteine immunhistochemisch und flowzytometrisch nach der Permeabilisierung intrazellulär nachweisbar.

Es gibt weder im FACS noch in der immunhistochemischen Auswertung einen signifikanten quantitativen Unterschied. Dies deutet darauf hin, dass die Aufnahme wohl eher Zelltyp unabhängig ist. Bei einer aktiven Aufnahme der Haptene wäre bei unreifen DC eine erhöhte Fluoreszenzintensität im FACS und ein stärker gefärbtes Zytosol in den immunhistochemischen Färbungen zu erwarten gewesen, da LC frisch isoliert in der Lage sind Antigene aufzunehmen und zu prozessieren, doch nur schwach T-Zellen aktivieren (Pure et al., 1990; Romani et al., 1989a; Schuler et al., 1985). Bei vollständiger Ausreifung verlieren sie ihre Phagozytosefähigkeit, exprimieren MHC-Klasse II und kostimulatorische Moleküle stärker auf ihrer Zelloberfläche und können so primäre T-Zellen aktivieren (Heufler et al., 1988; Kampgen et al., 1991; Streilein and Grammer, 1989; Witmer-Pack et al., 1988). Dies läßt darauf schließen, dass die reifen dendritischen Zellen, die den vollständig ausgereiften LC entsprechen, Haptene nicht aktiv über Phagozytose in nennenswerten Umfang internalisieren, sondern TNCB passiv in die Zelle gelangt.

Vermutlich ist die Aktivierung der Kaskaden durch TNCB in diesem Modell nicht extrazellulär über Rezeptoren vermittelt oder sie spielen nur eine untergeordnete Rolle. Für DNCB wird eine erhöhte Gluthation-S-Transferase Aktivität in der humanen Epidermis gemessen - dies konnte auch an Ratten und Schweinen gezeigt werden. Es wird vermutet, dass das Niveau an Gluthation in der Haut der limitierende Faktor für die perkutane Absorption von DNCB in die Haut ist (Jewell et al., 2000).

Auch in der Untersuchung von Jewell et al. scheinen eher intrazelluläre Faktoren als extrazelluläre Rezeptorkomponenten eine Rolle für die Aufnahme zu spielen.

Mit dem Kontaktallergen DNFB, einem Derivat der Pikrinsäure, wurde bei humanen LC nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten ein starker Schwund an HLA-DR Molekülen registriert und festgestellt, dass HLA-DR Moleküle hauptsächlich in Lysosomen nahe des Nucleus lokalisiert waren. Dies wurde mit drei Irritantien wie Benzalkoniumchlorid (BAC), Natriumdodecylsulfat (SDS) und Benzoesäure nicht ermöglicht. Hier fanden sich die Irritantien in den Prälysosomen ausschließlich nahe der Zellmembran. Diese Daten wurden nach 60 Minuten erhoben, 15 Minuten nach Stimulation waren sie noch nicht meßbar (Rizova et al., 1999).

Nach der Haptenisierung mit DNTB und DNFB werden DNP-Gruppen aufgenommen und intrazellulär, als homogene Färbung im Zytoplasma von murinen Keratinozyten, Melanozyten und Langerhanszellen, nach 6-24 Stunden gefunden (Kolde and Knop, 1988; Oka et al., 1986).

Diese Untersuchungen unterstützen die intrazelluläre Bindungspräferenz von Pikrinsäurederivaten, die zu den starken Kontaktallergenen zählen.

### **5.3 Thiolantioxidantien inhibieren die Tyrosinphosphorylierung**

Thiole (Mercaptane) gehören zu der Klasse der organischen Schwefel-Kohlenstoff-Verbindungen. Eine andere Bezeichnung ist Mercaptane, da die Thiole unlösliche Quecksilbersalze (Mercaptide) bilden ("mercurium captans"). Als funktionelle Gruppe enthalten sie eine Sulfhydrylgruppe (R-SH). Die Aminosäure Cystein und auch das Antioxidant N-Acetylcystein (NAC) gehören zu den Thiolen. Bei der Oxidation von Thiolen entstehen Disulfide (Sen, 2000). NAC wurde als potenter Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ -B beschrieben. Die Stimulation wurde mit LPS bei peritonealen Rattenmakrophagen, Astrozyten und C6 Gliazellen ausgelöst. NAC ist in der Lage die Induktion der NO-Produktion zu hemmen. Diese Induktion wird auch von einem anderen Antioxidant dem Pyrroline Dithiocarbamate (PDTC) inhibiert. Neben der NO-Produktion wird auch die TNF- $\alpha$ -Produktion nach Aktivierung mit Endotoxin in Rattenmakrophagen gehemmt (Pahan et al., 1998).

Senaldi et al. beschreibt, dass die relevante von NAC ausgelöste Inhibition der Kontaktallergie in TNCB-sensibilisierten Mäusen von einem Mechanismus des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ -B abhängt (Senaldi et al., 1994).

Blockiert man bei humanen reifen DC NF- $\kappa$ -B durch einen endogenen Inhibitor, so werden sowohl kostimulatorische Signale wie HLA II, CD80, CD86 und CD40, sowie immunstimulatorische Zytokine wie IL-12 und TNF- $\alpha$  herunterreguliert. Dies weist auf eine NF- $\kappa$ -B abhängige Antigenpräsentation in DC hin (Yoshimura et al., 2001). Die Aktivierung von Tyrosinen und damit ihre Phosphorylierung ist ein Indikator für die Aktivierung von APC durch Kontaktallergene (Kühn et al., 1998) (Neisius et al., 1999).

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass Thiolantioxidantien die Tyrosinphosphorylierung in vitro unterdrücken können. Mit NAC und Cystein wurde eine Aktivierung von p38 und ERK1/2 MAP Kinase durch TNCB in monozytengenerierten reifen DC verhindert. Der inhibitorische Effekt, der innerhalb der ersten 10 Minuten nach der Haptenisierung auf p-p38 und p-ERK wirkt, deutet darauf hin, dass Thiolantioxidantien vor der Stimulation präsent sein müssen. Dies zeigt möglicherweise, dass das erste initiale Ereignis oder die Bindung eines Haptens an seine Zielstrukturen blockiert ist. Tatsächlich wird gezeigt, dass NAC und auch Cystein in der Lage sind, die Bindung von TNCB an Proteine zu inhibieren (Abb.13 und Abb. 14) (Bruchhausen und Zahn, submitted).

Dies wird deutlich durch die Verwendung des spezifischen, polyklonalen Antikörpers gegen TNCB (Martin, 2001). Kürzlich wurde eine ähnliche Technik der Antikörpererkennung von DNP-Resten nach der Haptenisierung mit DNCB, einem weiteren Pikrinsäurederivat, bei humanen Lymphozyten beschrieben (Hunger et al., 2001).

Aufgrund dieser Daten liegt die Vermutung nahe, dass die Mechanismen der Inhibition durch einen Überschuss an Thiolgruppen eines Antioxidants gegenüber den freien Thiolen der Zielproteine erklärt werden können. Dies minimiert die Menge von Haptenbindungen an Zielproteine und verhindert eine intrazelluläre Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden, die durch diese kovalenten chemischen Reaktionen induziert werden.

Die Reaktivität gegenüber freien Thiolgruppen scheint daher ein wichtiger Auslöser für die Kontaktallergie zu sein - sie ist von Aminogruppen eher unabhängig. Humane Monozyten wurden mit dem starken thiol-reaktiven Reagenz N-Hydroxymaleimid (NHM) und dem Kontaktallergen TNCB inkubiert. Sie zeigen im FACS eine starke Tyrosinphosphorylierung im Gegensatz zu den Aminogruppen-reaktiven Verbindungen 2-Iminothiolan und Sulfo-NHS. Im Western Blot können diese Daten an reifen DC für TNCB und thiol-reaktiven Reagenzien NHM und NEM gezeigt werden (Abb. 16). Induziert man eine Kontaktallergie bei Balb/c Mäusen, so gelingt dies mit TNCB und NHM, jedoch nicht mit den Aminogruppen-reaktiven Reagenzien Sulfo-NHS und 2-Iminothiolan (Becker, 2002).

Die Daten von Senaldi et al. zeigen den inhibitorischen Effekt von NAC bei der Kontaktallergie in TNCB-sensibilisierten Mäusen. Bei der Applikation von TNCB konnte durch NAC sowohl die Ohrschwellung reduziert werden, als auch eine verminderte kutane Expression von TNF- $\alpha$  mRNA gezeigt werden (Senaldi et al., 1994).

Die Kapazität von NAC, NF- $\kappa$ -B und die Produktion von TNF- $\alpha$  zu inhibieren (Pahan et al., 1998) ist eventuell sehr wichtig für andere Stimulatoren. Es ist zu vermuten, dass NAC und Cystein als Protektoren von Thiolgruppen fungieren, die für die Initiation von Signalkaskaden verantwortlich sind. Unter dem Einfluß von TNF- $\alpha$  beginnen allergentragende LC aus der Epidermis zu den lokalen Lymphknoten zu migrieren. Unter TNF- $\alpha$ -Einwirkung verringert sich die Fähigkeit der LC, weiteres Antigen aufzunehmen, gleichzeitig wird die Antigenpräsentation verstärkt (Frosch et al., 1996a). Von TNF- $\alpha$  ist weiterhin bekannt, dass in humanen unreifen DC der p38 MAPK Weg über die Phosphorylierung von p38 aktiviert wird. Auch JNK und ERK1/2 MAP Kinase werden durch TNF- $\alpha$  phosphoryliert (Arrighi et al., 2001).

TNCB induziert bei murinen epidermalen Zellen (EC) die Induktion von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Enk et al., 1993). Dies konnte auch für murine Keratinozyten gezeigt werden, die mit DNFB stimuliert wurden und anschließend eine erhöhte Zytokinproduktion von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\alpha$  aufwiesen (Haas et al., 1992). Murine EC (CD1a<sup>-</sup>/CD3<sup>-</sup>) wiesen nach Stimulation mit dem nicht sensibilisierenden Irritant PMA und dem NiSO<sub>4</sub> eine erhöhte TNF- $\alpha$  Expression auf - nach TNCB und TNBS Applikation war dies nicht festzustellen. Die Daten von Lisby et al. demonstrieren, dass es auch Irritantien gibt,

die ohne intermediäre Signale durch LC in Keratinozyten eine TNF- $\alpha$  Produktion induzieren (Lisby et al., 1995).

Diese Forschungen zeigen die protektive Wirkung von NAC auf LC und EC, den starken Einfluß auf Thiolgruppen und der weitergehenden Einwirkung auf die Signaltransduktionskaskaden.

#### **5. 4 Massenspektrometrische Analyse der TNCB gebundenen Proteine**

Aus einer Reihe von Proteinen, die TNCB gebunden hatten (Abb.13), mußten zwei Parameter als Auswahlkriterium zur Analyse herangezogen werden. Die Banden sollten ausreichend deutlich und mehrmals mit ähnlichem Molekulargewicht im Western Blot visualisiert worden sein. Zweitens sollten die ausgewählten Proteine sowohl TNP-Gruppen gebunden haben als auch Tyrosinphosphorylierungsstellen aktiviert worden sein. Dies sollte die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass die zufällig identifizierten Proteine auch durch TNCB beeinflusst und aktiviert wurden.

##### **5. 4. 1 Identifikation von Aktin und dem Thyroidhormon Bindeprotein**

Die massenspektrometrische Analyse der tyrosinphosphorylierten und gleichzeitig TNP-markierten Proteine ergab eine Identifikation von Aktin (40kD) (Accession-Nummer: 15277503) und dem Thyroidhormon Bindeprotein (58kD) (Accession-Nummer: 266427). Die erhaltenen Proteinsequenzen wurden mit den Proteinsequenzdaten des NCBI (BLAST des Humanen Genoms) verglichen.

Ein Zusammenhang zwischen der Kontaktsensibilisierung gegen TNCB, insbesondere relevante Tyrosinphosphorylierungsstellen, konnte nach Literaturrecherchen für das Thyroidhormon Bindeprotein nicht hergestellt werden.

Zwischen Aktin und der Transglutaminase bestehen Interaktionen. Das dimere G-Aktin wird in Bakterien kovalent an das globuläre Subfragment des Myosinmoleküls S1 gebunden, diese Reaktion wird von der Transglutaminase katalysiert (Eligula et al., 1998). Nemes et al. berichten, dass zytoplasmatisches Aktin als Substrat für die Gewebstransglutaminase in apoptotischen HL-60 Zellen, einer humanen Leukämie-Zelllinie und U937 Zellen, einer humanen Monozyten-Zelllinie dient (Nemes et al., 1997). Dies konnte auch schon von Takaschi et al. in Rattenzellen nachgewiesen werden (Takashi, 1988).

Da in der Literatur kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen TNCB und Aktin gefunden werden konnte, wurde mit der Gewebstransglutaminase weitergearbeitet.

#### 5. 4. 2 Identifikation der Gewebstransglutaminase

Die massenspektrometrische Analyse der tyrosinphosphorylierten und gleichzeitig TNP-markierten Proteine ergab eine 92% Übereinstimmung der passenden Proteine der Gewebstransglutaminase (tTG) mit den Proteinsequenzdaten der tTG des NCBI (BLAST des Humanen Genoms) (Accession Nummer 14770762).

Die Transglutaminase wurde auf beide Auswahlkriterien, die zur Identifikation des Enzyms über die massenspektrometrische Analyse führten, hin überprüft.

a) Hinweise für eine Tyrosinphosphorylierung der tTG selbst konnten nach Literaturrecherchen nicht gefunden werden. In Abb. 20 ist nach der Detektion mit dem phosphotyrosin-Antikörper keine Phosphorylierung der tTG nachweisbar.

Das Fehlen von phosphorylierten Tyrosinen der tTG lässt sich eventuell auch durch eine zu geringe Sensitivität bei der Detektion bei der verwendeten IP erklären. Wie am Beispiel der tTG zu erkennen ist, müssen allerdings Proteine, an die TNCB bindet, nicht zwangsläufig auch phosphoryliert sein, um eine funktionelle Rolle innerhalb der Signalkaskaden zu spielen.

b) Die Prüfung der Bindung von TNCB an die Gewebstransglutaminase durch eine Immunpräzipitation der tTG bestätigte die Bindung von TNCB an die tTG. Ein Zusammenhang zwischen TNCB und der tTG findet sich bisher in der Literatur noch nicht.

Von Nitroxid (NO) ist bekannt, dass es an Cysteinreste der tTG bindet und anschließend die Balance zwischen Apoptose und Nekrose reguliert. NO ist in der Lage, zumindest zwei wichtige Effektorelemente der Apoptose an aktiven Cysteinresten zu S-nitrosylieren. Melino et al. zeigen, dass bei Jurkat Zellen NO die tTG durch Nitrosylierung inaktiviert und somit die Apoptose zu einer Nekrose konvertiert wird. Die Inhibition der tTG funktioniert intrazellulär mittels hoher Dosen von NO über einen Donor (Melino et al., 1997).

Durch die vorhergehenden Inhibitionsexperimente mit Cystein und NAC, sowie TNCB als Stimulator, lag die Vermutung nahe, dass hier eine Korrelation zwischen dem freien Cysteinrest an der enzymatisch aktiven Seite der tTG und der

Bindungsstelle von TNCB an tTG bestehen könnte (Lee et al., 1993; Tucholski et al., 2001). Da die tTG auch membranassoziiert ist und erst nach Stimulation ins Zytosol transloziert (Korner and Bachrach, 1987), ist sie als Bindungsprotein für TNCB eventuell am Beginn von Signaltransduktionskaskaden involviert.

NO löst eine Aktivierung des ERK1/2 MAP Kinase Signalwegs über die Aktivierung des Ras Cysteinrestes aus und mimikriert dadurch vermutlich den Ras-Exchange factor (Lander et al., 1995). Dies deutet auf eine Aktivierung des ERK1/2 MAP Kinase Signalwegs durch tTG hin, da NO auch die tTG über neun von 20 Cysteinresten binden kann (Melino et al., 1997). Lander et al. stellen heraus, dass G-Proteine wohl generelle Primärziele von NO sind (Lander, 1996). TNCB beeinflusst ebenfalls den ERK1/2 MAP Kinase Weg und so gibt es auch hier theoretisch Verbindungspunkte.

Antonyak et al. stellen einen Zusammenhang zwischen dem enzymatischen Bereich der tTG und der ERK-Phosphorylierung nach erfolgreicher Stimulation mit der Retinsäure (RA) her (Antonyak et al., 2002). Die Retinsäure wurde auch mit dem kleinen G-Protein Rac1 von Alsayed et al. in Verbindung gebracht (Alsayed et al., 2001; Kosa et al., 1995).

## **5.5 ERK1/2 MAP Kinase Phosphorylierung**

Zum weiteren Verständnis, ob die tTG tatsächlich in Signaltransduktionskaskaden involviert ist, die auch von anderen Allergenen wie z.B. MCI/MI oder Stimulatoren der tTG wie z.B. der Retinsäure und dem Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) aktiviert werden, wurde die ERK1/2 MAP Kinase Aktivierung biochemisch nachgewiesen. Über die ERK-Phosphorylierung wird von TNCB, RA und PMA der ERK-Weg aktiviert (Abb. 16).

Die Aktivierung von MAP Kinasen durch PMA wurde sowohl als Ras abhängig, wie auch als Ras unabhängig beschrieben: Für PC-12, eine Ratten-Zelllinie, Jurkat Zellen und Ratten-Myozyten wurde die ERK-Aktivierung durch PMA als Ras abhängig beschrieben. Doch in NIH3T3, COS-1 und 293 Zellen zeigt sich eine von Ras unabhängige MAPK-Aktivierung (Lee et al., 2002).

PMA ist als Substanz zur Aktivierung von Ras in humanen epidermalen Karzinom-Zellen A431 bekannt (Chen et al., 2002). Auch in Choriokarzinom Zellen wird durch

PMA eine ERK-Phosphorylierung ausgelöst (Suzuki et al., 2002). PMA wurde nun als Kontrolle für eine Monodansylcadaverin (MDC) unabhängige ERK-Phosphorylierung mitgeführt, da PMA in humanen DC Ras aktiviert (Valk et al., submitted).

Retinoide gehören zu den Polyisoprenoidlipidmolekülen und sind strukturell und funktionell mit dem Vitamin A verwandt. Die Retinsäure (RA) wird als potentieller Stimulator des enzymatischen Bereichs der tTG beschrieben (Antonyak et al., 2002; Chiocca et al., 1988; Zhang et al., 1995).

## 5.6 Aktivierung der tTG

Es konnte gezeigt werden, dass TNCB, PMA und RA die tTG Aktivität in DC induziert. Als Positivkontrolle für die Enzymaktivität der tTG wurde die RA verwendet, da sie die tTG in NIH3T3 Zellen aktiviert und zudem eine ERK-Phosphorylierung in den ersten 15 Minuten auslöst (Antonyak et al., 2002). Ein spezieller tTG Aktivitäts Assay zeigt, dass die tTG durch das Kontaktallergen TNCB und die Stimulatoren RA und PMA aktiviert wird.

Vorangegangene Studien verwendeten 5-(biotinamido)pentylamin um die Zellen zu markieren und die tTG-modifizierten Proteine zu visualisieren. Dazu wurden sie auf PVDF-Membran geblottet und mit einem HRP-konjugierten Streptavidin detektiert (Perry et al., 1995; Smethurst and Griffin, 1996; Zhang et al., 1998). Zur Western Blot Detektion wurde in dieser Arbeit ein HRP-konjugierter Biotin Antikörper verwendet.

Zhang et al. zeigen einen starken Anstieg der in situ tTG Aktivität nach einer kurzen Inkubationszeit von 20 Minuten mit Maitotoxin (MTX) in SH-SY5Y Zellen (Zhang et al., 1998). MTX gehört zu den Toxinen, die von Algen abgesondert werden. Mit MTX wurde der größte, nicht-oligomere Naturstoff aus einer marinen Mikroalge isoliert (rel. Molmasse 3422) (M. Murata, 1994) (Y. Kishi, 1998). Tiazofurin ist ebenso in der Lage die tTG Aktivität zu steigern (Zhang et al., 1998). Es blockiert die Inosin 5'-Phosphat Dehydrogenase und agiert als limitierender Faktor der Guanosin Triphosphat (GTP) Biosynthese (Tricot et al., 1990). Sowohl Maitotoxin als auch Tiazofurin stimulieren die Aktivität der tTG innerhalb einer sehr kurzen Expositionsphase.

Diese Studie zeigt, dass ein Kontaktallergen wie TNCB die Enzymaktivität der tTG stimuliert (Abb. 25). Eine Steigerung der tTG-Expression in diesem frühen Stadium

nach der Stimulation mit TNCB ist nach 10 Minuten nicht detektierbar. Dies wurde auch schon von Antonyak et al. beschrieben. Erst nach 48-72 Stunden wurde eine deutliche Expression nach RA-Stimulation nachgewiesen (Antonyak et al., 2002).

### 5.7 Inhibition der tTG

Der spezifische tTG Inhibitor MDC unterdrückte die tTG Aktivität und inhibierte unter anderem die Phosphorylierung von ERK1/2 MAP Kinase durch TNCB, PMA und RA dosisabhängig (Abb. 22 und Abb. 23). Im Speziellen wurde die Transamidierungsaktivität an der enzymatisch aktiven Stelle der tTG durch MDC inhibiert (Chandrashekar and Mehta, 2000) (Lee et al., 1993).

PMA wurde zur Darstellung der unabhängigen ERK-Aktivierung der tTG gewählt. PMA sollte ERK1/2 MAP Kinase über Ras aktivieren und damit von dem Inhibitor MDC unbeeinflusst bleiben. Dies ist in diesem Modell nicht der Fall (Abb. 23 und Abb. 24).

Zwei Wirkungsweisen sind denkbar. MDC hemmt die tTG nicht spezifisch und beeinflusst auch Enzyme oberhalb Ras oder Ras selbst. Eine weitere Möglichkeit besteht in der direkten Einflußnahme der tTG auf Ras, das die Weiterleitung von Signalen und die Phosphorylierung von ERK ermöglicht und durch MDC reduziert werden kann.

Eine Inhibition der Transamidase-Aktivität der tTG durch MDC nach der Stimulation mit RA wurde von Zhang et al. gezeigt (Zhang et al., 1998).

Zwei Ergebnisse belegen, dass die tTG nach Stimulation involviert ist :

- a) Die Transamidierungsaktivität der tTG ist vermutlich maßgeblich in die Aktivierung der ERK1/2 MAP Kinase nach Stimulation mit TNCB involviert, da dosisabhängig die ERK-Phosphorylierung durch MDC inhibiert wird und bei allen drei Stimulatoren ähnliche Effekte zu erkennen sind.
- b) Gleichzeitig zeigt sich durch den Aktivitäts Assay eher eine starke enzymatische Beteiligung ihrer Transamidasefunktion. Weitere Studien müssen nun zeigen, ob tTG eine intrinsische GTPase-Aktivität besitzt und ob GTP notwendig ist für die tTG, um als signalvermittelndes G-Protein ( $G_{\alpha h}$ ) zu fungieren, wenn die Zellen mit Allergenen wie TNCB inkubiert werden.

Interessant ist auch die Aufklärung weiterer kontaktallergenspezifischer Signalwege in vitro, z.B. der PI3K-Weg, der auch durch die RA beeinflusst wird und die Protein B

Kinase (AKT) aktiviert. AKT wird von RA zeitabhängig phosphoryliert, die Induktion ist koinzident mit der RA-vermittelten ERK-Aktivierung. Sie hat ihren maximalen Phosphorylierungsgrad nach 5 Minuten erreicht und fällt anschließend kontinuierlich innerhalb von 8 Stunden ab. Die AKT-Phosphorylierung dient als Nachweis der PI3K-Aktivität, da Proüberlebensfaktoren die AKT-Phosphorylierung in PI3K abhängiger Weise hochregulieren (Burgering and Coffey, 1995; Franke et al., 1995). Die Induktion der tTG-Expression und die Aktivierung der GTP-Bindungsaktivität nach 48-72 Stunden durch RA, war von der PI3K abhängig (Antonyak et al., 2002).

Zur Zeit ist nicht endgültig geklärt, wie die duale Funktion der tTG zusammenspielt. Lai et al. berichten, dass sowohl GTP als auch GDP die Transamidierungsfunktion der tTG hemmen können. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung von GTP kein spezifischer Regulator der Transamidierung ist, eventuell aber diese Funktion beeinflusst (Lai et al., 1996). Antonyak et al. präsentieren Daten, die zeigen, dass der PI3K-Inhibitor LY294002 und MDC zusammen den anti-Apoptose Effekt der tTG beeinflussen, wenn NIH3T3 Zellen mit RA stimuliert werden. Der inhibitorische Effekt der tTG auf die Apoptose wird so unterbrochen (Antonyak et al., 2002).

Auf der anderen Seite zeigen Chen et al., dass die Rezeptorsignalfunktion von  $G_{\beta}$  unabhängig von der Transglutaminase-Kreuzvernetzungsaktivität ist (Chen et al., 2002). Versuche zur tTG-Inhibition mit Cystamin (Birckbichler et al., 1981) (Siefing et al., 1978) und Histamin zeigen, dass auch der gleichzeitige Einsatz von Inhibitoren wie MDC und Cystamin eine starke Inhibition der tTG Aktivität ermöglichen (Ou et al., 2000).

Insgesamt erschließen die vorliegenden Grundlagenuntersuchungen neue Ansatzpunkte zum Verständnis des Wirkungsmechanismus starker Kontaktallergene und ihrer Fähigkeit an freie Thiolgruppen zu binden.

Die Darstellungen zur Inhibition von Thiol-Bindungsstellen ermöglichen einen weiteren Aufschluß des Reaktionsmusters von Allergenen und Aktivatoren. Der gezielte Einsatz von Inhibitoren für einzelne Kinasen ermöglicht Aussagen zu ihrer Beteiligung innerhalb der Signalkaskaden.

## 6 Zusammenfassung

Über die Signaltransduktion in Langerhanszellen, den antigenpräsentierenden Zellen der Epidermis, ist bisher nur wenig bekannt. Mit ein Grund dafür ist die schlechte Verfügbarkeit reiner Langerhanszellen aufgrund ihrer geringen Zahl und der schwierigen Präparation, die häufig schon zur Voraktivierung dieser Zellen führt. Humane unreife und reife dendritische Zellen erwiesen sich als geeignete Modellzellpopulation für kutane antigenpräsentierende Zellen. Mit Hilfe dieser Modellzellen wurde die Beteiligung von zentralen Signaltransduktionswegen nach Interaktion mit dem Kontaktallergen TNCB untersucht.

1. Zum ersten Mal wird gezeigt, dass TNCB in den ersten 10 Minuten nach der Haptenisierung bei dendritischen Zellen intrazellulär lokalisiert ist. Die Stimulation von DC mit dem starken Kontaktallergen TNCB führte zu einer Aktivierung der ERK1/2 MAP Kinase. Dieses Ergebnis entspricht der Vorstellung, dass starke Kontaktallergene in subtoxischen Konzentrationen zellulären Streß bei MAP Kinasen auslösen und somit zu einer für die Kontaktallergie typischen Antigenpräsentation führen.
2. Die Tyrosinphosphorylierung wurde bereits in vorausgegangenen Arbeiten (Kuhn, 1998; Brand, 2002) als Charakteristikum für haptensbehandelte Monozyten und humane dendritische Zellen herausgestellt. Diese Ergebnisse konnten mit humanen unreifen und reifen DC weitergeführt werden. Proteinbiochemisch ergab das Kontaktallergen TNCB ein spezifisches und reproduzierbares Muster hyperphosphorylierter Proteinbanden. Der gemessene Anstieg an Phosphotyrosin beruhte auf der gesteigerten Aktivität von Protein Tyrosin-Kinasen.
3. In weiteren Untersuchungen wurden Proteine massenspektrometrisch analysiert, die tyrosinphosphoryliert waren und gleichzeitig TNCB gebunden hatten. Es wurden drei Proteine identifiziert: Gewebstransglutaminase bei 74-80kD, Thyroidhormon Bindeprotein bei 58kD und Aktin bei 38kD. Nach Literaturrecherchen war die Transglutaminase am vielversprechendsten und wurde auf ihre Aktivität innerhalb der Kontaktallergen-induzierten Signaltransduktionskaskade hin untersucht. Drei strukturell verschiedene Stoffe, das Kontaktallergen TNCB, die Retinsäure (RA) und ein Phorbol ester (PMA)

induzierten eine starke, proteinbiochemisch meßbare Tyrosinphosphorylierung der ERK1/2 MAP Kinase. Aus der Literatur war die RA für eine Aktivierung der tTG bekannt (Antonyak et al., 2002) und PMA als Stimulator der ERK1/2 MAP Kinase (Chen et al., 2002; Lee et al., 2002) - aus diesem Grund wurden sie als Positivkontrolle mitgeführt.

4. Mittels Immunpräzipitation wurde der Nachweis, dass TNCB an die tTG bindet, erbracht. Dies war der erste Indikator für eine Bedeutung der tTG als Zielstruktur für ein Kontaktallergen.
5. TNCB, RA und PMA lösen eine gesteigerte Transamidierungsaktivität der tTG aus, die essentiell zur Induktion der ERK-Phosphorylierung ist. Dies wurde durch einen Transamidierungs Aktivitäts Assay bestimmt (Zhang et al., 1998), einem Nachweis der tTG Aktivität mittels Inkorporation von biotinylierten Polyaminen in lokale Proteine.
6. Sowohl die tTG Aktivität als auch die ERK-Phosphorylierung nach TNCB Stimulation konnten durch den spezifischen Inhibitor der Transamidierungsaktivität der tTG MDC gehemmt werden. Dies war ein zweiter Hinweis, dass die enzymatische Aktivität der tTG eine große Rolle spielt. Das gleichzeitige Ausbleiben der Transamidierung und der ERK-Phosphorylierung deutet auf den deutlichen Einfluß der tTG auf den Signaltransduktionsweg der ERK1/2 MAP Kinase hin.

Analysen mit anderen starken Kontaktallergenen, wie z.B. Thiomersal und Chlormethylisothiazolon/ Methylisothiazolon bieten zukünftige Forschungsansätze zur weiteren Charakterisierung der funktionellen Bedeutung der tTG und des ERK-Weges. Interessant wären auch Untersuchungen zur Hochregulation der tTG-Expression in DC von 24-72 Stunden nach einer Inkubation mit TNCB, RA und PMA. Auch sind weitere Untersuchungen zur Signaltransduktionskaskade im Hinblick auf die erforderlichen, nachgeschalteten Elemente interessant, wie z.B. der von der tTG aktivierten Protein B Kinase AKT (Antonyak et al., 2002) sowie beteiligter Kinasen des ERK-Weges.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	anti
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AKT-1	Protein B Kinase
APC	antigenpräsentierende Zellen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF	„activating transcription factor“
ATP	Adenosintriphosphat
B <sub>0</sub>	Nullstandard
BAC	Benzalkoniumchlorid
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	"cluster of differentiation"
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DAG	Diacylglycerin
DC	„dendritic cells“
DMSO	Dimethylsulphoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNCB	1-Chlor-2,4, Dinitrobenzol
DNFB	2, 4 Dinitrofluorbenzol
DNTB	2, 4 Dinitrothiocyanobenzol
DTAF	Dichlorotriazinylamino-Fluorescein
EC	„epidermal cells“
ECL	"enhanced chemiluminescence“
ELISA	"enzyme linked immunosorbent assay"
ERK	"extracellular signal regulated kinase"
FACS	"fluorescence activated cell sorter"
FCS	"fetal calf serum"
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat

---

FSC	"forward scatter"
g	Erdbeschleunigung
GDP	Guanosindiphosphat
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
HLA	"human leucocyte antigen", humaner MHC
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
JNK	"cJun N-terminal kinase"
kD	kilo Dalton
KÜ	Kulturüberstand
LPS	Lipopolysaccharid
LC	Langerhanszellen
MAPK	"mitogen activated protein kinase"
MCI/MI	Chlormethylisothiazolon/Methylisothiazolon
MHC	"major histocompatibility complex"
mRNA	„messenger“ Ribonucleinsäure
NAC	N-acetylcystein
NEM	N-Ethylmaleimide
NHM	N-Hydroxymaleimide
NiSO <sub>4</sub>	Nickelsulfat
NO	Nitroxid, Stickstoffmonoxid
NF	"nuclear factor"
NF-κ-B	"nuclear factor" kappa-B
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBMC	"peripheral blood mononuclear cells"
PBS	„phosphate buffered saline“
PDTC	Pyrraline Dithiocarbamate

---

PE	R-Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
p-	phospho-
PI	Propidiumiodid
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PTK	Protein Tyrosin-Kinase
p-tyr	Phosphotyrosin
PVDF	Polyvenylidendifluorid
RA	Retinsäure
RT	Raumtemperatur
RTK	RezeptorTyrosin-Kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SH	"Src-homology"
SH2,-3	„Src-homology domain“
SSC	"side scatter"
STAT	"signal transducer and activator of transcription"
TBS	"Tris buffered saline"
T <sub>H</sub>	T-Helferzellen
Thr	Threonin
tTG	Gewebstransglutaminase
TNCB	2, 4, 6 Trinitrochlorbenzol
TNP	Trinitrophenyl
TNF	Tumor Nekrosefaktor
TPBS	"Tris buffered saline" plus Tween
Tyr	Tyrosin
UV	ultraviolett

## 8 Literaturverzeichnis

- Achyuthan, K.E. and Greenberg, C.S. (1987) Identification of a guanosine triphosphate-binding site on guinea pig liver transglutaminase. Role of GTP and calcium ions in modulating activity. *J Biol Chem*, **262**, 1901-1906.
- Aeschlimann, D., Kaupp, O. and Paulsson, M. (1995) Transglutaminase-catalyzed matrix cross-linking in differentiating cartilage: identification of osteonectin as a major glutaminyl substrate. *J Cell Biol*, **129**, 881-892.
- Aeschlimann, D., Wetterwald, A., Fleisch, H. and Paulsson, M. (1993) Expression of tissue transglutaminase in skeletal tissues correlates with events of terminal differentiation of chondrocytes. *J Cell Biol*, **120**, 1461-1470.
- Aguirre Martin-Falero, A., Calderon Gutierrez, M.J. and Diaz-Perez, J.L. (1990) Contact allergy to the preservative Kathon CG. *Contact Dermatitis*, **22**, 185.
- Alsayed, Y., Uddin, S., Mahmud, N., Lekmine, F., Kalvakolanu, D.V., Minucci, S., Bokoch, G. and Platanius, L.C. (2001) Activation of Rac1 and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in response to all-trans-retinoic acid. *J Biol Chem*, **276**, 4012-4019.
- Antonyak, M.A., Boehm, J.E. and Cerione, R.A. (2002) Phosphoinositide 3-kinase activity is required for retinoic acid-induced expression and activation of the tissue transglutaminase. *J Biol Chem*, **277**, 14712-14716.
- Antonyak, M.A., Singh, U.S., Lee, D.A., Boehm, J.E., Combs, C., Zgola, M.M., Page, R.L. and Cerione, R.A. (2001) Effects of tissue transglutaminase on retinoic acid-induced cellular differentiation and protection against apoptosis. *J Biol Chem*, **276**, 33582-33587.
- Arrighi, J.F., Rebsamen, M., Rousset, F., Kindler, V. and Hauser, C. (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.
- Ballotti, R., Lammers, R., Scimeca, J.C., Dull, T., Schlessinger, J., Ullrich, A. and Van Obberghen, E. (1989) Intermolecular transphosphorylation between insulin receptors and EGF-insulin receptor chimeras. *Embo J*, **8**, 3303-3309.
- Bansal, V.S. and Majerus, P.W. (1990) Phosphatidylinositol-derived precursors and signals. *Annu Rev Cell Biol*, **6**, 41-67.
- Basketter, D., Dooms-Goossens, A., Karlberg, A.T. and Lepoittevin, J.P. (1995) The chemistry of contact allergy: why is a molecule allergenic? *Contact Dermatitis*, **32**, 65-73.
- Becker, D. (2002) Coupling of contact sensitizers to thiol groups is a key event for the activation of antigen-presenting cells. *JID*.
- Berridge, M.J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, **361**, 315-325.
- Bertrand, F., Basketter, D.A., Roberts, D.W. and Lepoittevin, J.P. (1997) Skin sensitization to eugenol and isoeugenol in mice: possible metabolic pathways involving ortho-quinone and quinone methide intermediates. *Chem Res Toxicol*, **10**, 335-343.
- Birckbichler, P.J., Orr, G.R., Patterson, M.K., Jr., Conway, E. and Carter, H.A. (1981) Increase in proliferative markers after inhibition of transglutaminase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 5005-5008.
- Birnbaumer, L. (1992) Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for beta gamma dimers as well as alpha subunits. *Cell*, **71**, 1069-1072.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. and McCormick, F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, **349**, 117-127.
- Brabek, J., Mojzita, D., Novotny, M., Puta, F. and Folk, P. (2002) The SH3 domain of Src can downregulate its kinase activity in the absence of the SH2 domain-pY527 interaction. *Biochem Biophys Res Commun*, **296**, 664-670.
- Buday, L., Egan, S.E., Rodriguez Viciano, P., Cantrell, D.A. and Downward, J. (1994) A complex of Grb2 adaptor protein, Sos exchange factor, and a 36-kDa membrane-bound tyrosine phosphoprotein is implicated in ras activation in T cells. *J Biol Chem*, **269**, 9019-9023.
- Burgering, B.M. and Coffey, P.J. (1995) Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*, **376**, 599-602.
- Burnham, K., Pickard, S., Hudson, J. and Voss, T. (1993) Requirements for Langerhans' cell depletion following in vitro exposure of murine skin to ultraviolet-B. *Immunology*, **79**, 627-632.
- Bushfield, M., Griffiths, S.L., Murphy, G.J., Pyne, N.J., Knowler, J.T., Milligan, G., Parker, P.J., Mollner, S. and Houslay, M.D. (1990) Diabetes-induced alterations in the expression, functioning and phosphorylation state of the inhibitory guanine nucleotide regulatory protein Gi-2 in hepatocytes. *Biochem J*, **271**, 365-372.

- Calautti, E., Missero, C., Stein, P.L., Ezzell, R.M. and Dotto, G.P. (1995) *fyn* tyrosine kinase is involved in keratinocyte differentiation control. *Genes Dev*, **9**, 2279-2291.
- Chandrashekar, R. and Mehta, K. (2000) Transglutaminase-catalyzed reactions in the growth, maturation and development of parasitic nematodes. *Parasitol Today*, **16**, 11-17.
- Chen, B.K., Tsai, T.Y., Huang, H.S., Chen, L.C., Chang, W.C. and Tsai, S.B. (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.
- Cher, D.J. and Mosmann, T.R. (1987) Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J Immunol*, **138**, 3688-3694.
- Chiocca, E.A., Davies, P.J. and Stein, J.P. (1988) The molecular basis of retinoic acid action. Transcriptional regulation of tissue transglutaminase gene expression in macrophages. *J Biol Chem*, **263**, 11584-11589.
- Coombs, R.R.A.a.P.G.H.G. (1963) The classification of allergic reactions underlying disease. *Clinical Aspects of Immunology*, **317**.
- Davies, P.J., Davies, D.R., Levitzki, A., Maxfield, F.R., Milhaud, P., Willingham, M.C. and Pastan, I.H. (1980) Transglutaminase is essential in receptor-mediated endocytosis of alpha 2-macroglobulin and polypeptide hormones. *Nature*, **283**, 162-167.
- de Groot, A.C. and Herxheimer, A. (1989) Isothiazolinone preservative: cause of a continuing epidemic of cosmetic dermatitis. *Lancet*, **1**, 314-316.
- De Laurenzi, V. and Melino, G. (2001) Gene disruption of tissue transglutaminase. *Mol Cell Biol*, **21**, 148-155.
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. and Davis, R.J. (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*, **76**, 1025-1037.
- Eligula, L., Chuang, L., Phillips, M.L., Motoki, M., Seguro, K. and Muhlrad, A. (1998) Transglutaminase-induced cross-linking between subdomain 2 of G-actin and the 636-642 lysine-rich loop of myosin subfragment 1. *Biophys J*, **74**, 953-963.
- Enk, A.H., Angeloni, V.L., Udey, M.C. and Katz, S.I. (1993) An essential role for Langerhans cell-derived IL-1 beta in the initiation of primary immune responses in skin. *J Immunol*, **150**, 3698-3704.
- Enk, A.H. and Katz, S.I. (1992) Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 1398-1402.
- Folk, J.E. (1980) Transglutaminases. *Annu Rev Biochem*, **49**, 517-531.
- Fong, T.A. and Mosmann, T.R. (1989) The role of IFN-gamma in delayed-type hypersensitivity mediated by Th1 clones. *J Immunol*, **143**, 2887-2893.
- Franke, R.R., Sakmar, T.P., Graham, R.M. and Khorana, H.G. (1992) Structure and function in rhodopsin. Studies of the interaction between the rhodopsin cytoplasmic domain and transducin. *J Biol Chem*, **267**, 14767-14774.
- Franke, T.F., Yang, S.I., Chan, T.O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D.K., Kaplan, D.R. and Tschlis, P.N. (1995) The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell*, **81**, 727-736.
- Frosch, P.J. (1995) Cutaneous Irritation. in: *Textbook of Contact Dermatitis*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag, ed.: **Rycroft R.J.G., Menné, T., Frosch P.J.**, 28-56.
- Frosch, P.J., Rustemeyer, T. and Schnuch, A. (1996a) [Contact dermatitis. I]. *Hautarzt*, **47**, 874-882.
- Frosch, P.J., Rustemeyer, T. and Schnuch, A. (1996b) [Contact dermatitis. II]. *Hautarzt*, **47**, 945-961; quiz 958-960.
- Galcheva-Gargova, Z., Derijard, B., Wu, I.H. and Davis, R.J. (1994) An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science*, **265**, 806-808.
- Giguere, V., Yang, N., Segui, P. and Evans, R.M. (1988) Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature*, **331**, 91-94.
- Gocinski, B.L. and Tigelaar, R.E. (1990) Roles of CD4+ and CD8+ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. *J Immunol*, **144**, 4121-4128.
- Gonzalez, F.A., Raden, D.L. and Davis, R.J. (1991) Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *J Biol Chem*, **266**, 22159-22163.
- Gudermann, T., Grosse, R. and Schultz, G. (2000) Contribution of receptor/G protein signaling to cell growth and transformation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **361**, 345-362.
- Gutkind, J.S. (2000) Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Sci STKE*, **2000**, RE1.
- Guyton, K.Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q. and Holbrook, N.J. (1996) Activation of mitogen-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem*, **271**, 4138-4142.

- Haas, J., Lipkow, T., Mohamadzadeh, M., Kolde, G. and Knop, J. (1992) Induction of inflammatory cytokines in murine keratinocytes upon in vivo stimulation with contact sensitizers and tolerizing analogues. *Exp Dermatol*, **1**, 76-83.
- Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L. and Ulevitch, R.J. (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, **265**, 808-811.
- Heufler, C., Koch, F. and Schuler, G. (1988) Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med*, **167**, 700-705.
- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A. and Karin, M. (1993) Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev*, **7**, 2135-2148.
- Hunger, R.E., Yawalkar, N., Braathen, L.R. and Brand, C.U. (2001) CD1a-positive dendritic cells transport the antigen DNCB intracellularly from the skin to the regional lymph nodes in the induction phase of allergic contact dermatitis. *Arch Dermatol Res*, **293**, 420-426.
- Huot, J., Houle, F., Marceau, F. and Landry, J. (1997) Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ Res*, **80**, 383-392.
- Ikarashi, Y., Momma, J., Tsuchiya, T. and Nakamura, A. (1996) Evaluation of skin sensitization potential of nickel, chromium, titanium and zirconium salts using guinea-pigs and mice. *Biomaterials*, **17**, 2103-2108.
- Izquierdo, M., Leever, S.J., Marshall, C.J. and Cantrell, D. (1993) p21ras couples the T cell antigen receptor to extracellular signal-regulated kinase 2 in T lymphocytes. *J Exp Med*, **178**, 1199-1208.
- Jakob, T. and Udey, M.C. (1998) Regulation of E-cadherin-mediated adhesion in Langerhans cell-like dendritic cells by inflammatory mediators that mobilize Langerhans cells in vivo. *J Immunol*, **160**, 4067-4073.
- Janeway, T. (2001) Immunobiology. *Garland Publishing, 29 West 35th Street, New York, NY 10001-2299*.
- Jewell, C., Heylings, J., Clowes, H.M. and Williams, F.M. (2000) Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. *Arch Toxicol*, **74**, 356-365.
- Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J. and Enk, A.H. (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.
- Kallunki, T., Su, B., Tsigelny, I., Sluss, H.K., Derijard, B., Moore, G., Davis, R. and Karin, M. (1994) JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev*, **8**, 2996-3007.
- Kampgen, E., Koch, N., Koch, F., Stoger, P., Heufler, C., Schuler, G. and Romani, N. (1991) Class II major histocompatibility complex molecules of murine dendritic cells: synthesis, sialylation of invariant chain, and antigen processing capacity are down-regulated upon culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3014-3018.
- Kharitonov, A., Chen, Z., Sures, I., Wang, H., Schilling, J. and Ullrich, A. (1997) A family of proteins that inhibit signalling through tyrosine kinase receptors. *Nature*, **386**, 181-186.
- Kimber, I. and Cumberbatch, M. (1992a) Dendritic cells and cutaneous immune responses to chemical allergens. *Toxicol Appl Pharmacol*, **117**, 137-146.
- Kimber, I. and Cumberbatch, M. (1992b) Stimulation of Langerhans cell migration by tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha). *J Invest Dermatol*, **99**, 48S-50S.
- Kobayashi, Y. (1997) Langerhans' cells produce type IV collagenase (MMP-9) following epicutaneous stimulation with haptens. *Immunology*, **90**, 496-501.
- Kolde, G. and Knop, J. (1988) Ultrastructural localization of 2,4-dinitrophenyl groups in mouse epidermis following skin painting with 2,4-dinitrofluorobenzene and 2,4-dinitrothiocyanatebenzene: an immunoelectron microscopical study. *J Invest Dermatol*, **90**, 320-324.
- Korner, G. and Bachrach, U. (1987) Intracellular distribution of active and inactive transglutaminase in stimulated cultured C6 glioma cells. *J Cell Physiol*, **130**, 44-50.
- Kosa, K., Jones, C.S. and De Luca, L.M. (1995) The H-ras oncogene interferes with retinoic acid signaling and metabolism in NIH3T3 cells. *Cancer Res*, **55**, 4850-4854.
- Kripke, M.L., Munn, C.G., Jeevan, A., Tang, J.M. and Bucana, C. (1990) Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J Immunol*, **145**, 2833-2838.
- Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E.A., Ahmad, M.F., Avruch, J. and Woodgett, J.R. (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*, **369**, 156-160.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

- Lai, T.S., Slaughter, T.F., Koropchak, C.M., Haroon, Z.A. and Greenberg, C.S. (1996) C-terminal deletion of human tissue transglutaminase enhances magnesium-dependent GTP/ATPase activity. *J Biol Chem*, **271**, 31191-31195.
- Lander, H.M. (1996) Cellular Activation Mediated by Nitric Oxide. *Methods*, **10**, 15-20.
- Lander, H.M., Hajjar, D.P., Hempstead, B.L., Mirza, U.A., Chait, B.T., Campbell, S. and Quilliam, L.A. (1997) A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction. *J Biol Chem*, **272**, 4323-4326.
- Lander, H.M., Ogiste, J.S., Pearce, S.F., Levi, R. and Novogrodsky, A. (1995) Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras. *J Biol Chem*, **270**, 7017-7020.
- Landsteiner, K.a.J., J. (1936) Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *J. Exp. Med.*, **64**.
- Larsen, C.P., Steinman, R.M., Witmer-Pack, M., Hankins, D.F., Morris, P.J. and Austyn, J.M. (1990) Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med*, **172**, 1483-1493.
- Lee, H.W., Ahn, D.H., Crawley, S.C., Li, J.D., Gum, J.R., Basbaum, C.B., Fan, N.Q., Symkowski, D.E., Han, S.Y., Lee, B.H., Sleisenger, M.H. and Kim, Y.S. (2002) Phorbol 12-myristate 13-acetate up-regulates the transcription of MUC2 intestinal mucin via Ras, ERK and NF-kappa B. *J Biol Chem*, **20**, 20.
- Lee, K.N., Arnold, S.A., Birckbichler, P.J., Patterson, M.K., Jr., Fraij, B.M., Takeuchi, Y. and Carter, H.A. (1993) Site-directed mutagenesis of human tissue transglutaminase: Cys-277 is essential for transglutaminase activity but not for GTPase activity. *Biochim Biophys Acta*, **1202**, 1-6.
- Lesort, M., Tucholski, J., Miller, M.L. and Johnson, G.V. (2000) Tissue transglutaminase: a possible role in neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol*, **61**, 439-463.
- Lin, L.L., Wartmann, M., Lin, A.Y., Knopf, J.L., Seth, A. and Davis, R.J. (1993) cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell*, **72**, 269-278.
- Lin, T.H., Rosales, C., Mondal, K., Bolen, J.B., Haskill, S. and Juliano, R.L. (1995) Integrin-mediated tyrosine phosphorylation and cytokine message induction in monocytic cells. A possible signaling role for the Syk tyrosine kinase. *J Biol Chem*, **270**, 16189-16197.
- Lisby, S., Muller, K.M., Jongeneel, C.V., Saurat, J.H. and Hauser, C. (1995) Nickel and skin irritants up-regulate tumor necrosis factor-alpha mRNA in keratinocytes by different but potentially synergistic mechanisms. *Int Immunol*, **7**, 343-352.
- Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D. and Schlessinger, J. (1992) The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*, **70**, 431-442.
- Lu, S., Saydak, M., Gentile, V., Stein, J.P. and Davies, P.J. (1995) Isolation and characterization of the human tissue transglutaminase gene promoter. *J Biol Chem*, **270**, 9748-9756.
- M. Murata, N.H., S. Matsunaga, M. Satake, T. Yasumoto, J. (1994), **116**, 7098-7107.
- Macatonia, S.E., Edwards, A.J. and Knight, S.C. (1986) Dendritic cells and the initiation of contact sensitivity to fluorescein isothiocyanate. *Immunology*, **59**, 509-514.
- Macatonia, S.E., Knight, S.C., Edwards, A.J., Griffiths, S. and Fryer, P. (1987) Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *J Exp Med*, **166**, 1654-1667.
- Male, D. (1993) Hypersensitivity-Type II. Hypersensitivity-Type III. In *Immunology*, 3rd ed. **I. Roitt, J. Brostoff and D. Male, eds. Mosby, London, p.20.1.**
- Marais, R., Wynne, J. and Treisman, R. (1993) The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell*, **73**, 381-393.
- Martin, S. (2001) published abstract. *Arch Derm Res*, **293**.
- Melino, G., Bernassola, F., Knight, R.A., Corasaniti, M.T., Nistico, G. and Finazzi-Agro, A. (1997) S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature*, **388**, 432-433.
- Mian, S., el Alaoui, S., Lawry, J., Gentile, V., Davies, P.J. and Griffin, M. (1995) The importance of the GTP-binding protein tissue transglutaminase in the regulation of cell cycle progression. *FEBS Lett*, **370**, 27-31.
- Milon, G., Marchal, G., Seman, M. and Truffa-Bachi, P. (1981) A delayed-type hypersensitivity reaction initiated by a single T lymphocyte. *Agents Actions*, **11**, 612-614.
- Miyajima, A., Hara, T. and Kitamura, T. (1992) Common subunits of cytokine receptors and the functional redundancy of cytokines. *Trends Biochem Sci*, **17**, 378-382.
- Murtaugh, M.P., Arend, W.P. and Davies, P.J. (1984) Induction of tissue transglutaminase in human peripheral blood monocytes. *J Exp Med*, **159**, 114-125.
- Mustelin, T. and Burn, P. (1993) Regulation of src family tyrosine kinases in lymphocytes. *Trends Biochem Sci*, **18**, 215-220.

- Nagai, K., Takata, M., Yamamura, H. and Kurosaki, T. (1995) Tyrosine phosphorylation of Shc is mediated through Lyn and Syk in B cell receptor signaling. *J Biol Chem*, **270**, 6824-6829.
- Nakaoka, H., Perez, D.M., Baek, K.J., Das, T., Husain, A., Misono, K., Im, M.J. and Graham, R.M. (1994) Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function. *Science*, **264**, 1593-1596.
- Neisius, U., Brand, P., Plochmann, S., Saloga, J., Knop, J. and Becker, D. (1999) Detection of increased tyrosine phosphorylation in murine Langerhans cells after stimulation with contact sensitizers. *Arch Dermatol Res*, **291**, 22-27.
- Nemes, Z., Jr., Adany, R., Balazs, M., Boross, P. and Fesus, L. (1997) Identification of cytoplasmic actin as an abundant glutaminy substrate for tissue transglutaminase in HL-60 and U937 cells undergoing apoptosis. *J Biol Chem*, **272**, 20577-20583.
- Oka, D., Nakagawa, S., Oota, T. and Ueki, H. (1986) Distribution of 2,4-dinitrophenyl groups on the epidermal Langerhans cells of guinea pigs following skin painting with 2,4-dinitrochlorobenzene. *Dermatologica*, **172**, 12-17.
- Oliverio, S., Amendola, A., Di Sano, F., Farrace, M.G., Fesus, L., Nemes, Z., Piredda, L., Spinedi, A. and Piacentini, M. (1997) Tissue transglutaminase-dependent posttranslational modification of the retinoblastoma gene product in promonocytic cells undergoing apoptosis. *Mol Cell Biol*, **17**, 6040-6048.
- Ou, H., Haendeler, J., Aebly, M.R., Kelly, L.A., Cholewa, B.C., Koike, G., Kwitek-Black, A., Jacob, H.J., Berk, B.C. and Miano, J.M. (2000) Retinoic acid-induced tissue transglutaminase and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, **87**, 881-887.
- Pahan, K., Sheikh, F.G., Namboodiri, A.M. and Singh, I. (1998) N-acetyl cysteine inhibits induction of NO production by endotoxin or cytokine stimulated rat peritoneal macrophages, C6 glial cells and astrocytes. *Free Radic Biol Med*, **24**, 39-48.
- Pawson, T. (1997) New impressions of Src and Hck. *Nature*, **385**, 582-583, 585.
- Perry, M.J., Mahoney, S.A. and Haynes, L.W. (1995) Transglutaminase C in cerebellar granule neurons: regulation and localization of substrate cross-linking. *Neuroscience*, **65**, 1063-1076.
- Pfahl, M., Apfel, R., Bendik, I., Fanjul, A., Graupner, G., Lee, M.O., La-Vista, N., Lu, X.P., Piedrafita, J., Ortiz, M.A. and et al. (1994) Nuclear retinoid receptors and their mechanism of action. *Vitam Horm*, **49**, 327-382.
- Piacentini, M., Fesus, L., Farrace, M.G., Ghibelli, L., Piredda, L. and Melino, G. (1991) The expression of "tissue" transglutaminase in two human cancer cell lines is related with the programmed cell death (apoptosis). *Eur J Cell Biol*, **54**, 246-254.
- Plaut, M., Pierce, J.H., Watson, C.J., Hanley-Hyde, J., Nordan, R.P. and Paul, W.E. (1989) Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. *Nature*, **339**, 64-67.
- Price, A.A., Cumberbatch, M., Kimber, I. and Ager, A. (1997) Alpha 6 integrins are required for Langerhans cell migration from the epidermis. *J Exp Med*, **186**, 1725-1735.
- Pure, E., Inaba, K., Crowley, M.T., Tardelli, L., Witmer-Pack, M.D., Ruberti, G., Fathman, G. and Steinman, R.M. (1990) Antigen processing by epidermal Langerhans cells correlates with the level of biosynthesis of major histocompatibility complex class II molecules and expression of invariant chain. *J Exp Med*, **172**, 1459-1469.
- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J. and Davis, R.J. (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.
- Raingeaud, J., Whitmarsh, A.J., Barrett, T., Derijard, B. and Davis, R.J. (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.
- Renart, J., Reiser, J. and Stark, G.R. (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 U S A*, **76**, 3116-3120.
- Ridley, S.H., Sarsfield, S.J., Lee, J.C., Bigg, H.F., Cawston, T.E., Taylor, D.J., DeWitt, D.L. and Saklatvala, J. (1997) Actions of IL-1 are selectively controlled by p38 mitogen-activated protein kinase: regulation of prostaglandin H synthase-2, metalloproteinases, and IL-6 at different levels. *J Immunol*, **158**, 3165-3173.
- Rizova, H., Carayon, P., Barbier, A., Lacheretz, F., Dubertret, L. and Michel, L. (1999) Contact allergens, but not irritants, alter receptor-mediated endocytosis by human epidermal Langerhans cells. *Br J Dermatol*, **140**, 200-209.

- Roberts, D.W., Goodwin, B.F., Williams, D.L., Jones, K., Johnson, A.W. and Alderson, J.C. (1983) Correlations between skin sensitization potential and chemical reactivity for p-nitrobenzyl compounds. *Food Chem Toxicol*, **21**, 811-813.
- Robinson, M.J. and Cobb, M.H. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 180-186.
- Rodbell, M. (1980) The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature*, **284**, 17-22.
- Romani, N., Koide, S., Crowley, M., Witmer-Pack, M., Livingstone, A.M., Fathman, C.G., Inaba, K. and Steinman, R.M. (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.
- Romani, N., Lenz, A., Glassel, H., Stossel, H., Stanzl, U., Majdic, O., Fritsch, P. and Schuler, G. (1989b) Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J Invest Dermatol*, **93**, 600-609.
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T. and Nebreda, A.R. (1994) A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*, **78**, 1027-1037.
- Savolainen, H. (1996) Biochemical and clinical aspects of nickel toxicity. *Rev Environ Health*, **11**, 167-173.
- Schafer, T., Enders, F. and Przybilla, B. (1995) Sensitization to thimerosal and previous vaccination. *Contact Dermatitis*, **32**, 114-116.
- Scherle, P.A., Jones, E.A., Favata, M.F., Daulerio, A.J., Covington, M.B., Nurnberg, S.A., Magolda, R.L. and Trzaskos, J.M. (1998) Inhibition of MAP kinase kinase prevents cytokine and prostaglandin E2 production in lipopolysaccharide-stimulated monocytes. *J Immunol*, **161**, 5681-5686.
- Schlaepfer, D.D., Jones, K.C. and Hunter, T. (1998) Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events. *Mol Cell Biol*, **18**, 2571-2585.
- Schmid-Alliana, A., Menou, L., Manie, S., Schmid-Antomarchi, H., Millet, M.A., Giuriato, S., Ferrua, B. and Rossi, B. (1998) Microtubule integrity regulates src-like and extracellular signal-regulated kinase activities in human pro-monocytic cells. Importance for interleukin-1 production. *J Biol Chem*, **273**, 3394-3400.
- Schuler, G., Romani, N. and Steinman, R.M. (1985) A comparison of murine epidermal Langerhans cells with spleen dendritic cells. *J Invest Dermatol*, **85**, 99s-106s.
- Schulz, K.-H., Fuchs, T. (1988) *Der Epikutantest*. in: *Manuale allergologicum*. ed.: Fuchs, E. u. Schulz, K.-H., Deisenhofen, D. u. S. Verlag. **IV 4**, 1-24.
- Schwartz, L.B., Bradford, T.R., Irani, A.M., Deblois, G. and Craig, S.S. (1987) The major enzymes of human mast cell secretory granules. *Am Rev Respir Dis*, **135**, 1186-1189.
- Sen, C.K. (2000) Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr Top Cell Regul*, **36**, 1-30.
- Senaldi, G., Pointaire, P., Piguat, P.F. and Grau, G.E. (1994) Protective effect of N-acetylcysteine in hapten-induced irritant and contact hypersensitivity reactions. *J Invest Dermatol*, **102**, 934-937.
- Shelley, W.B. and Juhlin, L. (1977) Selective uptake of contact allergens by the Langerhans cell. *Arch Dermatol*, **113**, 187-192.
- Sicheri, F., Moarefi, I. and Kuriyan, J. (1997) Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature*, **385**, 602-609.
- Siefring, G.E., Jr., Apostol, A.B., Velasco, P.T. and Lorand, L. (1978) Enzymatic basis for the Ca<sup>2+</sup>-induced cross-linking of membrane proteins in intact human erythrocytes. *Biochemistry*, **17**, 2598-2604.
- Silvennoinen, O., Nishigaki, H., Kitanaka, A., Kumagai, M., Ito, C., Malavasi, F., Lin, Q., Conley, M.E. and Campana, D. (1996) CD38 signal transduction in human B cell precursors. Rapid induction of tyrosine phosphorylation, activation of syk tyrosine kinase, and phosphorylation of phospholipase C-gamma and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol*, **156**, 100-107.
- Singh, U.S., Erickson, J.W. and Cerione, R.A. (1995) Identification and biochemical characterization of an 80 kilodalton GTP-binding/transglutaminase from rabbit liver nuclei. *Biochemistry*, **34**, 15863-15871.
- Smethurst, P.A. and Griffin, M. (1996) Measurement of tissue transglutaminase activity in a permeabilized cell system: its regulation by Ca<sup>2+</sup> and nucleotides. *Biochem J*, **313**, 803-808.
- Sporn, M.B. and Roberts, A.B. (1983) Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. *Cancer Res*, **43**, 3034-3040.
- Streilein, J.W. and Grammer, S.F. (1989) In vitro evidence that Langerhans cells can adopt two functionally distinct forms capable of antigen presentation to T lymphocytes. *J Immunol*, **143**, 3925-3933.
- Sturgill, T.W. and Wu, J. (1991) Recent progress in characterization of protein kinase cascades for phosphorylation of ribosomal protein S6. *Biochim Biophys Acta*, **1092**, 350-357.
- Sutherland, E.W. (1972) Studies on the mechanism of hormone action. *Science*, **177**, 401-408.

- Suzuki, T., Ino, K., Kikkawa, F., Uehara, C., Kajiyama, H., Shibata, K. and Mizutani, S. (2002) Neutral Endopeptidase/CD10 Expression during Phorbol Ester-induced Differentiation of Choriocarcinoma Cells through the Protein Kinase C- and Extracellular Signal-regulated Kinase-dependent Signalling Pathway. *Placenta*, **23**, 475-482.
- Takashi, R. (1988) A novel actin label: a fluorescent probe at glutamine-41 and its consequences. *Biochemistry*, **27**, 938-943.
- 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.
- Tricot, G., Jayaram, H.N., Weber, G. and Hoffman, R. (1990) Tiazofurin: biological effects and clinical uses. *Int J Cell Cloning*, **8**, 161-170.
- Tucholski, J., Lesort, M. and Johnson, G.V. (2001) Tissue transglutaminase is essential for neurite outgrowth in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroscience*, **102**, 481-491.
- Turk, J.L. (1979) Relation between delayed hypersensitivity and cell-mediated immunity. *J R Soc Med*, **72**, 243-245.
- Vanhaesebroeck, B. and Alessi, D.R. (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J*, **346 Pt 3**, 561-576.
- Weinlich, G., Heine, M., Stossel, H., Zanella, M., Stoitzner, P., Ortner, U., Smolle, J., Koch, F., Sepp, N.T., Schuler, G. and Romani, N. (1998) Entry into afferent lymphatics and maturation in situ of migrating murine cutaneous dendritic cells. *J Invest Dermatol*, **110**, 441-448.
- Weiss, A. and Littman, D.R. (1994) Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*, **76**, 263-274.
- Weiss, J.M., Sleeman, J., Renkl, A.C., Dittmar, H., Termeer, C.C., Taxis, S., Howells, N., Hofmann, M., Kohler, G., Schopf, E., Ponta, H., Herrlich, P. and Simon, J.C. (1997) An essential role for CD44 variant isoforms in epidermal Langerhans cell and blood dendritic cell function. *J Cell Biol*, **137**, 1137-1147.
- White, S.I., Friedmann, P.S., Moss, C. and Simpson, J.M. (1986) The effect of altering area of application and dose per unit area on sensitization by DNCB. *Br J Dermatol*, **115**, 663-668.
- Willis, C.M., Stephens, C.J. and Wilkinson, J.D. (1990) Differential effects of structurally unrelated chemical irritants on the density and morphology of epidermal CD1+ cells. *J Invest Dermatol*, **95**, 711-716.
- Witmer-Pack, M.D., Valinsky, J., Olivier, W. and Steinman, R.M. (1988) Quantitation of surface antigens on cultured murine epidermal Langerhans cells: rapid and selective increase in the level of surface MHC products. *J Invest Dermatol*, **90**, 387-394.
- Wong, S.K. and Ross, E.M. (1994) Chimeric muscarinic cholinergic:beta-adrenergic receptors that are functionally promiscuous among G proteins. *J Biol Chem*, **269**, 18968-18976.
- Xu, H., Banerjee, A., Dilulio, N.A. and Fairchild, R.L. (1997a) Development of effector CD8+ T cells in contact hypersensitivity occurs independently of CD4+ T cells. *J Immunol*, **158**, 4721-4728.
- Xu, W., Harrison, S.C. and Eck, M.J. (1997b) Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature*, **385**, 595-602.
- Y. Kishi, P.A.C., 70, 339-344. (1998) *Pure Appl. Chem.*, **70**, 339-344.
- Yan, S.R. and Berton, G. (1996) Regulation of Src family tyrosine kinase activities in adherent human neutrophils. Evidence that reactive oxygen intermediates produced by adherent neutrophils increase the activity of the p58c-fgr and p53/56lyn tyrosine kinases. *J Biol Chem*, **271**, 23464-23471.
- Yoshimura, S., Bondeson, J., Foxwell, B.M., Brennan, F.M. and Feldmann, M. (2001) Effective antigen presentation by dendritic cells is NF-kappaB dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. *Int Immunol*, **13**, 675-683.
- Yousefi, S., Green, D.R., Blaser, K. and Simon, H.U. (1994) Protein-tyrosine phosphorylation regulates apoptosis in human eosinophils and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 10868-10872.
- Yung, Y., Yao, Z., Hanoch, T. and Seger, R. (2000) ERK1b, a 46-kDa ERK isoform that is differentially regulated by MEK. *J Biol Chem*, **275**, 15799-15808.
- Zhang, J., Lesort, M., Guttmann, R.P. and Johnson, G.V. (1998) Modulation of the in situ activity of tissue transglutaminase by calcium and GTP. *J Biol Chem*, **273**, 2288-2295.
- Zhang, L.X., Mills, K.J., Dawson, M.I., Collins, S.J. and Jetten, A.M. (1995) Evidence for the involvement of retinoic acid receptor RAR alpha-dependent signaling pathway in the induction of tissue transglutaminase and apoptosis by retinoids. *J Biol Chem*, **270**, 6022-6029.

# CURRICULUM VITAE

## Persönliche Daten

Name Sabine Zahn  
Geburtstag 6.12.1972  
Geburtsort Lindau am Bodensee  
Nationalität Deutsch

## Hochschulausbildung

1.3.2000-31.12.2002 Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main  
Anfertigung der Doktorarbeit  
im Fachbereich Chemische und Pharmazeutische  
Wissenschaften,  
bei Herrn Prof. Dieter Steinhilber und extern  
bei Herrn Prof. Jürgen Knop, Uni-Klinik Mainz, Medizin  
Titel der Doktorarbeit:  
„Mechanismus der funktionell relevanten  
Kopplung von Kontaktallergenen in dendritischen Zellen“

9.4.1999-7.2.2000 Johannes Gutenberg-Universität, Mainz  
Anfertigung der Diplomarbeit im  
Fachbereich Biologie,  
bei Herrn Prof. Manfred Blessing  
Titel der Diplomarbeit:  
„Studium zur Funktion von Wachstumsfaktoren  
bei der Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung  
der Homöostase in der Haut“

16.10.1997 Diplom-Vorprüfung

## Schulische Ausbildung

1983-1993 Gottlieb Fichte Gymnasium, Karlsruhe  
1984-1985 Jefferson JR High School, Oak Ridge, TN, USA  
1982-1983 Realschule Linkenheim, Baden-Württemberg  
1979-1982 Grundschule Hochstetten, Baden-Württemberg

