

Induktion und Signaltransduktion bei der Expression  
des Chemokins MCP-1 in Monozyten

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

Illya Tietzel

geb. in Bad Pyrmont

Mainz, Juni 2001

Aus dem  
Institut für Immunologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
(kommissarischer Leiter : HschDoz. Dr. E. Schmitt )  
(Prof. Dr. E. Rüde, emeritiert)

Dekan : Prof. Dr. J. Markl

Erste Gutachterin :

Zweiter Gutachter :

Tag der mündlichen Prüfung : 12.07.2001

## Danksagung

Herrn Privatdozenten Dr. T. G. danke ich für die Bereitstellung des Laborarbeitsplatzes in der immunologischen Forschungsabteilung der Fa. Grünenthal GmbH. Ebenso habe ich die kreative Kritik geschätzt.

Frau Hochschuldozentin Dr. U. K.-D. und Herrn Hochschuldozent Dr. E. S. möchte ich für die Bereitschaft danken, die vorliegende Arbeit zu begutachten.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. Erik James W., der mich mit dem Gebiet der Signaltransduktion vertraut gemacht hat und jederzeit für eine wissenschaftliche Diskussion bereit war. Neben Hr. Dr. G. und Fr. V. habe ich meinen ersten Kongreßbesuch Dr. W. zu verdanken.

Herrn Prof. Dr. E. R. und Herrn Hochschuldozenten Dr. E. S. gebührt mein Dank für die hingebungsvolle Unterstützung, insbesondere am Ende der Dissertation.

Fr. H. Sto., Fr. J. Kor., Fr. D. Bu., Fr. M. Kul., Hr. F-J Bu., Fr. Dr. S. F. und allen weiteren Kollegen möchte ich für die herzliche Aufnahme in den Laborbereich danken, ebenso wie für die Einarbeitung in diverse Arbeitstechniken.

Hr. Matthias B. danke ich für die Vorschläge beim abschließenden Lesen der Arbeit.

Schließlich möchte ich mich bei meinem Vater und meiner Schwester sowie bei allen Freunden für ihr Verständnis bedanken, das sie mir während meiner Promotion entgegengebracht haben.

<b>I.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.	Historie .....	1
2.	Charakteristika der angeborenen Immunität .....	1
2.1.	Erkennung von Pathogenen .....	3
2.2.	Effektormechanismen der angeborenen Immunität .....	5
2.3.	Monozyten und Makrophagen als immunologische Effektorzellen .....	7
3.	Chemokine .....	10
3.1.	<u>M</u> onocyte <u>C</u> hemoattractant <u>P</u> rotein-1 (MCP-1) .....	11
4.	Signaltransduktion und Genregulation der MCP-1-Expression .....	13
4.1.	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen .....	16
4.2.	Proteinkinase C .....	21
4.3.	Calcineurin und NF-AT .....	24
4.4.	Calmodulinkase-Kaskade .....	27
4.5.	Intazelluläres Calcium .....	29
4.6.	Transkriptionsfaktorfamilien .....	30
5.	Fragestellung der Arbeit .....	33
<b>II.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>34</b>
1.	Material .....	34
1.1.	Laborgeräte .....	34
1.2.	Substanzen, Lösungen, Puffer .....	35
2.	Methoden .....	41
2.1.	Zellbiologische Methoden .....	41
2.1.1.	Isolierung von Monozyten <i>ex vivo</i> .....	41
2.1.1.1.	Blutentnahme und Dichtegradientenzentrifugation .....	41
2.1.1.2.	Magnetische Zellseparation (MACS) .....	43
2.1.2.	Zellkultur und Stimulationsexperimente .....	44
2.1.3.	ELISA ( <u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>I</u> mmun <u>o</u> sorbent <u>A</u> ssay) .....	46
2.2.	Molekularbiologische Methoden .....	48
2.2.1.	RNA-Isolierung und Reverse Transkription (RT) .....	49
2.2.2.	FLIPR ( <u>F</u> luorometric <u>I</u> maging <u>P</u> late <u>R</u> eaders) und $[Ca^{2+}]_i$ .....	52
2.2.3.	PCR ( <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction) .....	53
2.2.4.	SDS-PAGE und Immunoblotting .....	55
2.2.5.	EMSA ( <u>E</u> lectrophoretic <u>M</u> obility <u>S</u> hift <u>A</u> ssay) .....	55

2.2.6.	Decoy-Technik.....	56
<b>III.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>58</b>
1.	Charakterisierung der myelomonozytären Zelllinie THP-1 als Modell..... für die Stimulation ex vivo isolierter humaner Monozyten durch..... bakterielle Substanzen.....	58
1.1.	Bildung der Zytokine IL-6, TNF- $\alpha$ und IL-12p40 als Aktivierungs-..... parameter nach Stimulation von monozytären Zellen durch LPS.....	58
1.2.	Bildung des Chemokins MCP-1 als Aktivierungsparameter nach..... Stimulation von Monozyten durch LPS.....	63
2.	Mechanismen der Signaltransduktion bei der Bildung von MCP-1 durch.. monozytäre Zellen.....	68
2.1.	Vergleich verschiedener bakterieller und nicht-bakterieller Stimuli bei der Bildung des Chemokins MCP-1 durch Makrophagen.....	68
2.2.	Differentielle Wirkungen unterschiedlicher Stimuli auf eine Phosphatase und Kinasen.....	77
2.2.1.	Stimuluspezifische Rolle von CaN und CaMKs.....	78
2.2.2.	Beteiligung von MAPKs an der Bildung von MCP-1.....	86
2.2.3.	Inhibition der MCP-1-Expression durch Staurosporin und Rolle der PKA.....	92
2.2.4.	Beitrag von cPKCs an der Bildung von MCP-1.....	96
2.2.5.	Geringe Bedeutung der PKG bei der Induktion von MCP-1.....	99
2.3.	Aktivierung von Transkriptionsfaktoren nach Stimulation von mono-..... zytären Zellen mit LPS oder Thapsigargin.....	100
2.4.	Bindung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 an distinkte..... Regionen des MCP-1-Promotors und Decoy-Experimente.....	111
3.	Induktion von MCP-1 bei frisch isolierten primären Monozyten.....	119
4.	Bildung von IL-12p40 im Vergleich zu MCP-1.....	122
<b>IV.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>128</b>
<b>V.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>142</b>

<b>VI.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>145</b>
<b>VII.</b>	<b>Abkürzungen und Symbole .....</b>	<b>160</b>
	Curriculum vitae .....	163

# I. Einleitung

## 1. Historie

Der Begriff „*Immunitas*“ bedeutete im lateinischen Sprachgebrauch den Schutz der römischen Senatoren vor strafrechtlicher Verfolgung für die Dauer ihrer Amtszeit. Angesichts dieses Sprachgebrauchs läßt sich leicht nachvollziehen, daß das Wort Immunität zu späteren Zeiten auch dazu verwendet wurde, den Schutz vor ansteckenden Krankheiten zu bezeichnen. Funktionell läßt sich die Eigenschaft der Immunität in die erworbene Immunität und die angeborene Immunität unterteilen, was durch evolutionsbiologische Befunde unterstützt wird. So besitzen schon Vertreter der *Invertebrata* wie Protozoen, Anneliden und Arthropoden<sup>1:2</sup> Mechanismen der angeborenen Immunität. Auch die Resistenzgene bei Pflanzen<sup>3</sup> wie das Tabakmosaikvirus-Resistenzgen N zeugen von der weiten Verbreitung von Mechanismen der angeborenen Immunität bei lebenden Organismen.

## 2. Charakteristika der angeborenen Immunität

Die angeborene Immunität verfügt über solche Schutzmechanismen, die sofort wirksam werden und sich nicht selektiv gegen ein spezifisches Pathogen richten<sup>4</sup>. Diese definierenden Merkmale lassen sich der erworbenen Immunität gegenüberstellen, welche Immunantworten bereitstellt, die durch einen vorherigen Kontakt mit dem Krankheitserreger erst erworben werden, und gezielt gegen das Pathogen gerichtet sind. Die Antworten der angeborenen

Immunität ändern oder beschleunigen sich nicht bei wiederholter Infektion mit dem gleichen Pathogen, wohingegen bei der erworbenen Immunität eine vorherige Infektion zum „Erwerb“ einer verbesserten Immunantwort bei einer erneuten Infektion führen kann. Dieses immunologische Gedächtnis durch besondere Zellen wie T-Helfer-Gedächtniszellen ist ein besonderes Merkmal der erworbenen Immunität.

Der angeborenen Immunität kommt in vielerlei Hinsicht Bedeutung zu. Sie ist der erste und schnellere Verteidigungsmechanismus des Wirtsorganismus bei einem Erstkontakt mit einem Krankheitserreger. Zudem ermöglicht die angeborene Immunität durch die Lebenserhaltung des Wirtsorganismus die Entwicklung einer erworbenen Immunität. Weiterhin hat die angeborene Immunität Einfluß auf die erworbene Immunantwort <sup>5-8</sup>, indem sie z.B. nach einem Zusammentreffen mit einem Pathogen mit der Expression kostimulatorischer Moleküle wie B7 oder der Sekretion von Zytokinen dem System der erworbenen Immunität Hilfestellung gibt. Zusätzlich bahnen sich neue Möglichkeiten an, das System der angeborenen Immunabwehr therapeutisch zu nutzen. So werden durch eine Aktivierung der angeborenen Abwehrmechanismen über immunstimulatorische Oligonukleotide oder einer Nutzung des Komplementsystems zur Zeit neue vielversprechende Impf-Strategien entwickelt<sup>9</sup>.

Aufgrund der 1893 gemachten Beobachtung, daß ein Dorn in einer Seesternlarve zu einer Umrundung des Fremdkörpers mit Phagozyten führt <sup>10</sup>, postulierte Elie Metchnikoff die sog. zelluläre Theorie der Immunität, wonach nicht so sehr lösliche Faktoren (z.B. Antikörper), sondern bestimmte Zellen des Wirtsorganismus Immunität vermitteln. In der Tat tragen distinkte Zelltypen wie neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen (Monozyten/Makrophagen) sowie Natürlichen Killerzellen (NK) entscheidend zur angeborenen Immunität in Mammaliern bei <sup>4</sup>. Darüber hinaus können endotheliale und mucosale



Epithelzellen über konservierte Rezeptoren, den sog. „Pattern Recognition Receptor(s)“ (PRR), die Pathogene erkennen und zu Abwehrmechanismen aktiviert werden<sup>8;11</sup>. Von den erwähnten Zelltypen nehmen die Monozyten und Makrophagen aufgrund ihrer vielfältigen Fähigkeiten eine Schlüsselstellung ein.

## 2.1. Erkennung von Pathogenen

Das System der angeborenen Immunabwehr ist in der Lage, mit einer relativ geringen Anzahl an Rezeptoren eine breite Vielfalt von Pathogenen und Mikroorganismen zu erkennen, obwohl die Mikroorganismen durch ihre kurzen Generationszeiten und Mutationsfähigkeiten ihre Eigenschaften ändern können. Die angeborene Immunabwehr nutzt dabei nicht die Mechanismen des Genrearrangements und der somatischen Hypermutation, welche im späteren Verlauf der Evolution der erworbenen Immunabwehr zur Diversifizierung der Rezeptoren zur Verfügung stand, sondern PRR, die auf Zellen der angeborenen Immunabwehr exprimiert werden. Sie erkennen besondere Strukturmerkmale auf Pathogenen, die als „Pathogen-Associated Molecular Patterns“ (PAMP) bezeichnet werden<sup>8</sup>. Da nicht spezifische Moleküle einzelner Pathogene selektiv erkannt werden, sondern weitverbreitete Muster (PAMPs), reicht eine geringere Anzahl von Rezeptoren aus, um ein weites Spektrum an Pathogenen abzudecken. Die Konservierung bzw. Invarianz der PAMPs erklärt sich dadurch, daß solche Strukturen der Pathogene erkannt werden, die entweder essentiell für den Metabolismus des Krankheitserregers sind oder unverzichtbar für seine Pathogenität. Die verschiedenen Erreger können durch distinkte pathogen-assoziierte molekulare Muster erkannt werden. Im Falle von Gram-negativen Bakterien beispielsweise der charakteristischen Zellwandkomponente Lipopolysaccharid (LPS), bei Gram-positiven Bakterien der für sie typischen „Lipoteichoic Acid“ (LTA) und bei Hefen bestimmten Mannanen. Neben diesen

Zellwandbestandteilen können Bakterien über ihre CpG-unmethylierte DNA erkannt werden und lösen Immunantworten aus, weshalb sie auch als „immunstimulatorische DNA“ bezeichnet wird<sup>12;13</sup>.

Die PRR der angeborenen Immunabwehr, welche die PAMP als Liganden erkennen, lassen sich strukturell und biochemisch sieben verschiedenen Familien zuordnen : 1.) humoralen C-Typ Lectinen, 2.) zellulären C-Typ Lectinen, 3.) leucinreichen Proteinen, 4.) sog. „Scavenger Receptors“, 5.) Pentraxinen, 6.) Lipidtransferasen und 7.) Integrinen.

Ein Beispiel für die zellulären C-Typ-Lectine<sup>14-16</sup> ist der Mannoserezeptor von Makrophagen<sup>17</sup>, der zur Phagozytose beitragen kann. Zu der Familie der Leucin-reichen Proteine zählt CD14<sup>18</sup>, das LPS bindet<sup>19 20</sup> und als Kandidat des LPS-Rezeptors galt, bis der Signaltransduktionsmechanismus für LPS mit der Entdeckung der „Toll-like Receptors“ (TLR)<sup>11</sup> hinreichend aufgeklärt werden konnte (s. auch Abb. 1, Abschnitt 4). Zu der Familie der sogenannten „Scavenger“-Rezeptoren<sup>21 22</sup> zählt der Makrophagen „Scavenger“-Rezeptor<sup>23</sup>, welcher an der Phagozytose von Bakterien beteiligt ist.

Monozyten und Makrophagen, welche viele Schlüsselfunktionen der angeborenen Immunabwehr ausüben, besitzen Rezeptoren aus den verschiedenen PRR-Familien wie den zellulären C-Typ Lectinen, den leucinreichen Proteinen und den „Scavenger“-Rezeptoren.

Die PRR aktivieren Effektormechanismen der angeborenen Immunabwehr. Darüber hinaus nehmen sie Einfluß auf die Einleitung und den Abfluß einer Immunantwort des erworbenen Immunsystems. Die Ligation von PRR auf den Zellen der angeborenen Immunabwehr führt zur Expression kostimulatorischer Moleküle wie B7.1 und B7.2, welche ein essentielles Signal zur Aktivierung der T-Zellen und damit der Einleitung einer Immunantwort des erworbenen Immunsystems liefern. Die Ligation von PRR auf den Zellen der angeborenen

Immunabwehr aktiviert außerdem die Bildung von Zytokinen, welche den Ablauf der adaptiven Immunabwehr beeinflussen. So können Monozyten oder Makrophagen nach Bindung von LPS an CD14 über die „Toll-like Receptors“ (TLRs) zur Interleukin (IL)-12-Expression aktiviert werden, was den Ablauf einer Differenzierung von CD4-T-Zellen in Richtung des T-Helfer 1-Typs (Th1) verschiebt.

## 2.2. Effektormechanismen der angeborenen Immunität

Unter einem zeitlichen Aspekt können die Mechanismen der angeborenen Immunabwehr in unmittelbare und frühe, induzierte Abwehrmaßnahmen eingeteilt werden, die beide bei einer Erstinfektion vor den Antworten der erworbenen Immunität wirksam werden.

Die unmittelbaren Mechanismen konstituieren sich aus den humoralen und den zellvermittelten Komponenten der angeborenen Immunität. Zu den „humoralen“, d.h. die Körperflüssigkeiten betreffenden, Abwehrmechanismen gehört das Komplementsystem, das bei einer kaskadenartigen Aktivierung der Einzelkomponenten in der Lage ist, spontan bestimmte Pathogene abzutöten. Zu den zellulären Abwehrmechanismen tragen die Makrophagen und neutrophile Granulozyten bei, indem sie Krankheitserreger wie Bakterien durch Phagozytose oder Freisetzung toxischer chemischer Mediatoren wie beispielsweise Stickoxide (NO<sub>x</sub>) unmittelbar eliminieren.

Bei den frühen, induzierten Abwehrmaßnahmen handelt es sich um zusätzliche Mechanismen, die in einer „frühen Phase“ der Infektion eingeleitet werden. Dazu zählt die sogenannte „Akutphase-Reaktion“, die durch das Auftreten von Akutphase-Proteinen (APP) und einen Anstieg von neutrophile Granulozyten im Blutkreislauf gekennzeichnet ist. Ein Weg zur Auslösung einer Akutphase-Antwort besteht in der Aktivierung von Makrophagen oder monozytären Vorläufern beispielsweise über Lipopolysaccharid, was von den Makrophagen

über den PRR CD14 und TLRs erkannt wird. Infolge der Aktivierung des Makrophagen kommt es u.a. zur Expression von Zytokinen wie Interleukin (IL)-1 und IL-6. Beide sind Induktoren der Akutphase-Antwort. IL-6 stimuliert z.B. die Produktion von C-reaktivem Protein (CRP), welches an die Membranoberflächen von Mikroorganismen bindet und eine Elimination des Pathogens über die Komplement-Kaskade ermöglicht. Die Akutphase-Proteine CRP und das mannosebindende Protein ermöglichen zwei zusätzliche Wege zur Aktivierung des Komplementsystems, woran deutlich wird, daß die Induktion der Akutphase-Antwort der Bereitstellung zusätzlicher Abwehrmechanismen dient.

Der Begriff der Inflammation oder Entzündung beschreibt nur das beobachtbare makroskopische Bild mit den charakteristischen Merkmalen des Schmerzes (*Dolor*), der Rötung (*Rubor*), der erhöhten Temperatur (*Calor*) und der Schwellung (*Tumor*) der betroffenen Körperregion. Die Vasodilatation verursacht die Rötung (*Rubor*) und die Erwärmung des Gewebes (*Calor*) aufgrund der erhöhten Durchblutung. Die erhöhte Gefäßpermeabilität ermöglicht außerdem den Austritt von Flüssigkeit und Zellen, die eine Schwellung hervorrufen und für die Schmerzhaftigkeit mitverantwortlich sind.

Bei der Auslösung einer inflammatorischen Antwort spielt als Zelltyp der Makrophage bzw. sein monozytärer Vorläufer eine zentrale Rolle. Dieser Zelltyp ist durch die Sekretion von Zytokinen in der Lage eine inflammatorische Reaktion auszulösen. Zu dieser Schlüsselposition trägt auch bei, daß Monozyten und Makrophagen nicht nur bei einer direkten Interaktion mit Mikroorganismen aktiviert werden können, sondern auch über die Zellen des adaptiven Immunsystems, insbesondere den T-Zellen.

Insgesamt ergibt sich aufgrund einer Vielzahl experimenteller Befunde folgendes Bild: Die bedeutsamen Zytokine der Makrophagen und Monozyten, die die Inflammation auslösen, sind

der Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), IL-1, IL-6, IL-12, sowie Chemokine wie IL-8 und „Monocyte Chemoattractant Protein-1“ (MCP-1). Die Sekretion von TNF- $\alpha$  durch den Makrophagen erhöht die Gefäßpermeabilität, sorgt für die Vasodilatation und induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen, die die Extravasation von Leukozyten an den Ort der Infektion zur Abwehr des Pathogens ermöglichen. Die Sekretion von IL-6 durch Makrophagen und Monozyten ist der Hauptstimulus für Akutphase-Proteine. Die Ausschüttung von IL-1 hat diverse Effekte, unter anderem aktiviert es das Gefäßendothel zur Sekretion chemotaktischer Faktoren wie MCP-1<sup>24</sup>. Schließlich ermöglicht die Bildung chemotaktischer Faktoren wie IL-8 und MCP-1 durch Makrophagen die Rekrutierung weiterer Phagozyten, d.h. Monozyten und neutrophile Granulozyten, an den Ort der Infektion. Zusätzlich sind diese Chemokine in der Lage, die Effektorfunktionen von Makrophagen und anderen Zellen zu beeinflussen<sup>24</sup>. Die Bildung des von Monozyten und Makrophagen nach Stimulation durch Mikroorganismen gebildeten IL-12 trägt vor allem zur Aktivierung von NK-Zellen und T-Lymphozyten bei.

### 2.3. Monozyten und Makrophagen als immunologische Effektorzellen

Monozyten entstehen durch die Differenzierung einer myeloiden Vorläuferzelle des Knochenmarks, die sich aus pluripotenten hämatopoietischen Stammzellen des Knochenmarks ableitet. Der reife Monozyt wechselt vom Knochenmark in das Kompartiment des Blutkreislaufes, wo er zirkuliert und zur „immunologischen Überwachung“ beiträgt<sup>25</sup>. Unter geeigneten Bedingungen wie beispielsweise bei einer Inflammation kann der Monozyt aus dem Blutkreislauf chemotaktisch über Chemokine wie MCP-1 in das Gewebe rekrutiert werden und zu einem Makrophagen differenzieren, wo dieser als Effektorzelle der angeborenen Immunabwehr wirksam werden kann.

Der Monozyt/Makrophage nimmt unter den an angeborenen Immunitätsmechanismen beteiligten Zellen eine Schlüsselposition ein. So kann dieser Zelltyp bei einer Infektion oftmals als erster zu Effektormechanismen aktiviert werden. Weiterhin können Monozyten bzw. Makrophagen, wie oben angeführt, ein breites Spektrum von Pathogenen über PRR aus den verschiedenen Familien, wie den zellulären C-Typ-Lectinen, den leucinreichen Proteinen und den „Scavenger“-Rezeptor erkennen<sup>8</sup>. Monozyten/Makrophagen können nicht nur durch Phagozytose, sondern auch durch die Bildung von toxischen chemischen Substanzen wie Stickoxiden (NO<sub>x</sub>) und reaktiven Sauerstoffverbindungen<sup>26</sup> Krankheitserreger eliminieren. Darüber hinaus sind Monozyten/Makrophagen durch die Sekretion von Zytokinen in der Lage, eine inflammatorische und Akutphase-Antwort zu initiieren (s.o.). Neben diesen proinflammatorischen Effektormechanismen können Monozyten auch anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und „Transforming Growth Factor-β“ (TGF-β) sezernieren. Schließlich sind Monozyten/Makrophagen nicht nur Effektorzellen der angeborenen Immunität, sondern fördern über die Aktivierung von T-Lymphozyten die Effektorzellen der adaptiven Immunantwort. In diesem Zusammenhang ist die Fähigkeit zur Präsentation von Antigenen über die „Major Histocompatibility Complex“ (MHC)-Moleküle der Klasse I und II und die Expression der für T-Lymphozyten kostimulatorischen Moleküle B7.1 und B7.2 zu nennen sowie die Sekretion von IL-12 (s.o.,<sup>8</sup>).

Die Bedeutung der Monozyten/Makrophagen konnte in vielen experimentellen Arbeiten zu diversen Krankheitsbildern nachgewiesen werden. Bei der „klinischen Immunparalyse“ beispielsweise, die bei Patienten nach großen chirurgischen Eingriffen, ausgedehnten Verbrennungsverletzungen, Polytraumen und einer Sepsis auftreten kann, kommt es zu einer lebensbedrohlichen erworbenen Immundefizienz aufgrund einer Deaktivierung der Effektorfunktionen von Makrophagen<sup>27</sup>. Als weiteres Beispiel konnte für die experimentelle

afrikanische Trypanosomiasis gezeigt werden, daß der Ausgang der Erkrankung von den Makrophagenfunktionen abhängt <sup>28</sup>.

Darüber hinaus gibt es in letzter Zeit Hinweise über weitere Funktionen von Monozyten/Makrophagen, die zur Immunabwehr beitragen. So wurde der Phänotyp des „alternativ aktivierten Makrophagen“ beschrieben, der durch eine Behandlung von Monozyten mit IL-4 und IL-10 entstehen kann, und durch eine erhöhte Expression des Mannoserezeptors, eine erhöhte Endozytose-Aktivität und Veränderungen der Antigenpräsentation gekennzeichnet ist <sup>29</sup>. Für diesen Typ von Makrophagen wurden aktive Effektormechanismen und eine Rolle bei der Vermittlung bestimmter Toleranzphänomene postuliert. Beispielsweise wurde die Expression eines neuen Chemokins für diese Art von Makrophagen gefunden, das sogenannte „Alternative Macrophage Activation-Associated CC-Chemokine-1“ (AMAC-1). Alternativ aktivierte Makrophagen sollen außerdem die durch Bestrahlung mit UVB-Licht induzierte Kontakttoleranz vermitteln. Diese soll über die Aktivierung von T-Zellen zu T-Helfer-Typ 2-Zellen und sogenannten „Tc2“ Zellen erfolgen <sup>30</sup>.

Die Ausführungen machen deutlich, welche zentrale Rolle der Monozyt und der Makrophage für das Immunsystem spielen und welche gravierende Auswirkungen eine deregulierte Aktivierung von Monozyten/Makrophagen haben kann. Ein besseres Verständnis der Regulation der Effektormechanismen dieser Zelltypen hätte einen weitreichenden Nutzen für die Entwicklung von neuen Therapien für ein großes Spektrum von Erkrankungen.

### 3. Chemokine

Bei den chemotaktischen Zytokinen, den Chemokinen, handelt es sich um kleine Polypeptide (ca. 8-12 KDa), die von verschiedenen Zellen des Immunsystems und beispielsweise auch von Endothelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten und glatten Muskelzellen („Smooth Muscle Cells“, SMC) produziert werden können und zur chemotaktischen Rekrutierung sowie Aktivierung von Phagozyten und T- und B-Zellen beitragen <sup>24</sup>. Chemokine haben eine tragende Rolle bei der angeborenen Immunabwehr dadurch, daß sie durch die Rekrutierung und Aktivierung der Effektorzellen an der Einleitung und Erhaltung einer inflammatorische Antwort wesentlich mitwirken.

Chemokine werden aufgrund ihrer biochemischen Struktur, d.h. der Position der ersten beiden Cystein-Aminosäurereste (C) im aminoterminalen Teil des Peptids, in die vier Unterfamilien C, CC, CXC, und CXXXC eingeteilt (X symbolisiert die Lage anderer Aminosäuren)<sup>31-34</sup>. Zu der C-Chemokin-Unterfamilie zählt das Lymphotactin. Ein bekanntes Mitglied der CC-Chemokine ist MCP-1. Den CXC-Chemokinen wird IL-8 zugerechnet. Das einzig bekannte Mitglied der CXXXC-Familie stellt „Fractalkine“ dar .

Neuere Befunde unterstreichen die Bedeutung der Chemokine sowohl für die physiologischen als auch die pathophysiologischen Vorgänge im Organismus. Beispielsweise wurde das CC-Chemokin MCP-1 ursprünglich als chemotaktischer Faktor beschrieben, der zusätzlich auch die Expression von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und die Proliferation von mononukleären Zellen modulieren kann. In jüngster Zeit jedoch erkannte man zunehmend weitere Funktionen der Chemokine und ihre Rolle bei der Pathogenese von Erkrankungen mit einer (chronisch) inflammatorischen Komponente. So gibt es Hinweise auf eine Beteiligung der Chemokine bei der Pathogenese des Asthma, der idiopathischen pulmonären Fibrose (IPF), der Sepsis, der



entzündlichen Darmerkrankungen („Inflammatory Bowel Disease“, IBD), der multiplen Sklerose und der bakteriellen Pneumonie<sup>31;32;35;36</sup>. Als Folge dieser Erkenntnisse gibt es auch Anstrengungen Chemokine als Ziele einer pharmakologischen Intervention therapeutisch zu nutzen<sup>35;37</sup>.

### 3.1. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)

Anfang der 1980er Jahre hatte man ein murines JE-Gen gefunden, das durch den „Platelet Derived Growth Factor“ (PDGF) in einer murinen Fibroblastenlinie (3T3) induziert wird<sup>38</sup>. Die Klonierung und Expression des JE-Gens führte zu Spekulationen, daß es sich um ein Zytokin handele<sup>39</sup>. Jedoch konnte diese Hypothese experimentell nicht bestätigt werden, bis man das homologe Gen(-Produkt) des Menschen gefunden hatte. Unter Verwendung der murinen cDNA von JE als Sonde konnte in humanen Fibroblasten ein humanes Homolog gefunden werden, welches mit einem damals neu entdeckten humanen chemotaktischen Faktor für Monozyten identisch war<sup>40</sup>, MCP-1. Aufgrund dieser Entdeckungen und funktionellen Hinweise wurde klar, daß es sich bei dem „Monocyte Chemoattractant Protein-1“ (MCP-1)<sup>41;42</sup>, dem „Monocyte Chemotactic and Activating Factor“ (MCAF)<sup>43;44</sup>, dem „Tumor-Derived Chemotactic Factor“ (TDCF)<sup>45;46</sup> und dem „Smooth-Muscle-Cell-Derived Chemotactic Factor“ (SMC-CF)<sup>47;48</sup> um ein und denselben Faktor, MCP-1, handelt.

Das humane Chemokin MCP-1 zählt zu den CC-Chemokinen, weil es zwei unmittelbar aufeinanderfolgende Cysteinreste im aminoterminalen Bereich der Peptidsequenz besitzt. In jüngster Zeit wurde begonnen, eine neue Nomenklatur für die Chemokine einzuführen, die über die Bindung des Chemokins an seinen spezifischen Rezeptor definiert wird. Danach wird für MCP-1 das Synonym „CCL2“<sup>49</sup> benutzt, d.h. Ligand für den Chemokinrezeptor CCR2.

MCP-1 ist ein Protein von 76 Aminosäuren, welches insbesondere im Blutkreislauf zirkulierende Monozyten chemotaktisch anzieht. Die Klonierung und Sequenzierung des primären Translationsproduktes hat gezeigt, daß „unreifes“ humanes MCP-1 ein Protein mit 99 Aminosäuren ist, wobei die aminotermial ersten 23 Aminosäuren als Signal-Peptid nach erfüllter Funktion später abgespalten werden <sup>42;50</sup> .

Die Expression des MCP-1-Gens kann durch mehrere Zytokine <sup>24</sup> wie IL-1, IL-4 und TNF- $\alpha$ , durch LPS<sup>24</sup> als einen Bestandteil Gram-negativer Bakterien, und Phorbolestern wie TPA in vielen Zelltypen wie Fibroblasten <sup>51;52</sup>, Zellen der glatten Gefäßmuskulatur <sup>48;53</sup>, und Endothelzellen <sup>50;52;54</sup> induziert werden.

MCP-1 ist dadurch bedeutend für die Abwehrmechanismen der angeborenen und der erworbenen Immunität, daß es chemotaktisch Monozyten, basophile Granulozyten und T-Lymphozyten zum Ort der Inflammation rekrutiert <sup>55-57</sup>. Weitere Hinweise auf die protektiven Effekte von MCP-1 ergeben sich aus dem experimentellen Befund, daß dieses Chemokin infizierte Monozyten direkt zur Eliminierung von intrazellulären *Leishmania major* aktivieren kann <sup>58</sup>. Darüber hinaus haben *in vivo*-Versuche und Experimente mit transgenen Mäusen, die kein MCP-1 exprimieren, gezeigt, daß MCP-1 eine wichtige Rolle bei der T-Zell-Differenzierung in Richtung des T-Helfer Typs 2 haben kann, die sich sogar auf den Ausgang einer Infektion mit *Leishmania major* oder *Schistosoma mansoni* auswirkt<sup>49;59-61</sup> .

Neben diesen physiologischen Funktionen spielt MCP-1 auch bei pathophysiologischen Zuständen eine Rolle. So wurden Assoziationen von einer (aberranten) MCP-1-Expression mit einer glomerulären Nephritis <sup>62;63</sup>, der Alveolitis <sup>64</sup>, der experimentellen autoimmunen Encephalitis als Modell der multiplen Sklerose <sup>35</sup>, der idiopathischen pulmonären Fibrose <sup>65</sup>, dem Asthma <sup>66</sup> und anderen allergischen und chronisch-entzündlichen Erkrankungen <sup>67-69</sup>, der

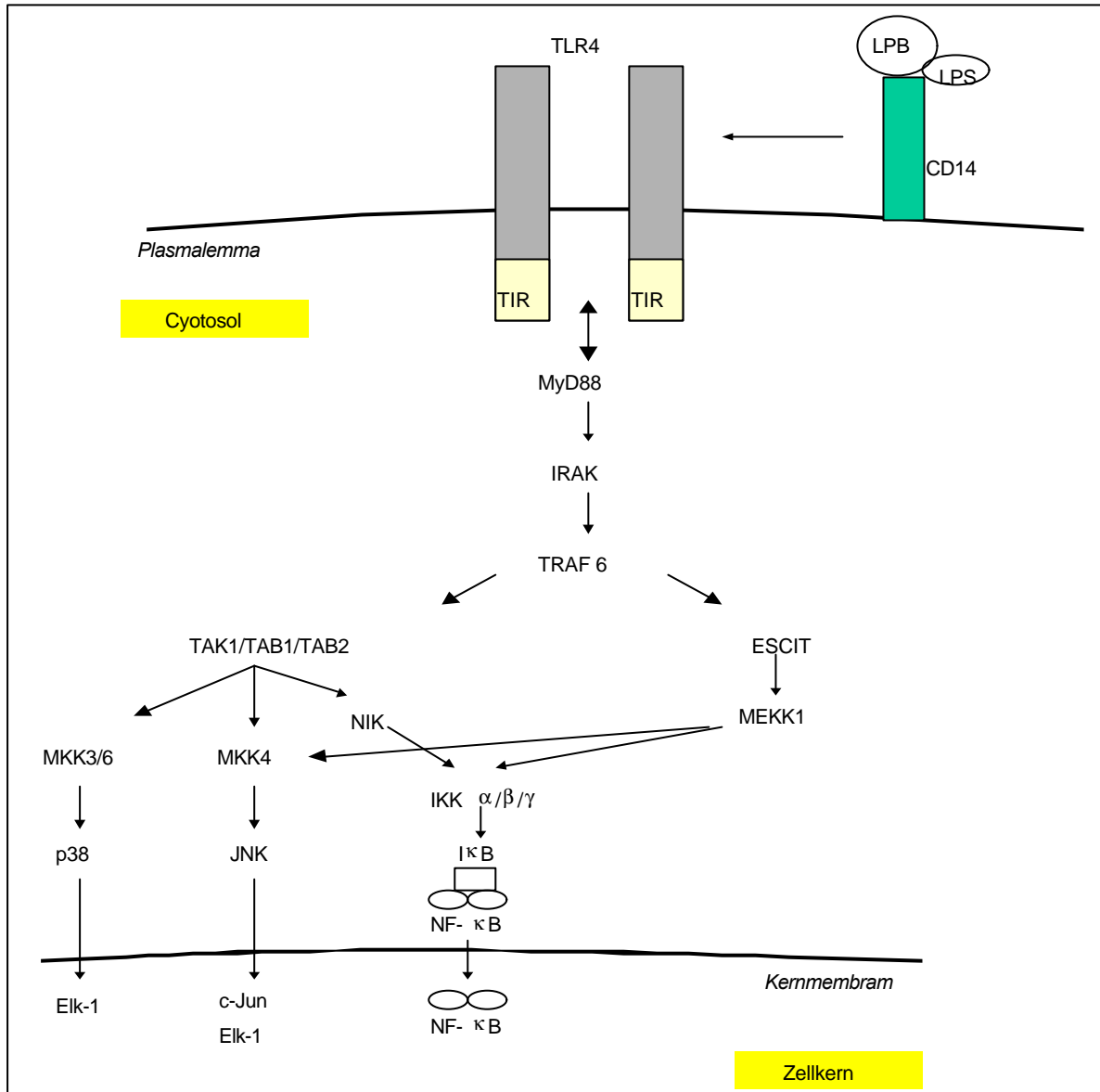
HIV-Replikation<sup>70;71</sup>, der Pathogenese der Atherosklerose<sup>72</sup> sowie einer Sonderform einer epidemischen Polyarthrit<sup>73</sup> gefunden.. Angesichts dieser Effekte von MCP-1 wäre ein besseres Verständnis der Induktion, Signaltransduktion und Genregulation dieses Chemokins ein wichtiger Beitrag, um neue therapeutische Strategien und Pharmaka für die oben genannten Erkrankungen zu finden. Damit wäre auch die Frage leichter zu beantworten, ob die aberrante MCP-1-Expression im kausalen Zusammenhang zur Pathogenese steht oder nur eine Korrelation vorliegt.

#### 4. Signaltransduktion und Genregulation der MCP-1-Expression

In jüngster Zeit hat die Betrachtungsweise der Signaltransduktion in vielen Forschungsfeldern wie der Immunologie, der Entwicklungsgenetik und der Neurologie stark an Bedeutung zugenommen. So wird in der Immunologie versucht, von bekannten experimentellen Befunden wie der Aktivierung von Makrophagen durch LPS, die Signaltransduktion, d. h. „die Umsetzung äußerer Reize auf die Zelle in die Steuerung der Genexpression“, aufzuklären<sup>74</sup>.

Die Signaltransduktion ist dadurch charakterisiert, daß ein extrazelluläres Signal wie LPS als Ligand an einen oder mehrere meist membranständige Rezeptoren, in diesem Falle CD14 und den „Toll-like Receptor4“ (TLR4), bindet<sup>75;76</sup>. Die Interaktion zwischen den Liganden und seine(n) Rezeptor(en) führt zur Initiierung eines intrazellulären Signals wie z.B. der Aktivierung von intrazellulären Kinasen. Im Falle der extrazellulären Ligation von LPS an den TLR4 bindet das intrazelluläre Adapterprotein MyD88 an die cytoplasmatische TIR-Domäne des TLR4, was eine Rekrutierung der „IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) ermöglicht, die daraufhin durch eine Autophosphorylierung aktiviert wird<sup>11;77</sup> (s. Abb. 1).

An dieses Signal kann sich eine hierarchisch geordnete Signalkaskade anschließen, die am Ende die Aktivierung eines Transkriptionsfaktors ermöglicht (s. Abb. 1). Im Falle der Signaltransduktion über den TLR4 führt die Aktivierung von IRAK zu einer Signalkaskade, die sich von dem „TNF Receptor-Associated Factor 6“ (TRAF6), über die „NF- $\kappa$ B-Inducing kinase“ (NIK), den „I $\kappa$ B Kinases“ (IKKs) bis zu der Phosphorylierung sowie Degradation des „Inhibitor of NF- $\kappa$ B“ (I- $\kappa$ B) erstreckt, welche zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors „Nuclear Factor  $\kappa$ B“ (NF- $\kappa$ B) führt <sup>78</sup>. Der aktivierte Transkriptionsfaktor kann dann zur entsprechenden Genexpression beitragen.



**Abb. 1**

Die Signaltransduktionskaskade des TLR4 in Mammaliern

Die Signalwege ausgehend vom TLR4 illustrieren die derzeit bekannten Komponenten zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B<sup>11;76</sup>. Zusätzlich ist die Induktion von MAPKs sowie der „Cross-Talk“ zwischen dem NF- $\kappa$ B-Pfad und den MAPK-Modulen angedeutet. Die Grafik wird im Text erläutert – TIR („Toll/IL-1 Receptor Motif“) – IRAK („IL-1 Receptor-Associated Kinase“) – TRAF6 („TNF Receptor-Associated Factor 6“) – NIK („NF- $\kappa$ B-Inducing Kinase“) – MEKK1 („Mitogen-Activated Protein Kinase/ERK Kinase Kinase 1“) – ECSIT („Evolutionary Conserved Signaling Intermediate In Toll Pathway“) – TAK1 („TGF- $\beta$  Ativated Kinase 1“) – TAB („TAK-Binding Protein“) - MKK („MAPK Kinase“) – IKK („IkB Kinases“) - I $\kappa$ B („Inhibitor of NF- $\kappa$ B“).

## 4.1. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

Neben der geschilderten Signaltransduktionskaskade zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B gibt es noch weitere Signaltransduktionspfade, die in die Immunantworten von Effektorzellen involviert sind.

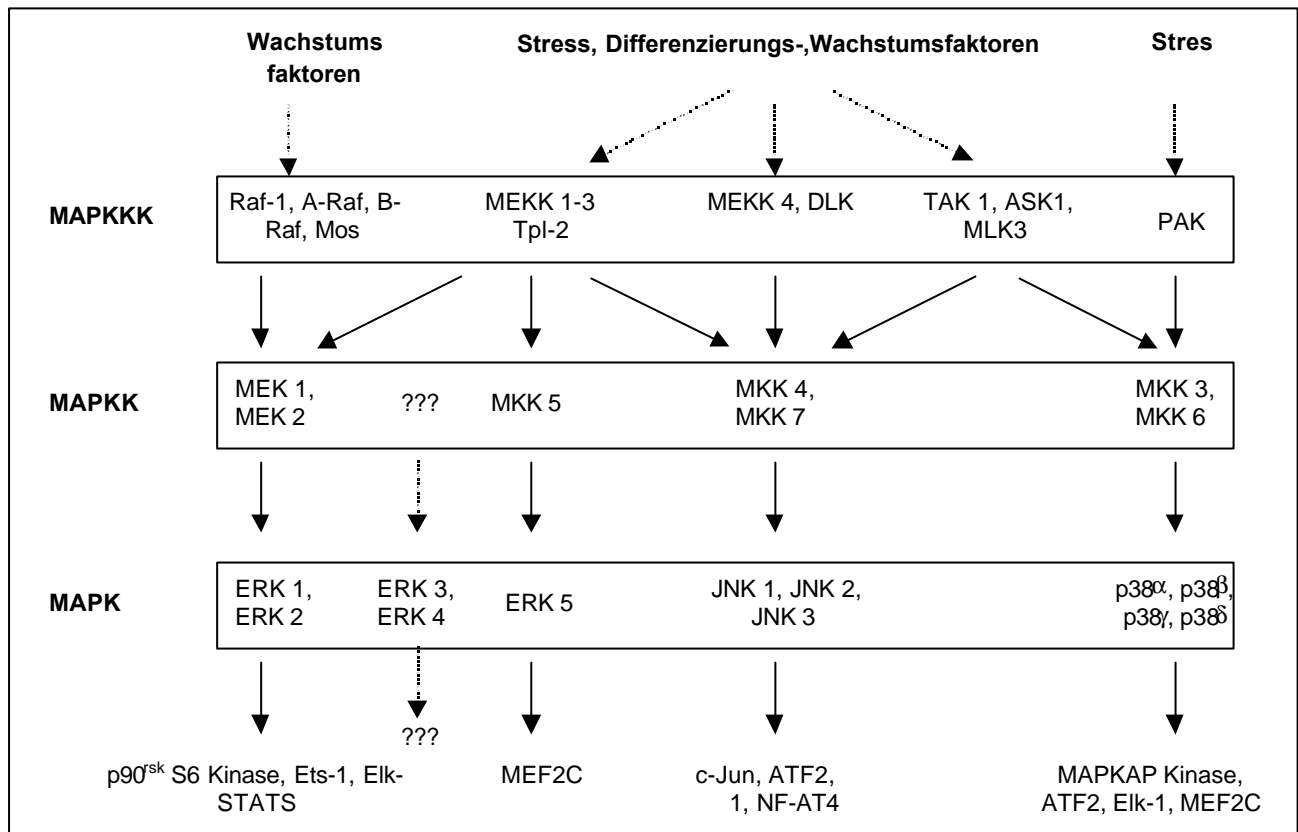
Die Signaltransduktion über die „Mitogen-Activated Protein Kinases“ (MAPKs) kann unter anderem durch eine Ligation von inflammatorischen Zytokinen an die entsprechenden extrazellulären Rezeptoren induziert werden. Die Aktivierung der MAPKs kann die Effektorzellen daraufhin zu einer inflammatorischen Antwort stimulieren <sup>79</sup>.

Für die MAPKs wurde ursprünglich das Modell einer linearen Signalübertragung beschrieben. Danach waren MAPKs Bestandteil einer Kaskade, die als Modul mit drei hierarchisch aktivierten Kinasen strukturiert war<sup>80</sup>. Eine MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK) <sup>81</sup> aktiviert eine MAPK-Kinase (MAPKK) (s. Abb. 2), die ihrerseits die dritte und letzte Modulkomponente, eine MAPK, aktivieren kann. Neuere Erkenntnisse über eine zusätzliche Hierarchie-Ebene und laterale Signalweiterleitungen erweitern das traditionelle Konzept von der Signaltransduktion der MAPKs.

MAPKKK sind Serin/Threonin-Kinasen <sup>82</sup>, die durch Phosphorylierung aktiviert werden. Diese Phosphorylierung kann durch kleine GTP-bindende Moleküle der Ras- oder Rho-Familie sowie durch MAPKKKK vermittelt werden <sup>83</sup>. Diese MAPKKKK machen deutlich, daß eine zusätzliche Hierarchieebene bei der Signaltransduktion der MAPKs beteiligt sein kann.

MAPKK sind Kinasen dualer Spezifität, d.h. sie erkennen und phosphorylieren ein Thr(eonin)-X-Tyr(osin) Motif in der Aktivierungsschleife (Activation Loop“) der MAPK <sup>84</sup>. MAPK schließlich sind Serin/Threonin-Kinasen, die zusätzlich einen Prolin-Rest in der Substratregion erkennen <sup>85;86</sup>.

Man kann die derzeit bekannten MAPK von Mammalier in fünf MAPK-Module zusammenfassen. Die einzelnen Module sind aus verschiedenen Vertretern der MAPKKs, MAPKKs und MAPKs zusammengesetzt, so daß sie durch unterschiedliche extrazelluläre Stimuli aktiviert werden können und die entstehenden Signale an distinkte Transkriptionsfaktoren oder Kinasen weiterleiten können (s. Abb. 2). Unter anderem sind MAPKs in der Lage die Transkriptionsfaktoren Elk-1, c-Jun und NF-ATc3 zu aktivieren.

**Abb.2**

Schematische Übersicht von MAPK-Modulen in Mammaliern.

Dargestellt sind die derzeit bekannten 5 Module von MAPKs mit ihren aktivierenden Stimuli und einigen ihrer intrazellulären Zielproteinen (siehe auch <sup>87-89</sup>). Zum besseren Verständnis der umfangreichen Literatur sind einige Akronyme und Synonyme nachfolgend erklärt:

**MAPKKKs**: **ASK1** - *A*poptosis *S*ignal-*R*egulating *K*inase 1 oder MAPKKK5, **DLK** - *D*ual *L*eucine-*Z*ipper *B*eating *K*inase (= MUK oder ZPK), **MEKK** - *M*APK/*E*RK *K*inase *K*inase (MEKK 1 - 3; MEKK 4 = MTK1), **MLK3** - *M*ixed-*L*ineage *K*inase 3 (= SPRK oder PTK1), **PAK** - *p*21-*A*ctivated *K*inase, **TAK1** - *T*GFβ-*A*ctivated *P*rotein *K*inase 1, **Tpl-2** - *T*umor *P*rogression *L*ocus- 2 oder Cot.

**MAPKKs**: **MEK** - *M*APK/*E*RK *K*inase (MEK 1 = MKK1, MEK 2 = MKK2), **MKK4** - (MKK4 = SEK1, SERK1, SKK1 oder JNKK1), **MKK6** - (MKK4 = *S*APK *K*inase 3), **MKK7** - (MKK7 = SEK2, SKK4 oder JNKK2).

**MAPKs**: **ERK** - *E*xtracellular-*S*ignal *R*egulated *K*inase (ERK 1 = p44MAPK, ERK 2 = p42MAPK), **JNK** - *c*-*J*un *A*mino-*T*erminale *K*inase (JNK 1 = SAPKγ oder SAPK1c; JNK 2 = SAPKα oder SAPK1a; JNK 3 = SAPKβ, SAPK1b oder p49F12), **p38** - *p*38 MAPK (p38 α = *S*tress-*A*ctivated *P*rotein *K*inase 2a, p38 β = SAPK2b, p38 γ = SAPK3, p38 δ = SAPK4).

Der Transkriptionsfaktor Elk-1 gehört zu der Unterfamilie der „*T*ernary *C*omplex *F*actors“ (TCF), welche zu der Familie der Ets-Proteine zählt <sup>90</sup>. Elk-1 kann durch drei MAPKs-Module aktiviert werden, dem JNK-Pfad, der p38 MAPK-Kaskade und dem ERK1/ERK2-Modul <sup>91</sup>. Elk-1 kann zur Transkription des AP-1 Mitglieds c-Fos beitragen, indem es von



sog. „Serum Response Factors“ (SRF) an das „Serum Response Element“ (SRE) des c-Fos Promotors rekrutiert wird <sup>90</sup>.

Ein anderer Transkriptionsfaktor, der durch die JNK MAPKs aktiviert wird, ist c-Jun. c-Jun gehört zu der Transkriptionsfaktorfamilie AP-1 (s. Abschnitt 4.6). Interessanterweise wurden in dem Promotor von MCP-1 Bindungsstellen für AP-1 beschrieben <sup>92;93</sup>.

Der Transkriptionsfaktor NF-ATc3 kann durch „Cross-Talk“ der MAPKs phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung von NF-ATc3 durch die JNK-Module führt zum nukleärem Export und cytoplasmatischer Retention dieses Transkriptionsfaktors. Dadurch wird eine Signaltransduktionskaskade anderen Ursprungs, die über eine intrazelluläre Calciuserhöhung, Calcineurinaktivierung und nachfolgende NF-ATc3-Aktivierung induziert wird, unterbrochen. Der - in diesem Falle negative - Einfluß einer Signalkaskade auf einen anderen Signalpfad ist ein Beispiel für sogenanntes „Cross-Talk“ bei der Signaltransduktion. Neben diesem Beispiel gibt es noch weitere Stellen in der Signalkaskade der MAPKs, an denen „Cross-Talk“ stattfinden kann. So ist auch zwischen einzelnen Modulen der MAPK eine laterale Signalübertragung, d.h. „Cross-Talk“, möglich (s. Abb. 2 und <sup>87</sup>).

Zur Untersuchung der Rolle von MAPKs bei der Genexpression, Zelldifferenzierung, Wachstumsprozessen oder anderen Vorgängen werden diverse Herangehensweisen eingesetzt. Eine Möglichkeit besteht darin, pharmakologische Inhibitoren für distinkte Komponenten einer Signaltransduktionskaskade zu verwenden und deren Einfluß zu untersuchen. So wird beispielsweise mit der Substanz SB203580 versucht, die Bedeutung der p38 MAPKs zu evaluieren. SB203580 ist strukturell ein Pyridinyl-Imidazol-Inhibitor, der die ATP-Bindungsstelle von p38 MAPKs blockiert, und selektiv die p38 $\alpha$  und p38 $\beta$  MAPK, nicht aber die p38 $\gamma$  und p38 $\delta$  MAPK inaktiviert <sup>94-97</sup>. Neben diesem p38 MAPK-Inhibitor gibt

es noch weitere wie beispielsweise PD169316 <sup>98</sup>. Zur Analyse der Bedeutung der ERK1/ERK2-Signalkaskade werden unter anderem die Substanzen U0126 und PD098059 verwendet <sup>99-103</sup>. Beide sind Inhibitoren der MAPKKs MEK1 bzw. MEK2, wodurch eine Aktivierung von ERK1 und ERK2 verhindert wird (s. Abb. 2). Es konnte damit für die ERK-Kaskade gezeigt werden, daß eine Inhibition durch U0126 die LPS-induzierte Synthese des Chemokins IL-8 in Monocyten/Makrophagen blockieren konnte <sup>104</sup>.

Zwei weitere Tatsachen werfen Licht auf eine zusätzliche Ebene der Komplexität der Signaltransduktion. Es konnte für ERKs nachgewiesen werden, daß die biologischen Effekte der Aktivierung einer Signaltransduktionskaskade sowohl vom zeitlichen Kontext als auch vom Zelltyp abhängen. So führt eine vorübergehende ERK-Aktivierung zum Wachstum von PC12-Zellen, wohingegen eine andauernde ERK-Aktivierung zu einer Differenzierung von PC12-Zellen führt <sup>105</sup>. Weiterhin löst eine andauernde Stimulation von ERK in PC12-Zellen eine Differenzierung aus, wohingegen Fibroblasten darauf mit einer Wachstumsantwort und Transformation reagieren <sup>106</sup>.

Anhand der Signalpfade der MAPKs werden einige Prinzipien und Methoden aus dem Gebiet der Signaltransduktion deutlich. Die Signaltransduktion kann kaskadenartig über mehrere Ebenen von Kinasen erfolgen. Am Ende einer Signalkette können Transkriptionsfaktoren oder Kinasen als molekulare Ziele stehen. Verschiedene Signale über diverse Pfade können integriert werden, was am Beispiel der Elk-1-Aktivierung deutlich wird. Bei der Signaltransduktion kann auch eine gegenseitige Beeinflussung verschiedener Kaskaden oder eine laterale Signalweiterleitung, der sog. „Cross-Talk“, beobachtet werden. Dieser kann aktivierenden Charakter haben (s. Abb.1, MEKK1 und Abb. 2) oder aber auch anderen Kaskaden entgegenwirken, was beispielsweise an der inaktivierenden Phosphorylierung von NF-ATc3 durch die JNK Kaskade deutlich wird. Darüber hinaus wird an der ERK-

Aktivierung deutlich, daß der Zelltyp und die Aktivierungsdauer die biologischen Effekte einer Signaltransduktion beeinflussen können.

Aus diesen Tatsachen läßt sich erkennen, daß bei der Signaltransduktion extrazelluläre Stimuli oder Signale durch komplexe intrazelluläre Interaktionen in distinkte zelluläre Antworten umgesetzt werden. Pharmakologische Inhibitoren können bei der Entschlüsselung der Bedeutung einzelner Signaltransduktionspfade hilfreich sein.

Neben den beiden Signaltransduktionswegen, d.h. dem IKK-I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B Pfad und der MAPKKK-MAPKK-MAPK-Kaskade, spielt die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC)-Familie bei der MCP-1-Expression eine Rolle. So führt die Aktivierung von PKCs durch Phorbolster zur MCP-1 Bildung in humanen Glioblastomzellen <sup>92</sup>.

## 4.2. Proteinkinase C

Im Jahre 1977 gelang es der Arbeitsgruppe um Y. Nishizuka die Proteinkinase C aufzureinigen und zu charakterisieren <sup>107</sup>. Ursprünglich wurden PKCs mit drei kennzeichnenden Paradigmen beschrieben : 1.) Calcium und/oder Lipide sind die einzigen Regulatoren der PKC. 2.) PKC-Isozyme translozieren nach einer Aktivierung vom Cytosol an die Plasmamembran. 3.) PKC Mitglieder sind die einzigen intrazellulären Rezeptoren für Phorbolster und Diacylglycerol (DAG), ein sog. Lipid sekundärer Botenstoff („Second Messenger“). Mittlerweile reichen diese Paradigmen nicht mehr aus, um die PKC Familie und andere zusätzliche Phorbolster-Rezeptoren akkurat zu definieren.

Hinsichtlich des ersten Paradigmas, der Regulation durch Calcium oder Lipide, mußten die Mitglieder dieser Familie in die drei Klassen der „conventional“ bzw. klassischen („cPKCs“), der „novel“ bzw. neuartigen („nPKCs“) und der „atypischen“ („aPKCs“) PKC-Isozyme

eingruppiert werden <sup>108</sup>. Die cPKCs benötigen zu ihrer Aktivität sowohl Calcium als auch Phospholipide. Zu dieser Gruppe gehören die Kinasen PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I, PKC $\beta$ II und PKC $\gamma$ . Die Klasse der nPKCs sind auf Phospholipide als Cofaktor angewiesen, die Gegenwart von Calcium ist jedoch nicht erforderlich. Zu dieser Unterfamilie zählen die PKC $\delta$ , die PKC $\epsilon$ , die PKC $\eta$  und die PKC $\theta$ . Die Klasse der „atypischen“ PKCs wurden nach ihrer Unabhängigkeit von den Cofaktoren Calcium und Phospholipid benannt. Beschriebene Vertreter dieser Gruppe sind die PKC $\zeta$  und die PKC $\iota$  (das homologe Protein in der Maus heißt PKC $\lambda$ ). Ein pharmakologischer Inhibitor für cPKCs ist die Substanz Gö 6976 <sup>109;110</sup>. Die Substanz Gö 6983 ist in der Lage, Mitglieder aus der Klasse der nPKCs zu inhibieren <sup>109</sup>. Einen Inhibitor breiter Selektivität, der unter anderem auch gegen die PKA und die PKG wirksam ist, repräsentiert Staurosporin <sup>111</sup>.

Das erste Paradigma der Regulation durch Calcium und Phospholipide berücksichtigt zwei Aspekte nicht. Die Klasse der aPKCs sind unabhängig von Calcium und Phospholipiden; darüber hinaus wird die Aktivität und Reifung der PKC-Mitglieder zusätzlich durch Transphosphorylierungen (PDK1, <sup>112;113</sup>) und Autophosphorylierungen (PKC $\beta$ II, <sup>114;115</sup>) reguliert.

Auch das zweite Paradigma der Rekrutierung von PKC-Mitgliedern an die cytosolische Membran wurde durch die Befunde der letzten Jahre hinterfragt. Die Translokation von Mitgliedern dieser Familie in den Zellkern und die Phosphorylierung nukleärer Proteine wie Lamin B, Topoisomerase I, p53, Myogenin, des Vitamin D3-Rezeptors, TdT und Nucleolin geht über die postulierten subzellulären Verteilungen hinaus <sup>116;117</sup>.

Schließlich hat auch das letzte Paradigma über die PKC, daß sie die einzigen intrazellulären Rezeptoren für Phorbolster und DAG seien, seine uneingeschränkte Gültigkeit verloren. Zur Zeit werden phorbolsterbindende Proteine in drei Gruppen eingeteilt: die PKCs, die PKC-verbundenen Kinasen und die sog. „Non-Kinase Phorbolster Receptors“ <sup>108</sup> wie Ras-GRP.

Zu den PKCs gehören die Isozyme der „conventional“, der „novel“ und der „atypischen“ Klasse. Den PKC-verwandten Kinasen werden die PKC $\mu$  (oder PKD) und die sog. „PKC-Related Kinases“ (PRKs) wie PRK1 zugerechnet <sup>118</sup>. Beispiele für die Gruppe der „Non-Kinase Phorbol ester Receptors“ sind die „ $\alpha$ -“ und „ $\beta$ -Chimaerins“, Ras-GRP und die homologen *Caenorhabditis elegans* Unc-13 Proteine in Mammaliern wie Munc13-1 und Munc13-2. Die Existenz dieser zusätzlichen molekularen Ziele der PRKs und der „Non-Kinase Phorbol ester Receptors“ deutet an, daß Phorbol ester ein komplexeres Signaltransduktionsnetzwerk aktivieren, als bisher angenommen, was bei der Interpretation von Pathogenitätsmechanismen und experimenteller Daten zu berücksichtigen ist <sup>119</sup>.

Das Wissen um die molekularen Ziele der PKC-Isozyme ist in den letzten Jahren stark angewachsen. Zunächst war der Einfluß auf die Transkriptionsfaktorfamilie AP-1 bekannt: Phorbol ester wie „12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat“ (TPA) aktivieren das c-Fos-Gen, und eine Behandlung von Zellen mit TPA kann zur Bindung von AP-1-Mitgliedern an bestimmte Promotorregionen führen, den danach benannten „TPA Response Elements“ oder TRE-Sequenzen. Neueren Datums sind jedoch die Erkenntnisse, daß aPKC-Mitglieder über eine Phosphorylierung von IKKs zu der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B beitragen können <sup>120;121</sup>. Mittlerweile sind auch neue Mechanismen der Aktivierung der MAPK-Kaskaden durch PKC-Isozyme bekannt <sup>122</sup>. Ein weiteres Zielmolekül für PKCs, welches neue Wege des „Cross-Talks“ ermöglicht, ist das Ankerprotein „A Kinase Anchoring Protein 79“ (AKAP79). AKAP79 bindet die drei Schlüsselenzyme PKA, PKC und Calcineurin, die jeweils unterschiedlichen Signaltransduktionspfaden angehören <sup>123;124</sup>. Es konnte auch schon zu einem früheren Zeitpunkt gezeigt werden, daß cyclisches 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) bzw. die cAMP-abhängige Kinase PKA die Aktivierung von AP-1-Mitgliedern durch PKCs moduliert <sup>125</sup>. Darüber hinaus gibt es noch weitere Interaktionsmöglichkeiten für PKCs über PKC-bindende Proteine, deren Ausmaß noch nicht

zufriedenstellend erfaßt ist. Beispiele hierfür sind die RACKs („Receptors for Activated CKinase“), STICKs („Substrates That Interact With C Kinases“) wie die MARCKs, einige „Scaffolding“ Proteine wie die AKAPs und das 14-3-3 oder einzelne Proteine wie das Syndecan-4<sup>108</sup>.

### 4.3. Calcineurin und NF-AT

Die Signaltransduktion der PKC-Isozyme zeigt am Beispiel der conventionellen PKCs, daß die Aktivierung einer Signalkaskade von bestimmten Cofaktoren wie Calcium abhängen kann. Darüber hinaus kann Calcium durch seine Funktion als sog. „Second Messenger“ die Generierung von Signalen über den Calcineurin-Pfad und die Calmodulin-kinase-Kaskade einleiten.

Calcineurin (CaN), auch Proteinphosphatase 2B (PP2B) genannt, ist eines der wichtigen calmodulinbindenden Proteine. CaN ist eine Serin/Threonin-Phosphatase unter der Kontrolle von Calcium/Calmodulin und spielt eine entscheidende Rolle bei der Kopplung von Ca<sup>2+</sup>-Signalen an zelluläre Antworten<sup>126;127</sup>. Calcineurin ist ein Heterodimer, das aus einer katalytischen Untereinheit mit calmodulinbindenden Eigenschaften (CaN A) und einer regulatorischen Untereinheit (CaN B) besteht, die Calcium bindet<sup>128</sup>. Für CaN sind zwei gut charakterisierte pharmakologische Inhibitoren bekannt, FK506 und Cyclosporin A (CsA). FK506 kann als Komplex mit dem Immunophilin FK506-Bindendes Protein-12 (FKBP-12) an eine Domäne anlagern, die aus der CaN B-bindenden Helix von CaN A und CaN B gebildet wird<sup>129</sup>. Der Inhibitor Cyclosporin A bindet zusammen mit Cyclophilin an die sog. „Latch“-Region von CaN, was zu einer Hemmung der Phosphatase Calcineurin führt<sup>130</sup>.

CaN selbst kontrolliert die Translokation der sog. „Nuclear Factors of Activated T Cells“ (NF-ATs oder NF-ATs) vom Cytoplasma in den Zellkern, indem die Phosphataseaktivität dieses Enzyms zur Dephosphorylierung kritischer Aminosäurereste aus dem N-terminalen Anteil jener Transkriptionsfaktoren führt. Die Mitglieder dieser Transkriptionsfaktorfamilie zeichnen zwei charakteristische Regionen aus, die NF-AT-Homologie-Region (NHR) und die DNA-bindende Domäne (DBD). Die NHR kann Calcineurin binden; sie enthält die kritische Aminosäurereste für die Dephosphorylierung, und die NHR kontrolliert die nukleäre Translokation<sup>131;132</sup>. Die DBD zeigt Ähnlichkeiten zur Rel-Homologie-Region anderer Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und ermöglicht die Bindung an die Promotorregionen der verschiedenen Zielgene wie beispielsweise IL-2<sup>133</sup>.

Verschiedenste Stimuli können zu einer Aktivierung von NF-AT Mitglieder führen. Die Ligation von Immunrezeptoren wie beispielsweise des T-Zellrezeptors, die Stimulation über solche G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wie des m3-muscarinischen Acetylcholin-Rezeptors oder die Behandlung von Zellen mit pharmakologischen Substanzen wie dem Calcium-Ionophor A23187 oder dem Inhibitor der endoplasmatischen Reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase Thapsigargin ermöglichen die nukleäre Translokation der entsprechenden NF-AT-Mitglieder<sup>134-137</sup>.

Bislang sind 5 NF-AT-Mitglieder mit ihren jeweiligen Isoformen beschrieben worden. Um die historisch entstandene Nomenklatur zu vereinfachen wurden neue Bezeichnungen vorgeschlagen<sup>137;138</sup>. Die Übersichtstabelle 1 illustriert die daraus folgende Ordnung :

<u>Nomenklatur</u>	
postuliert	historisch
NFAT1	
• NF-AT1a	NF-AT1p, NF-ATc2, NF-AT1A
• NF-AT1b	NF-AT1b
• NF-AT1c	NF-AT1c
NF-AT2	
• NF-AT2a	NF-ATc, NF-ATc1, NF-ATc.α
• NF-AT2b	NF-ATc.β
NF-AT3	
• NF-AT3	NF-AT3
NF-AT4	
• NF-AT4x	NF-ATx, NF-ATc3
• NF-AT4a, b, c	NF-AT4a, b, c
NF-AT5	
• NF-AT5	TonEBP, NFATL1

**Tab. 1:**

NF-AT Mitglieder und ihre Isoformen

Die einzelnen Mitglieder sind vielfach beschrieben worden <sup>137;138</sup>. Eine Ausnahme bildet NF-AT5, welches vor kurzem charakterisiert worden ist <sup>139;140</sup>.

Hinsichtlich der Zielgene von NF-AT-Mitgliedern gibt es viele Hinweise über eine Beteiligung an der Expression von Zytokinen. Es wurde sogar für die Bildung des CXC-Chemokins IL-8 eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF-AT impliziert <sup>141</sup>. Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, daß NF-AT-Proteine mit Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie bei der Bindung und der Transaktivierung kooperieren können <sup>142</sup>.

Auch für die Kaskade des Calcium-CaN-NF-AT-Signals gibt es Befunde, die auf Wechselwirkungen oder „Cross-Talk“ mit anderen Signalwegen hindeuten. So wurden Interaktionen zwischen dem MAPK-Signalpfad und NF-ATc3 beschrieben. Dabei gibt es zwei Wirkmechanismen. Erstens wurde eine direkte Phosphorylierung von NF-ATc3 durch die JNK(2) beschrieben, was zu einem nukleären Export von NF-ATc3 führt <sup>143</sup>. Zweitens kann



MEKK1 über die Caseinkinase 1 eine Phosphorylierung von NF-ATc3 induzieren, welches eine nukleäre Translokation verhindert <sup>144</sup>. Neben diesem sog „Cross-Talk“ zwischen den MAPK-Pfad und der NF-AT-Signalkette gibt es noch Interaktionen zwischen der Proteinkinase A (PKA) und dem CaN-NF-AT-Signalweg. So reguliert cAMP die NF-AT-abhängige IL-2-Bildung über einen Mechanismus, der die Phosphorylierung von NF-AT3 durch die PKA involviert und dem „Scaffolding“ Proteins 14-3-3 eine aktive Rolle zuschreibt <sup>145</sup>. Darüber hinaus wurde die Möglichkeit der negativen Regulation der NF-AT-abhängigen Transkription durch die Histon Acetyltransferase CBP („p300/ CREB-Binding Protein“) nachgewiesen <sup>146</sup>.

Neben diesen erwähnten Wechselwirkungen zwischen Signaltransduktionskaskaden bei denen der NF-AT-Pfad Ziel der Interaktion ist, wurde auch eine Dephosphorylierung von Elk-1 durch Calcineurin beschrieben <sup>147</sup>. Auf diese Weise kann die Calcium-CaN-NF-AT Kaskade negativ auf die Aktivierung von Elk-1 durch den MAPK Pfad einwirken.

Darüber hinaus zeichnet die NF-AT-Signalkette noch die Eigenschaft der Signalintegration aus. Die Kooperation zwischen NF-AT- und AP-1-Mitgliedern ermöglicht die positive Verknüpfung zwischen verschiedenen Pfaden <sup>148</sup>.

#### 4.4. Calmodulinkinase-Kaskade

Calcium ist als sog. „Second Messenger“ nicht nur an der Aktivierung von Signaltransduktionspfaden über die PKCs und Calcineurin beteiligt, sondern Calcium induziert als Calcium-Calmodulin-Komplex auch die Calmodulinkinase-Kaskade.

Eine Erhöhung des intrazellulären Calciums ermöglicht die Bindung von Calcium an das Ca<sup>2+</sup>-Rezeptorprotein Calmodulin (CaM). Calmodulin kann die „CaM Kinase Kinase“

(CaMKK) aktivieren, die ihrerseits zusammen mit CaM die „CaM Kinase“ (CaMK) aktiviert. Daraufhin kann die CaMK ihre molekularen Ziele wie Transkriptionsfaktoren phosphorylieren. Für diese Kaskade sind mindestens zwei CaMKKs charakterisiert worden, die CaMKK $\alpha$  und die CaMKK $\beta$ <sup>149-151</sup>. Zu den CaMKs zählen die CaMKI und die CaMKIV, die ursprünglich CaM-Kinase Gr genannt wurde, und bei der durch Spleißen zwei Isoformen gebildet werden können. Die CaMKKs und die CaMKs teilen sich gemeinsame strukturelle Merkmale. Beide Enzymklassen besitzen eine autoinhibitorische Domäne (AID)<sup>152</sup> und eine calmodulinbindende Domäne (CBD). Die Bindung von Ca<sup>2+</sup>-CaM an die CBD ändert die Konformation der AID, so daß diese Region die Substratbindung des Enzyms nicht mehr blockiert.

Als Substrat für die CaMKI wurde unter anderem CREB postuliert<sup>153</sup>. Als Substrate für die CaMKIV gelten CREB und sog. „Serum Response Factors“ (SRFs)<sup>154-156</sup>. Darüber hinaus wurde auch eine Phosphorylierung von CBP durch die CaMKIV beobachtet<sup>157</sup>.

Auch die CaMK sind in einem Netzwerk von Interaktionen mit anderen Signalpfaden eingebunden. So besteht über zwei Wege die Möglichkeit zum „Cross-Talk“ mit der MAPK-Signaltransduktionskaskade. Die CaMKIV kann das kleine GTP-bindende Protein Rap-1b *in vitro* phosphorylieren, welches durch eine Interaktion mit B-Raf das ERK-MAPK-Modul aktivieren kann (s. o. Abschnitt MAPKs,<sup>158</sup>). Als zweiter Weg der Einflußnahme auf die MAPK-Kaskade wurde die Aktivierung von JNK und p38 MAPKs durch CaMKIV und CaMKK beschrieben<sup>159</sup>. Auch zwischen der cAMP-PKA abhängigen Signaltransduktion und dem CaMK-Pfad konnte „Cross-Talk“ nachgewiesen werden. Einerseits kann die cAMP-abhängige PKA die Aktivität der CaMKK reduzieren<sup>160;161</sup>. Andererseits kann die CaMKIV die Typ 1-Adenylat Cyclase inhibieren<sup>162</sup>.

## 4.5. Intrazelluläres Calcium

Die erwähnten Signaltransduktionskaskaden der MAPKs, der PKCs, der CaMKs und der Phosphatase Calcineurin illustrieren die Schlüsselrolle, die Calcium für die Signaltransduktion in Zellen spielen kann. In der Tat gibt es Regulationsmechanismen zur Kontrolle cytoplasmatischer Calciumkonzentrationen, die dieser Schlüsselrolle von Calcium Rechnung tragen.

Das dynamische Gleichgewicht von Calcium wird durch die koordinierte Aktivität von  $\text{Ca}^{2+}$  Transportern und  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteinen ermöglicht, die für einen kontrollierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux zwischen subzellulären Kompartimenten und dem extrazellulären Raum sorgen. Spezifische Pumpen und Kanäle übernehmen die Funktion von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportern. Calmodulin ist ein Beispiel für ein  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Protein. Das Cytosol und das endoplasmatische bzw. sarkoendoplasmatische Reticulum (ER bzw. SER) repräsentieren die wesentlichen subzellulären Kompartimente, die für das dynamische Gleichgewicht von Calcium eine Rolle spielen <sup>163</sup>. Aber auch zwischen dem Mitochondrium und dem ER findet ein Calcium-Austausch statt, der Einfluß auf den mitochondrialen Metabolismus hat <sup>164</sup>. Der Einstrom von Calcium in die Zelle wird durch bestimmte Kanäle, den sog. „Store Operated Channels“ (SOCs) ermöglicht. Sie können sich bei einer Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher öffnen, um den Verlust an Calcium auszugleichen <sup>165</sup>. Für den aktiven Transport des Kations aus der Zelle sorgt eine bestimmte Pumpe, die Plasma Membran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA) <sup>166</sup>. Für den Calcium-Flux zwischen dem ER und dem Cytosol sorgen unter anderem die „Sarco-Endoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase“ (SERCA) und der Inositoltriphosphat ( $\text{IP}_3$ )-Rezeptor. Dabei pumpt die SERCA unter Verbrauch von ATP Calcium aus dem Cytosol in das ER, wohingegen der  $\text{IP}_3$ -Rezeptor einen Kanal kontrolliert, der den Ausstrom von Calcium aus

dem ER in das Cytosol ermöglicht<sup>167;168</sup>. Der „Ryanodine“ Rezeptor steuert einen weiteren Kanal gleicher Orientierung.

Zur Erhöhung des cytoplasmatischen Calciums können Calcium-Ionophore oder Inhibitoren der SERCA eingesetzt werden. Das Ionophor A23187 ermöglicht als mobiler Ionen-Carrier den Import von extrazellulärem Calcium. Die Verwendung des SERCA-Inhibitors Thapsigargin verhindert die Entfernung des Kations aus dem Cytoplasma, was zu einer sekundären Erhöhung des cytoplasmatischen Calciums führt<sup>169</sup>.

In jüngster Zeit wurde berichtet, daß eine intrazelluläre Calciumerhöhung unter anderem die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und NF-AT aktivieren kann. So konnte gezeigt werden, daß nach einer Stimulation von B-Lymphozyten die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und NF-AT infolge einer intrazellulären Calciumerhöhung aktiviert wurden<sup>170</sup>. Darüber hinaus wurde eine Aktivierung der JNK-MAPK und eines seiner Substrate, ATF2, nachgewiesen. In einer weiteren Arbeit wurde beschrieben, daß eine Behandlung von T-Lymphozyten mit Thapsigargin zur Aktivierung von NF-AT und NF- $\kappa$ B führt<sup>171</sup>.

#### 4.6. Transkriptionsfaktorfamilien

Wie schon näher ausgeführt wurde, können die Signaltransduktionswege zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, AP-1 und NF-AT an der Chemokinexpression beteiligt sein. LPS kann die MCP-1 Bildung aktivieren<sup>24</sup>; die Stimulation von murinen Fibroblasten mit TNF- $\alpha$  führt zur NF- $\kappa$ B-abhängigen MCP-1-Expression<sup>172</sup>, und für die Bildung des CXC-Chemokins IL-8 wurde eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF-AT impliziert<sup>141</sup>.

Bei einer Stimulation mit LPS führt die Signaltransduktion über den TLR4 zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B ( s. Abb. 1 und Erläuterungen im Abschnitt 4. ). In Mammaliern sind fünf Rel/NF- $\kappa$ B Familienmitglieder bekannt. Rel A (p65), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF- $\kappa$ B1) und p100/p52 (NF- $\kappa$ B2) <sup>173</sup>. Alle Mitglieder dieser Familie enthalten eine aminoterminal Rel-Homologie Domäne, die annähernd 300 Aminosäuren umfaßt und die die DNA-Bindung sowie die Dimerisierung vermittelt. Nahezu alle möglichen Kombinationen von NF- $\kappa$ B Homo- und Heterodimeren wurden *in vivo* gefunden <sup>174</sup>. p50 und p52 entstehen durch Proteolyse von p105 bzw. p100. p105 und p100 besitzen C-terminal ein sog. „Ankyrin Repeat“-Motiv, welches auch bei den I- $\kappa$ B-Mitgliedern vorkommt. p100 und p100 übernehmen wie I- $\kappa$ B $\alpha$ , I- $\kappa$ B $\beta$  und I- $\kappa$ B $\epsilon$  die Funktion der cytoplasmatischen Retention der NF- $\kappa$ B-Mitglieder durch Maskierung der nukleären Lokalisierungssequenz (NLS) <sup>175;176</sup>. Die Phosphorylierung der I- $\kappa$ Bs durch die IKKs leitet eine Polyubiquitinierung ein, der eine Degradation der I- $\kappa$ Bs durch das 26S Proteasom folgt . Die Entfernung der I- $\kappa$ Bs ermöglicht die nukleäre Translokation der NF- $\kappa$ B-Mitglieder und ihre Genaktivitäten. NF- $\kappa$ B-Mitglieder können mit Coaktivatoren wie CBP und Transkriptionsfaktoren wie c-Jun, „CCAAT/Enhancer-Binding Protein b“ (CEBP $\beta$ ) und Sp1 interagieren <sup>177</sup>. Auf diese Weise kann die NF- $\kappa$ B Aktivität in andere Signaltransduktionskaskaden integriert werden.

Desweiteren kann die NF- $\kappa$ B-abhängige Transkription durch negative Rückkopplungsmechanismen kontrolliert werden. So kann die nukleäre Translokation von NF- $\kappa$ B nicht nur das entsprechende Zielgen aktivieren, sondern es wird auch die Genexpression von I- $\kappa$ B $\alpha$  induziert, wodurch eine Inhibition von NF- $\kappa$ B initiiert wird <sup>173</sup>.

Der Transkriptionsfaktor AP-1 kann unter anderem durch die Signaltransduktionskaskade der MAPKs aktiviert werden (s. Abschnitt 4.1).

AP-1 („Activating Protein-I“) besteht typischerweise aus Homo- oder Hetero-Dimeren der Fos-(v-Fos, c-Fos, FosB, Fra1, Fra2) und Jun-(v-Jun, c-Jun, JunB, JunD) Proteine<sup>178</sup>. Jun-Proteine können im Gegensatz zu den Fos-Proteinen Homodimere bilden. AP-1 bindet und erkennt die DNA-Sequenz 5'-TGACTCA-3', das sog. „12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA)-Responsive Element“ (TRE) Motiv. Jedoch können Jun-Proteine als Heterodimere mit den „Activating Transcription Factors“ (ATFs) noch ein anderes DNA-Element binden, das „cAMP Responsive Element“ (CRE) mit der Nukleotidfolge 5'-TGACGTCA-3'<sup>179</sup>. Neben der Interaktion mit ATF-Mitgliedern, kann AP-1 noch kooperativ oder synergistisch mit NF-AT-Mitgliedern (s. Abschnitt 4.3) und NF- $\kappa$ B-Mitgliedern zusammenwirken<sup>180</sup>.

Die Aktivität der AP-1-Familie kann durch die Induktion der eigenen Genexpression, die Phosphorylierung vorhandener AP-1-Proteine und deren Modulation durch Redox-Prozesse reguliert werden.

Beispielsweise kann die Genexpression des c-Fos Gens durch das Vorhandensein einer CRE-Region, eines „Sis Inducible Enhancer“ (SIE) und eines „Serum Response Element“ (SRE) in seinem Promotor auf verschiedenste Art und Weise induziert und moduliert werden<sup>180-182</sup>. So können durch diese Promotorelemente cAMP-abhängige Signalkaskaden, der JAK-STATs-Pfad und die SRFs die c-Fos-Induktion beeinflussen. Tatsächlich induziert Serum die c-Fos-Expression, wobei die Aktivierung von SRF, die an das SRE des Promotors binden<sup>180</sup>, eine wesentliche Rolle spielen.

Die aktivierende Phosphorylierung von zwei Aminosäureresten in der Aktivierungsschleife von c-Jun durch JNK demonstriert die Regulation von AP-1-Mitgliedern durch Phosphorylierung<sup>183;184</sup>.

Als weitere regulatorische Möglichkeit können reduzierende und oxidierende Substanzen die AP-1 abhängige Transkription modulieren. So können beispielsweise der redox-sensitive Faktor Thioredoxin und der Redox Faktor-1 (Ref-1) unter geeigneten Bedingungen AP-1 aktivieren<sup>185</sup>.

## 5. Fragestellung der Arbeit

Angesichts der zentralen Stellung von Monozyten und Makrophagen in der (angeborenen) Immunabwehr sowie der geschilderten Rolle von MCP-1 für diverse protektive Mechanismen des Immunsystems, als auch der Beteiligung dieses Chemokins an der Pathogenese von verschiedenen Erkrankungen, stellt sich die Frage, wie die Expression von MCP-1 in monozytären Zellen, d.h. Makrophagen und Monozyten, reguliert ist.

Zum Zeitpunkt der Aufnahme der Promotionsarbeit existierten zahlreiche Arbeiten über die Regulation von MCP-1 in nicht-monozytären Zellen wie Fibroblasten, Glioblastomzellen, Endothelzellen, Chondrozyten und Keratinozyten<sup>24</sup>, aber wenig war über die molekulare Regulation von MCP-1 in Monozyten/Makrophagen bekannt. Wie schon erwähnt worden ist, konnten in diesen nicht-monozytären Zellen Stimuli wie LPS, Phorbol ester und Zytokine die MCP-1-Expression induzieren. Teilweise wurde die intrazelluläre Signaltransduktion zur Aktivierung der MCP-1-Expression in nicht-monozytären Zellen untersucht. Auch gab es einige experimentelle Arbeiten über die Beteiligung von Transkriptionsfaktoren und Regionen des MCP-1-Promotors für nicht-monozytäre Zellen wie beispielsweise Glioblastomzellen<sup>92</sup>. Von der Regulation der MCP-1-Expression in Monozyten und Makrophagen gab es jedoch kein detailliertes Bild.

Die Promotionsarbeit hatte zum Ziel, zur Erweiterung des Wissens über die molekulare Regulation des Chemokins MCP-1 in monozytären Zellen beizutragen. Dabei sollte die Wirksamkeit von Stimuli zur Aktivierung der MCP-1-Expression, die Beteiligung von Proteinkinasen an der Signaltransduktion zur Aktivierung der MCP-1-Expression, und die Rolle von Transkriptionsfaktoren untersucht werden. Zusätzlich sollten Hinweise für möglicherweise involvierte Regionen des MCP-1-Promotors für die Expression in monozytären Zellen erarbeitet werden.

## II. Material und Methoden

### 1. Materialien

#### 1.1. Laborgeräte

Die verwendeten Geräte sind tabellarisch aufgeführt :

<b>Bezeichnung</b>	<b>Typ/ Modell</b>	<b>Hersteller</b>
FLIPR	FLIPR 384	Molecular Devices Corporation
Digitaler Multi-Imager für Weißlicht-, Fluoreszenz- und Lumineszenz-Aufnahmen	Fluor-S Multi Imager samt Multianalyst Software	Biorad Laboratories GmbH
Elektrophorese-Kammer und Zubehör für EMSA-Analysen	Protean IIXI-System	Biorad Laboratories GmbH
Elektrophorese-Kammer und Zubehör für Western-Analysen	NuPAGE Electrophoresis System	Invitrogen, NOVEX- Electrophoresis GmbH
Magnetischer Zellseparator (MACS)	Vario MACS,	Miltenyi Biotec
Photometer	UV-2401PC/ UV-2501PC	Shimadzu
Thermocycler	GeneAmp 9600	PE Biosystems
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf AG
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Tischzentrifuge	Biofuge 13	Haereus

**Tab.1**

Übersicht über verwendete (Groß-)Geräte



## 1.2. Substanzen, Lösungen, Puffer

Zur Behandlung der Zellen wurden folgende Substanzen eingesetzt (s. Tab. 2).

Substanz	Stammlösg.	LM.	EK.	Cat.Nr.	Firma
A23187 (Calcium-Ionophor)	2,5 mg/ml	DMSO	5µg/ml-1µg/ml	A2110	AppliChem
BAY11-7085 (Ikka-Inhibitor)	12,5mM	DMSO		196872	Calbiochem
Cyclosporin A (Calcineurin-Inhibitor)	5mg/ml	DMSO			
	100µg/ml	KM	5-1µg/ml	239835	Calbiochem
Dexamethason (NF-κB – Inhibitor)	10mM	DMSO			
	100µM	KM	1µM-0,32nM	265005	Calbiochem
N(6), O(2')-Dibutyryl-cAMP, Sodium salt (PKA-Aktivator)	50mM	KM	500µM-5µM	28745	Calbiochem
FK 506 (Calcineurin-Inhibitor)	10mM	DMSO	µM-pM	342500	Calbiochem
Gö 6976 (Inhibitor von PKCa, b, µ)	1mM	DMSO	ab 250nM	365250	Calbiochem
Gö 6983 (Inhibitor von PKC g, d, z)	1mM	DMSO	ab 250nM	365251	Calbiochem
H-89, HCl (PKA-Inhibitor)	10mM	DMSO	ab 500nM	371963	Calbiochem
KN-62 (CaMK-Inhibitor)	10mM	DMSO	9µM-0,09µM	422706	Calbiochem
KT 5823 (PKG-Inhibitor)	1mg/ml	DMSO		420321	Calbiochem
LPS	5mg/ml	KM	10µg/ml bzw. 10ng/ml	3120-25-0	Difco Laboratories
Leupeptin (Protease-Inhibitor)				12136	Biomol
Pansorbin				507858	Calbiochem
PD 169,316 (p38 MAPK-Inhibitor)	12,5mM	DMSO		270-258-M000	
				270-258-M005	
				270-258-M050	Alexis
PD 98059 (MEK-1/MEK-2-Inhibitor)	100mM	DMSO	50µM-0,5µM	513000	Calbiochem
PMA (Phorbolster)	5mM	DMSO			
	50µM	DMSO			
	5µM	DMSO	50nM-2nM	524400	Calbiochem
Sansorbin				557601	Calbiochem
SB 203580 (p38 MAPK-Inhibitor)	1mM	DMSO	5µM-0,2µM	559389	Calbiochem
Staurosporin (Proteinkinase-Inhibitor)	1mM	DMSO	500nM	569397	Calbiochem
Thapsigargin (Calcium-ATPase-Inhibitor)	10mM	DMSO			
	100µM	DMSO			
	100µM	KM	2500-100nM	586005	Calbiochem

Tab. 2

Auflistung verwendeter Substanzen

Abkürzungen: - Stammlösung (Stammlösg.) – Lösungsmittel (LM.) – Endkonzentration (EK.) – Katalognummer (Cat.Nr.) – Kulturmedium (KM; RPMI 1640 mit 10 % FCS) – Dimethylsulfoxid (DMSO)

Lösungen und Puffer**MACS-PUFFER:****PBS („Phosphate Buffered Saline“):**

8,0 g NaCl  
 1,42 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O} = 1,57 \text{ g } \text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$   
 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
 0,2 g KCl

in ca. 950 ml Millipore-Wasser lösen, pH-Wert ggf. mit HCl oder NaOH auf 7,4 einstellen, anschließend auf 1 Liter auffüllen

**MACS-Puffer (2 mM EDTA + 0,5% BSA):**

0,745 g EDTA  
 5,0 g BSA Fraktion V (Fa. Boehringer Mannheim; Art.-Nr.: 735086)  
 ad 1 Liter mit PBS

**Erythrozytenlyse-Puffer:**

(hypotonischer Ammonium Chlorid-Puffer nach Miltenyi)

8,29 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$   
 0,84 g  $\text{KHCO}_3$   
 0,2 ml EDTA einer 0,5 M Stammlösung  
 ad 1 Liter mit Millipore-Wasser  
 pH-Wert: 7,0 - 7,4

**Gey's Lyselösung**

Diese Lösung ist hypotonisch und wodurch Erythrozyten lysiert werden können. Dabei handelt es sich um eine sterile 0,83 % ige  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung mit folgender Zusammensetzung :

8,290	g/l	$\text{NH}_4\text{Cl}$
1,000	g/l	$\text{KHCO}_3$
0,037	g/l	EDTA

**ELISA-PUFFER & LÖSUNGEN:****„Coating“-Puffer (PBS):**

8,0 g NaCl  
 1,42 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O} = 1,57 \text{ g } \text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$   
 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
 0,2 g KCl

in ca. 950 ml Millipore-Wasser lösen, pH-Wert ggf. mit HCl oder NaOH auf 7,4 einstellen, anschließend auf 1 Liter auffüllen

**„Blocking“-Puffer (PBS + 0,5% BSA):**

BSA (Fraktion V): Fa. Boehringer Mannheim  
 5,0 g BSA in 1 Liter Coating-Puffer lösen  
 pH-Wert: 7,0-7,4

**Wasch-Lösung (PBS + 0,1% Tween 20):**

Tween 20: Fa. Sigma  
 1 ml Tween 20 in 1 Liter Coating-Puffer geben  
 pH-Wert: ~ 7,4

**„Standard-Diluent“ / „Assay“-Puffer (PBS + 0,5% BSA + 0,1% Tween 20):**

5,0 g BSA in 1 Liter Coating-Puffer lösen

1 ml Tween 20 zugeben

pH-Wert: ~ 7,4

**Substrat-Puffer (0,05 M Phosphat-Citrat-Puffer):**

0,05 M Phosphat-Citrat-Puffer:

257 ml 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhydriert \*

243 ml 0,1 M Citronensäure \*

500 ml Millipore-H<sub>2</sub>O

pH-Wert: 5,0

\* 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhydriert:

28,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhydriert

ad 1 Liter Millipore-Wasser

\* 0,1 M Citronensäure:

21 g Citronensäure-Monohydrat

ad 1 Liter Millipore-Wasser

**Stop-Lösung (1,8 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>):**

49 ml konzentrierte H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> langsam in 951 ml Millipore-Wasser geben

**Streptavidin Horseradish Peroxidase:**

Firma: Boehringer Mannheim

Art.-Nr.: 1089153

Lösen des Lyophilisats: in 1 ml sterilem Millipore-Wasser

Endkonzentration: 500 U/ml (s. Gebrauchsanweisung)

lyophilisiertes Streptavidin in Standard Diluent / Assay Puffer 1:10000 verdünnen

**TMB (TETRAMETHYLBENZIDINE DIHYDROCHLORIDE) Substrat Tabletten:**

Firma: Sigma

Art.-Nr.: T-3405

1 Tablette in 10 ml 0,05 M Substrat-Puffer lösen

vor Gebrauch 2 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugeben

**Puffer und Lösungen für die RT-PCR**

Oligo(dT)15-Primer für die reverse Transkription

8 µM

Lagerung : -20°C

Desoxyribonukleotid-Gemisch (dNTP's) für die reverse Transkription und PCR

je 10 mM dATP , dCTP , dGTP und dTTP in RNase freies-H<sub>2</sub>O von Sigma

Lagerung : -20°C

10x Beladungspuffer für die Agarosegelelektrophorese ohne Xylencyanol

5 g Glycerin

2 ml 50x TAE-Puffer

0,01 g Bromphenolblau (Sigma)

2,8 ml Aqua dest.

Lagerung : RT

DNA-MolekulargewichtsmarkerMarker VI

20 µl Marker VI (0,25 µg/µl)

10 µl Ladepuffer

70 µl autoklaviertes Millipore-H<sub>2</sub>O

Lagerung : +4°C

50x TAE (Tris Acetat EDTA)-Puffer

2M Tris-Base (=242 g)

100 ml 0,5 M EDTA-Lösung , pH 8,0

57,1 ml Essigsäure 100%

ad 1 Liter, pH 8,3

Lagerung : RT

5 mM-te(Tris EDTA)-Puffer (pH 8.0) für Primer-Ansatz)

5mM Tris pH 8,0

0,5mM EDTA

Lagerung : RT

**Puffer und Lösungen für EMSA- und Supershift-Analysen**

Puffer für die cytoplasmatische und nukleäre Extrakte

Stammlösung Puffer A

100 µl	1 M HEPES , pH 7,9	(10 mM )
100 µl	1 M KCl	(10 mM)
5 µl	0,2 M EDTA	(0,2 mM)
10 µl	0,1 M EGTA	(0,1 mM)
9685 µl	H <sub>2</sub> O	(Gesamtvol. 10 ml)

Gebrauchslösung Puffer A

943 µl Stammlsg. A

10 µl 0,1 M DTT

10 µl 0,1 M PMSF<sup>\*)</sup>

25 µl 40 mg/ml Pefabloc SC (Fa. Biomol, Art.-Nr.: 50985, in HEPES, pH 7,4 lösen)

12 µl Protease Mix (1 mg Pepstatin A in 200 µl DMSO lösen und in 800µl wässriger 15 mM HEPES-Lösung, pH 7,4 aufnehmen; 1mg Leupeptin wie Pepstatin ansetzen )

Stammlösung Puffer C

200 µl 1 M HEPES , pH 7,9 (20 mM )

1000 µl 4 M NaCl (0,4 mM)

50 µl 0,2 M EDTA (1,0 mM)

100 µl 0,1 M EGTA (1 mM)

9430 µl H<sub>2</sub>O (Gesamtvol. 10 ml)

Gebrauchslösung Puffer C

943 µl Stammlsg. C

10 µl 0,1 M DTT

10 µl 0,1 M PMSF<sup>\*)</sup>

25 µl 40 mg/ml Pefabloc SC (Fa. Biomol, Art.-Nr.: 50985, in HEPES, pH 7,4 lösen)

12 µl Protease Mix

\*) PMSF ist für Untersuchungen an THP-1-Zellen nicht erforderlich, sondern nur für frisch isolierte Monozyten aus PBMC

Polyacrylamidgelelektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen10 x TBE –Puffer:

890 mM Trizma Base  
890 mM Borsäure  
20 mM EDTA, pH 8,0

6% Gel:

10 ml 3% Acrylamid  
2,5 ml 10 x TB (0,5 x TBE)  
37,5 ml H<sub>2</sub>O  
entgasen für 15 min  
200 µl 10 % APS  
50µl TEMED

5'-End Labelling der Oligonukleotid-Sonden

<sup>32</sup>P-ATP Redivue 9,25 M Bq (Art.-Nr.: AA0018; Fa. Amersham Pharmacia)  
5'-End Labelling Kit (Art.-Nr.:RPN 1509, Fa. Amersham Pharmacia)  
ml 3% Acrylamid  
Qiaquick Nucleotid Removal Kit (Art.-Nr.: 28304, Fa. Qiagen)

Supershift-Antikörper (alle von der Fa. Santa Cruz)

NF-κB : NF-κB p65: sc-109-G-X, NF-κB p50: sc-7178-X, Rel B: sc-226-X,c-Rel: sc-6955-X, Rel A: sc-109-x

AP-1 : Jun B: sc-8051-X, Jun D: sc-74-G-X, c-Jun: sc-7481-X, Fra-1: sc-605-X, Fra-2: sc-171-X, JAB1: sc-6271-X, FosB: sc-8013-X, c-Fos: sc-8047-X

NF-AT: NFATc1: sc-7294-X NFATc2: sc-7295-X, NFATc3: sc-8321-X, NFATc4 :sc-1153-X

Ets: Ets-2: sc-351-X

Antikörperkontrollen: murines IgG: sc-2025, Kaninchen-IgG: sc-2027, Ziegen-IgG: sc-2028

Molekulargewichtstandard für Western-Analyse/ Immunoblotting:

sc-2035 (Fa. Santa Cruz)

Oligonukleotid-Sonden:• **OCT2A**

5' -GTA CGG AGT ATC CAG CTC CGT AGC **ATG CAA ATC** CTC TGG-3'  
3' -CCT CAT AGG TCG AGG CAT **CGT ACG TTT** AGG AGA CCA GCT-5'

• **NF-κB**

5' -AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C -3'  
3' -TCA ACT CCC CTG AAA GGG **ACC** G -5'

• **NF-AT**

5' -CGC CCA AAG AGG AAA ATT TGT TTC ATA-3'  
3' -GCG GGT TTC TCC TTT TAA ACA AAG TAT-5'

• **Ets**

5' -GAT CTC GAG CAG GAA GTT CGA- 3'  
3' -CTA GAG CTC GTC CTT CAA GCT- 5'

• **C/EBP**

5' -TGC AGA TTG CGC AAT CTG CA- 3'  
3' -ACG TCT AAC GCG TTA GAC GT- 5'

- **AP1**

5'-CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA- 3'  
3'-GCG AAC TAC TGA GTC GGC CTT- 5'

- **SP1**

5'-ATT CGA TCG GGG CGG GGC GAG C- 3'  
3'-TAA GCT AGC CCC GCC CCG CTC G- 5'

- **CREB**

5'-AGA GAT TGC CTG ACG TCA GAG AGC TAG-3'  
3'-TCT CTA ACG GAC TGC AGT CTC TCG ATC-5'

- **hMCPKOR (-2642-2632, KB original/klassisch)**

5'- TAC GGG ATC TGG GAA CTT CCA AAG CT-3'  
3'- ATG CCC TAG ACC CTT GAA GGT TTC GA-5'

Ref.

Ueda A/ Yoshimura T(1997)J Biol Chem 272: 31092-31099??  
Stylianou E/Zhao L(1999)Kidney Int56,873

- **hMCPAKA (AP1,KB,AP1)**

5'- TTA TCA CTC ATG GAA GAT CCC TCC TCC TGC TTG ACT CCG C- 3'  
3'- AAT AGT GAG TAC CTT CTA GGG AGG AGG ACG AAC TGA-GGC G 5'

Ref.:

Martin/Cobb(1997)Eur J Immunol27:1091-97  
Yi-shuan Li/Kolattukudy(1994) Mol Cell Biochem141:121-28  
Ueda/Okubo(1994) J I153:2052;

- **HMCPATKd (NFAT,KB distal; AP-1)**

5'- CCT CTG GGG GCC TTT CCC TTG TGT GT-3'  
3'- GGA GAC CCC CGG AAA GGG AAC ACA CA-5'

**itMCPlong (HMCPATKd, +4bp)**

5'- CCT CTG GGG GCC TTT CCC TTG TGT GTC CCC-3'  
3'- GGA GAC CCC CGG AAA GGG AAC ACA CAG GGG-5'

**ditMCPlong (decoy ditMCPlong)**

- Phosphorothioat

5'- CCT CTG GGG GCC TTT CCC TTG TGT GTC CCC-3'  
3'- GGA GAC CCC CGG AAA GGG AAC ACA CAG GGG-5'

- **hMCPKUeda**

5'- TCA GAG TGG GAA TTT CCA CTC ACT TC-3'  
3'- AGT CTC ACC CTT AAA GGT GAG TGA AG

Ref.

"A2" - Ueda/Okubo J I (1994)153:2052  
Stylianou E/ Zhao L(1999)Kidney Int56,873-882

- **hp40KBAT**

5'- GAA CTT CTT GAA ATT CCC CCA GAA GGT TTT GAG AGT TGT T-3'  
3'- CTT GAA GAA CTT TAA GGG GGT CTT CCA AAA CTC TCA ACA A -5'

Ref.:

**KB Murphy, et al.1995**

- **hMCPCCSS (C/EBP, CREB, SP1 )**

5'- GAA TGA AGT CAG GCT TTC CAA TTC CCG AAA TAC 3'  
3' -CTT ACT TCA GTC CGA AAG GTT AAG GGC TTT ATG -5'

## 2. Methoden

### 2.1. Zellbiologische Methoden

#### 2.1.1. Isolierung von Monozyten *ex vivo*

Aus dem venösen Blut gesunder Spender werden mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation und einer Positiv-Selektion über CD14 und der Technik der magnetischen Zellseparation (MACS) Monozyten *ex vivo* isoliert.

#### **MATERIAL:**

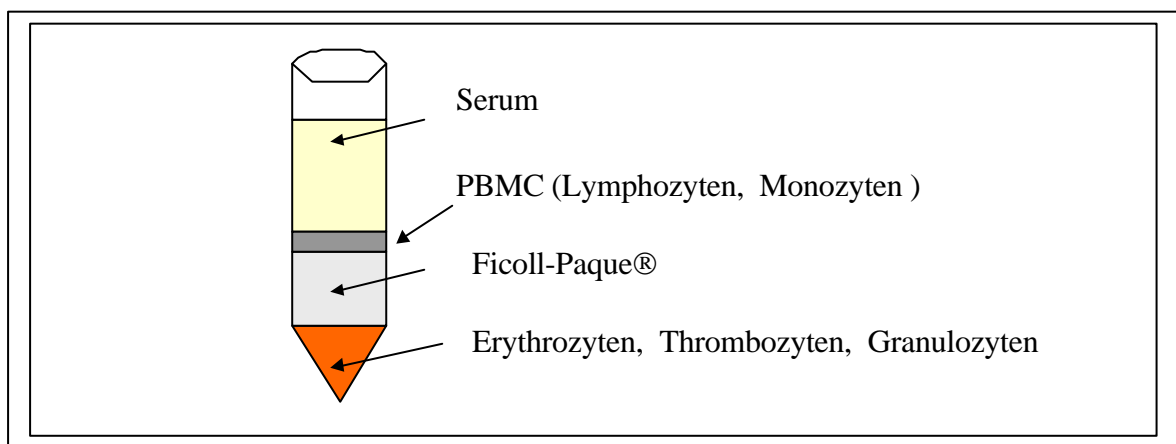
- 1 x 150 ml Heparin-Blut
- 12 x 50 ml Greiner-Röhrchen
- Zentrifuge
- Pipetten (5 , 10 und 25 ml)
- Ficoll-Paque<sup>®</sup> (Fa. Pharmacia; Art.-Nr.: 17-0840-03)
- Kulturmedien: RPMI + 1% FCS; RPMI + 10% FCS  
RPMI1640: Fa. GibcoBRL; Art.-Nr.: 21875-034  
FCS: Fa. PAA; Art.-Nr.: A15-042
- Erythrocytenlyse-Puffer (siehe S. 4)
- Trypanblau Lösung (0,4%) (Fa. SIGMA; Art.-Nr.: T-8154)
- MACS-Puffer
- Vario MACS (Fa. Miltenyi Biotec)
- CD14<sup>+</sup> - Microbeads (Fa. Miltenyi Biotec; Art.-Nr.: 502-01)
- MACS-Separation Säule (Fa. Miltenyi Biotec; VS<sup>+</sup> Säule: Art.-Nr.: 413-06  
RS<sup>+</sup> Säule: Art.-Nr.: 413-01)

#### 2.1.1.1. Blutentnahme und Dichtegradientenzentrifugation

Gesunden Spendern wurde venöses Blut entnommen. Das Blut wurde heparinisiert. Es wurden vergleichende Experimente mit verschiedenen Antikoagulanzen durchgeführt

(Heparin, EDTA, Citrat). Die Wahl des Blutgerinnungshemmers hatte keinen deutlichen Einfluß auf die LPS-induzierte IL-12p40-Expression.

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Als Ausgangsvolumen wurden 150 ml Blut eingesetzt. 20 ml Ficoll-Paque® wurden in je ein 50 ml Greiner-Röhrchen pipettiert. Zwischenzeitlich wurde das venöse Blut 1:2 in RPMI 1640 mit 1% FCS verdünnt. Anschließend wurde die Ficoll-Paque®-Lösung vorsichtig mit 25 ml des Blut-RPMI-Gemisches überschichtet und ohne die Phasengrenze zu zerstören. Danach wurden die Proben für 35 Min bei ca. 850 g und RT zentrifugiert. Der Zentrifugationsvorgang wurde ohne zusätzliche Brems- oder Zentrifugalkräfte abgestoppt. Der Erfolg der Dichtegradientenzentrifugation konnte an der Ausbildung von drei Phasen und einer Interphase, die PBMCs enthält, kontrolliert werden.



**Abb.: 1**

Dichtegradienten nach Zentrifugation venöser Blutproben  
Erläuterungen s. Text

Im weiteren Verlauf wurde das Serum verworfen, bevor die Interphase mit den PMBCs abgenommen werden konnte. Jeweils zwei Aliquots wurden vereinigt.



### 2.1.1.2. Magnetische Zellseparation (MACS)

Die Methode ist an anderer Stelle beschrieben worden <sup>186</sup>. Sie wurde verwendet, um Monozyten, die membranständiges CD14 exprimieren, aus PBMCs zu isolieren. Die Separation erfolgte als Positivselektion nach der Markierung der CD14- Moleküle durch Magnetpartikel.

Nachdem die PBMCs durch die Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden konnten, wurden diese Proben zur magnetischen Zellseparation weiterverwendet. Dazu wurden die Proben zunächst mit RPMI1640/ 1% FCS auf 50 ml aufgefüllt und anschließend 15 min bei ca. 600 -700 g und RT zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 2 ml einer Erythrozytenlyse-Puffer oder Gey's Lyselösung aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde die Suspension mit MACS-Puffer auf 30 ml aufgefüllt, wodurch die Lyse gestoppt wurde. Danach wurde der letzte Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Überstand wurde dekantiert und das gewaschene Zellpellet in 5 ml MACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden alle Aliquots in einem Röhrchen vereinigt. Zur Bestimmung der PBMC-Zellzahl wurden eine Probe von 10 µl 1:10 mit einer Trypanblau-Lösung verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgewertet. Währenddessen wurden die restlichen PBMC für 10 min mit ca. 600 – 700 g bei RT zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert und das verbleibende Zellpellet in MACS-Puffer aufgenommen. Dabei wurde ein Volumen von 80 µl /  $1 \times 10^7$  Zellen verwendet. Zusätzlich wurden je 20 µl Microbeads /  $1 \times 10^7$  Zellen zugegeben. Danach wurden die Zellen für 15 min bei + 4°C bis +8°C unter Lichtabschluß gelagert. Anschließend wurden die Zellen mit dem 10-fachen des

Ausgangsvolumens in MACS-Puffer aufgenommen und für 10 min mit ca. 600 – 700 g bei RT zentrifugiert. Nach diesem Waschschrift wurden die PBMCs mit einem Vol. von von 500  $\mu\text{l}$  /  $1 \times 10^8$  Zellen aufgenommen und resuspendiert, jedoch mußte ein Mindestvolumen von 1 ml eingesetzt werden. Anschließend wurde die VS<sup>+</sup>- bzw. RS<sup>+</sup>-Säule in das Magnetfeld eingebracht und gespült. Je nach Zellzahl der PBMCs wurde die entsprechende Säule mit dem jeweiligen Vol. an MACS-Puffer gespült (VS<sup>+</sup>-Säule : Anzahl PBMC's <  $2 \times 10^9$ , 3ml; RS<sup>+</sup>-Säule :Anzahl PBMC's <  $2 \times 10^8$ , 500  $\mu\text{l}$ ). Sodann wurden die Zellen auf die Säule gegeben und viermal mit MACS-Puffer gewaschen (VS<sup>+</sup>-Säule : 3ml; RS<sup>+</sup>-Säule : 500  $\mu\text{l}$  ). Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und mit MACS-Puffer gespült (VS<sup>+</sup>-Säule : 5 ml; RS<sup>+</sup>-Säule : 1000  $\mu\text{l}$ ), um die Zellen der Positivselektion zu eluieren. Von dieser Fraktion wurde die Zellzahl bestimmt, um die Monozyten für die nachfolgenden *in vitro*-Experimente mit der gewünschte Konzentration einsetzen zu können. Dazu wurden die Monozyten zentrifugiert (s.o.) und das Zellpellet mit dem entsprechenden Vol. an RPMI1640/10% FCS aufgenommen.

### 2.1.2. Zellkultur und Stimulationsexperimente

Als Prophylaxe gegen bakterielle Kontaminationen wurden alle zellbiologische Arbeiten in einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Zellen wurden in wasserdampfgesättigter, 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Den Kulturmedien wurden keine Antibiotika zugesetzt. Alle verwendete Zelllinien wurden regelmäßig auf eine Mycoplasmen-Infektion getestet. Dabei wurde zu keinem Zeitpunkt eine Kontamination festgestellt. Als Kultivierungsmedium ("Medium") für die Dauerkultur und die Stimulationsexperimente wurde RPMI 1640 ( Fa. GibcoBRL; Art.-Nr.: 21875-034 ) mit 10 % FCS ( Fa. PAA; Art.-Nr.: A15-042) eingesetzt.

Die humane Linie THP-1 stammt ursprünglich von einem Jungen mit akuter monozytärer Leukämie und wurde als monozytäre Zelllinie charakterisiert<sup>187;188</sup>. Für die vorliegende Arbeit waren noch weitere Eigenschaften von Bedeutung. THP-1-Zellen exprimieren TLR4 und CD14. Ohne Stimulation wird kaum MCP-1 gebildet, jedoch ist es durch geeignete Stimuli induzierbar<sup>34</sup>.

Die Identität der THP-1-Zellen wurde durch sog. "DNA-Fingerprinting" mit einer quadruplex PCR für die VNTRs (Variable Numbers of Tandem Repeats) der genetischen Loci D1S80, D2S44, D17S5 und der 3'-flankierenden Region von Apo-B1 bestätigt, die von der "Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" (DSMZ) durchgeführt wurde. Zusätzlich wurden die Ergebnisse mit einem Klon von THP-1-Zellen der DSMZ in Reproduktionsexperimenten bestätigt. Gewisse Schwankungen in der Menge der gebildeten Zytokine und Chemokinen wurde für beide Klone von THP-1-Zellen beobachtet.

THP-1-Zellen wurden als Dauerkultur zunächst auf Zellkultur Multischalen („Tissue Culture“) mit 24 Kavitäten, später mit 6 Kavitäten kultiviert und 2-3 mal pro Woche in einer Verdünnung von 1:6 subkultiviert. Die Zellen wurden in der Regel einen Tag vor einem Stimulationsexperiment in frischem Medium (RPMI 1640 mit 10 % FCS) aufgenommen.

Die Kulturbedingungen der Stimulationsexperimente richteten sich nach den verwendeten Untersuchungsmethoden (s. Tab. 3). Pharmakologische Substanzen wie Enzyminhibitoren und -aktivatoren wurden entweder 2 h vor der Gabe des Stimulus (LPS, TG, Pan, San, A23187) oder zeitgleich mit dem Stimulus verabreicht. Bei den Stimulationsexperimenten wurden die Zellen in Medium (RPMI 1640 mit 10 % FCS) kultiviert. Darüber hinaus war in den Ansätzen das Lösungsmittel der eingesetzten Substanzen (s. Tab. 2, Kap. I.1.3) enthalten. Soweit es nicht ausdrücklich angemerkt ist, wurden alle Ergebnisse in mehreren Wiederholungsexperimenten bestätigt. Einzelergebnisse beruhen auf Dreifachansätze oder sind repräsentativ für mehrere Versuche.

In den Experimenten wurden *ex vivo* isolierte Monozyten unter den Bedingungen eingesetzt, die für die THP-1-Zellen verwendet wurden.

Methode	Plastikware	Zellzahl	Gesamtvol.
ELISA	Mikrotiterplatten	i.d.R. $1,2 \times 10^6$ /ml	250 $\mu$ l
ELISA <sup>RT(-PCR)</sup>	s. RT(-PCR)	s. RT(-PCR)	s. RT(-PCR)
ELISA <sup>EMSA</sup>	s. EMSA	s. EMSA	s. EMSA
RT(-PCR)	Multischale, 6 Kav.	i.d.R. $1 \times 10^6$ /ml	4 ml
SDS-PAGE/ Immunoblotting	Multischale, 6 Kav.	$2,5 \times 10^6$ /ml	4 ml
EMSA	Multischale, 6 Kav.	$2,5 \times 10^6$ /ml	4 ml
FLIPR	Mikrotiterplatten	$2 \times 10^5$ /ml	250 $\mu$ l

**Tab.3**

Übersicht über die Zellkulturbedingungen für bestimmte Methoden.

Abkürzungen : - Kavitäten (Kav.) – in der Regel (i.d.R.) – Gesamtvolumen (Gesamtvol.) – s. auch Abkürzungsverzeichnis Kap.VII.

### 2.1.3. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Der Begriff "ELISA" beschreibt das charakteristische Merkmal dieser quantitativen Untersuchungsmethode, welches darin besteht, daß ein gesuchtes Zielmolekül über Antikörper fixiert wird, die an ein enzymatisches Detektionssystem gekoppelt sind.

Das Chemokin MCP-1 sowie die Zytokine IL-6, IL-12p40 und TNF- $\alpha$  wurden mit ELISAs nach dem "Sandwich"-Prinzip quantifiziert.

Für die Zytokine IL-6, IL-12p40 und TNF- $\alpha$  wurden die "CytoSets"™ der Fa. BIOSOURCE verwendet (IL-6: Art.-Nr. CHC 1264, IL-12p40 : Art.-Nr. CHC 1564 und TNF- $\alpha$  : Art.-Nr. CHC 1754).

Die ELISA-Antikörper für humanes MCP-1 stammten von der Fa. R & D Systems. Für die verschiedenen ELISA konnten Materialien und Lösungen gemeinsam benutzt werden. Die Protokolle der Hersteller wurden leicht modifiziert durchgeführt:

Kurz vor Gebrauch wurden der sog. Primärantikörper in „Coating“-Puffer und Sekundärantikörper in „Standard-Diluent“/„Assay“-Puffer auf die Gebrauchskonzentration verdünnt (s. Tab. 4). Die Lyophilisate der rekombinanten Proteine wurden in der Probenmatrix gelöst und in einer Verdünnungsreihe als Standard aufgetragen (s. Tab. 4).

Zytokin/ Chemokin	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Standard/ Positivkontrolle
IL-6	Art.-Nr.: 58.126.08, Clone: 677B6A2, Ms IgG 1 0.5 mg/0.5 ml <u>1:1000</u> auf <u>1 <math>\mu</math>g/ml</u>	Art.-Nr.: 58.126.02 Clone: 505E23C7, Ms IgG 1 0.1 mg/0.2 ml <u>1:1250</u> auf <u>0.4 <math>\mu</math>g/ml</u>	Art.-Nr.: 58.126.10 1000 pg/ml-15,6 pg/ml
IL-12p40	Art.-Nr.: 58.156.08 Clone: A08E6E5, Ms IgG 1 0.5 mg/0.5 ml <u>1:1000</u> auf <u>1 <math>\mu</math>g/ml</u>	Art.-Nr.: 58.156.02 Clone: A25C4B6, Ms IgG 1 0.1 mg/0.2 ml <u>1:5000</u> auf <u>0,1 <math>\mu</math>g/ml</u>	Art.-Nr.: 58.156.10 1000 pg/ml-15,6 pg/ml
TNF- $\alpha$	Art.-Nr.: 58.175.08 Clone: 68B2B3, Ms IgG 1 und 68B6A3, Ms IgG 2 0.5 mg/0.5 ml <u>1:333</u> auf <u>3 <math>\mu</math>g/ml</u>	Art.-Nr.: 58.175.02 Clone: 68B3C5, Ms IgG 1 0.1 mg/0.2 ml <u>1:417</u> auf <u>1,2 <math>\mu</math>g/ml</u>	Art.-Nr.: 58.175.10 1000 pg/ml-15,6 pg/ml
MCP-1	Art.-Nr.: MAB679 Clone: 23007.111, Ms IgG 2B 500 $\mu$ g/ml <u>1:250</u> auf <u>2 <math>\mu</math>g/ml</u>	Art.-Nr.: BAF279 50 $\mu$ g/ml <u>1:1000</u> auf <u>50 ng/ml</u>	Art.-Nr.: 279-MC-010 2000 pg/ml-31,3 pg/ml

**Tab. 4**

Konzentrationsangaben zu Komponenten verschiedener ELISAs.

Anschließend wurde in jede Kavität der Nunc-Microplatten 50  $\mu$ l des gelösten Primärantikörpers pipettiert. Danach wurde die Platte für 12 – 18 h bei + 2 bis + 8°C

inkubiert. Anschließend wurde die Platte ausgeklopft. Danach wurden 300  $\mu$ l/ Kavität des Blocking-Puffers aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 2 h wurde die Platte dreimal mit je 300  $\mu$ l Waschlösung/ Kavität gespült. Im nächsten größeren Schritt wurden der Standard, die Kulturüberstände und der Sekundärantikörper auf die Platte pipettiert. Im Detail wurden 50  $\mu$ l Standard bzw. Probe/Kavität aufgetragen. Anschließend konnten 25  $\mu$ l gelösten Sekundärantikörpers in jede Kavität pipettiert werden. Danach wurden die Platten 2 h lang bei RT sanft geschüttelt. Bevor 100  $\mu$ l einer Streptavidinlösung in jede Kavität pipettiert werden konnte, mußte jede Kavität dreimal mit 300  $\mu$ l Waschpuffer gespült werden. Nach einer weiterer Inkubationszeit von 30 min wurden die vorhergehenden Waschschrte wiederholt. Für die enzymatische Reaktion wurden 100  $\mu$ l Substratlösung in jede Kavität pipettiert und unter Lichtabschluß geschüttelt. Danach wurde die Farbreaktion durch Zugabe von je 50  $\mu$ l einer sog. "Stop"-Lösung beendet. Über eine entsprechende Software (Fa. Mikrotek; MikroWin 3.0) und speziellem Photometer (ELISA-Reader: Fa. Mikrotek; MPP 4008, Messfilter: 450 nm, Referenzfilter: 620 nm) konnte die Menge der detektierten Zytokine und Chemokine bestimmt werden.

Alle Proben wurden in Dreifach-Ansätzen quantifiziert.

Die untere Nachweisgrenze für IL-6, IL-12p40, TNF- $\alpha$  betrug 16 pg/ml. MCP-1 konnte unterhalb einer Konzentration von 31 pg/ml nicht mehr quantitativ bestimmt werden.

## 2.2.Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden wurden eingesetzt, um Aufschluß über eine Regulation von Transkriptionsfaktoren (EMSA), der mRNA-Mengen (RT-PCR) und der intrazellulären Calciumkonzentration (FLIPR) zu bekommen.

## 2.2.1. RNA-Isolierung und Reverse Transkription (RT)

### **RNA-Isolierung**

Die Gesamt-RNA wurde mit dem TRIZOL-Reagenz (Art.-Nr. 15596, Fa. GibcoBRL) isoliert, einer Weiterentwicklung der RNA-Isolierungsmethode von Chomczynski und Sacchi<sup>189</sup>. Dabei handelt es sich um ein Phenol-Guanidinisothiozyanatlösung, die eine RNA-Präparation in einem Arbeitsschritt erlaubt.

Zunächst wurde die RNA der Zellen isoliert, die Multischalen mit 6 Schalen stimuliert worden waren. Von den Zellkulturen wurde der Kulturüberstand in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Sofort wurden 500 µl TRIZOL<sup>®</sup> in jede Kavität pipettiert und - nötigenfalls mit einem Zellschaber - gut verteilt. Während der Einwirkzeit von 2 – 3 min wurde der Kulturüberstand bei 600 g zentrifugiert. Anschließend wurde die TRIZOLlösung mehrmals in der Schale resuspendiert, bevor sie mit dem Zellpellet der nicht adhärenen Zellen aus dem Kulturüberstand verunigt wurde. Der Kulturüberstand wurde für ELISAs bei –20°C gelagert. Die TRIZOL-Suspension in den Eppendorfreaktionsgefäßen wurde nach gutem Mischen direkt weiterverarbeitet oder bei –80°C tiefgefroren.

Aufgrund einer Kontaminationsgefahr wurde im weiteren Verlauf mit RNase-freien Reagenzien, Reaktionsgefäßen und Pipettenspitzen der Fa. Rainin gearbeitet und Handschuhen getragen. Die tiefgefrorenen Proben wurden aufgetaut, gevortext und für 10 min bei RT belassen. Danach wurden die Proben in den Filtereinsatz des Qiasredders der Fa. Qiagen gegeben mit ca 5000 g kurz anzentrifugiert. Anschließend wurde der Filtereinsatz entnommen und 100 µl einer Chloroformlösung wurden auf die Proben pipettiert. Im nächsten Schritt wurden die Aliquots für 15 sec kräftig geschüttelt und anschließend für 2 – 3 min bei

RT belassen. Die Trennung der Pasen erfolgte durch eine Zentrifugation mit ca. 11000 g für 15 min bei + 4°C. Anschließend wurde die wäßrige Phase in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt, zu dem 250 µl Isopropanol pipettiert wurden. Zur Fällung der RNA wurden die Proben nach einer Einwirkzeit von 10 min bei RT für weitere 10 min mit 11000 g bei + 4°C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde nach Zugabe von 500 µl einer 75 %-igen Ethanollösung gevortext. Anschließend wurde die Probe für 5 min mit ca. 8000 g bei + 4°C zentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstands wurde das RNA-Pellet unter einem Abzug getrocknet. Das RNA-Pellet wurde dann in 20 µl RNase-freien Wasser der Fa. Sigma und durch Vortexen gelöst. auf. RNA-Sekundärstrukturen der Proben wurden durch das 15 min Schütteln bei 65 °C aufgebrochen. Anschließend wurden die Proben aus dem Eppendorf-Thermomixer entnommen, gevortext und kurz anzentrifugiert.

Für die Bestimmung der RNA-Konzentration wurden 2 µl der RNA-Lösung 1: 101 mit H<sub>2</sub>O verdünnt und die optische Dichte (OD) mit dem Shimadzu-Photometer gemessen. Zur Berechnung wurden folgende Formel eingesetzt:

1 OD bei 1 cm Schichtdicke  $\cong$  40 µg/ml

Konzentration = OD<sub>260nm</sub> \* Verdünnungsfaktor \* 40 µg/ml

Masse RNA gesamt = OD<sub>260nm</sub> \* Verdünnungsfaktor \* 40 µg/ml \* Volumen RNA-Lösung

Daneben wurde die Reinheit durch Ermittlung des OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>290nm</sub>-Quotienten bestimmt.



**Reverse-Transkription**

Zur Synthese eines komplementären DNA-Stranges der mRNA-Matrize wurde das Omniscript-System der Reversen Transkriptase der Fa. Qiagen verwendet (Catnr. 205113, 800 Units).

Die RNA-Proben wurden entweder direkt für die RT weiterverwendet oder waren zwischenzeitlich tiefgefrorenen worden. Tiefgefrorene Proben wurden nochmals im Thermomixer bei 65°C und 600 Umdrehungen/ min für 15 min erhitzt. Anschließend wurde die RNA-Lösung kurz gevortext, zentrifugiert und auf Eis gestellt. Danach wurde eine RNA-lösung mit einem Vol. von 20 µl und einer Konz. von 4 µg RNA/ 20 µl in RNase-freien PCR-Gefäßen hergestellt. Im nächsten Schritt wurde der sog. Mastermix hergestellt:

**Volumina mal Anzahl der Proben N:**

N x 5,5µl RNase freies Wasser

N x 4µl 10x Puffer

N x 4µl NTP-Mix (5mM each)

N x 4µl Oligo (dT)<sub>12-18</sub> (500 µg/ml, 8µM) zugeben

N x 0,5µl RNase Inhibitor 20 U/40µl Reaktion (RNaseOut, Gibco, Cat. No. 10777-019)

N x 2µl Omniscript Reverse Transkriptase

Der sog. "Mastermix" wurde für weniger als 5 sec gevortext und kurz anzentrifugiert. 20 µl Mastermix wurden zu 20 µl RNA-Lösung pipettiert mit einer RNA-Gesamtmenge von 4 µg. Die Reverse Transkription wurde im Thermocycler bei 37°C für 60 min durchgeführt. Das Enzym wurde durch Erhitzen auf 93°C für 5 min inaktiviert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf + 4°C abgekühlt, anzentrifugiert und in 160 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die cDNA-Lösung wurde dann bei – 20°C gelagert.

### 2.2.2. FLIPR (*F*luorometric *I*maging *P*late *R*eader) und $[Ca^{2+}]_i$

Zur Messung von Veränderungen intrazellulärer Calcium-Konzentrationen wurde eine die zellpermeable Substanz Fluo-4 AM verwendet, die Eigenschaften eines Calcium-Chelators besitzt und deren durch Laser angeregte Emission von Lichtquanten proportional zur gebundenen Calcium-Menge ansteigt. Zur synchronen Messung multipler Ansätze im Mikrotiterplattenformat wurden ein sog. FLIPR verwendet.

#### Material :

DMSO, geringer Wassergehalt	Fluka	#41648
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), 10x konz.	Gibco	#14065-056
HEPES Puffer Lösung	Irvine Scientific	#9319
Mikrotiterplatten (steril, lichtundurchlässige,TC)	Corning/Costar	#3603
"Pluronic Acid", 20%ige Lösung	Molecular Probes	#P-3000
Probenecid, kristallin	Sigma	#P8761

#### Durchführung :

1 Tag vor Versuchsbeginn wurden die  $2 \times 10^5$  Zellen/ Kavität in speziellen Mikrotiterplatten ausgesät. Am Versuchstag wurden die Kulturüberstände entfernt und die Zellen mit 250  $\mu$ l eines Waschpuffer (1mM HEPES in HBSS-Puffer mit 10 % FCS, 1mM NaOH, Pluronic Acid und DMSO) pro Kavität gespült. Zur Aufnahme der fluorometrischen Substanz Fluo-4 AM (5  $\mu$ M) wurden 100  $\mu$ l eines sog. Beladungspuffers (1mM HEPES in HBSS-Puffer mit 10 % FCS, 1 mM NaOH, Pluronic Acid und DMSO) auf jede Kavität pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1h bei 37 °C wurden die Zellen wieder gewaschen . Anschließend werden 100  $\mu$ l, der in einem Agonisten-Puffer (1 mM HEPES in HBSS mit 10 % FCS) gelösten Substanzen, in die jeweilige Kavität pipettiert. Bei der eigentlichen Messung wurden die Empfehlungen des Herstellers berücksichtigt. Die Messperiode betrug 4 min.

### 2.2.3. PCR (*P*olymerase *C*hain *R*eaction)

#### Oligonukleotid-Aufbereitung

Die Synthese erfolgte durch die Firma MWG-Biotech AG oder Life Technologies GmbH  
Lyophilisierte Oligonukleotide mit dem angegebenen Vol. an te-Puffer resuspendieren, evtl. kurz an zentrifugieren.

Nach der Bestimmung der Konzentration der Oligo – Lösung wurde eine Stammlösung (100µM) hergestellt.

Die Gebrauchskonzentration der Primer betrug 25 µM.

#### Bestimmung der Konzentration mit Hilfe des Spektralphotometers:

1,0 µl der Stammlösung wurde 1:201 mit Aqua dest. verdünnt in eine Quarzküvette (1 cm Schichtdicke) pipettiert. Im Spektralphotometer wurde die OD bei 260 nm gemessen.

#### Konzentrationsberechnung:

1 OD<sub>260</sub> bei 1 cm Schichtdicke  $\cong$  33 µg/ml (= 33 ng/µl)

Konzentration = OD<sub>260</sub> \* Verdünnungsfaktor \* 33 ng/µl

Die Nukleotidsequenz, die erwartete Fragmentlänge der PCR-Produkte und die etablierte Annealing-Temperatur waren folgendermaßen :

Humane Primer	Sequenzen	Fragment	Temp.
β-actin	Sense : 5'-GAG CGG GAA ATC GTG CGT GA-3' Antisense : 5'-GAA GGT AGT TTC GTG GAT GCC-3'	226 bp	60 °C
GAPDH	Sense : 5'-CTA CTG GCG CTG CCA AGG CTG T-3' Antisense : 5'-GCC ATG AGG TCC ACC ACC CTG T-3'	358 bp	60 °C
IL-12p40KE	Sense : 5'-GTA CTC CAC ATT CCT ACT TCT C-3' Antisense : 5'-TTT GGG TCT ATT CCG TTG TGT C-3'	283 bp	60 °C
MCP-1	Sense: 5'- TCA TAG CAG CCA CCT TCA TTC C-3' Antisense: 5'- CAG GTG GTC CAT GGA ATC CTG A-3'	236 bp	60 °C
HPRT	Sense : 5'-TAT GGA CAG GAC TGA ACG TCT TGC-3' Antisense : 5'-AC ACA AAC ATG ATT CAA ATC CCT GA-3'	496 bp	60 °C

**Tab.5**

Auflistung der verwendeten humanen PCR -Primer

„Temp“. bezeichnet die sog. „Annealing“-Temperatur. Der Primer für die MCP-1-PCR wurde an anderer Stelle beschrieben<sup>190</sup>. Die Fragmentgröße des PCR-Produkts ist in „basepairs“ (bp) angegeben.

Die PCR-Reaktion wurde mit folgenden Protokoll durchgeführt :

### PCR Reaktion mit Qiagen Taq-Polymerase

(Catnr. 201205 1000 U)

- Ansatz des Mastermix (Probenanzahl +2) für **eine 25µl PCR Reaktion** ansetzen:
  - 2,5 µl 10x Puffer (ohne MgCl<sub>2</sub>)
  - **0,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM) -> Endkonz. 2mM**
  - 0,5 µl dNTP Mix (10 mM)
  - 15,375µl RNase freies Wasser (Sigma)
  - 0,5µl Sense und 0,5µl Antisense bzw. 1 µl gemischte Primer
  - 0,125 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
  - vortexen
- 0,2ml PCR-Gefäße in in Eis stellen
- Mastermix zu je 20µl/Tube verteilen (mit Multipette mit aufgesetzter 100µl Pipettenspitze)
- **je 5 µl cDNA** bzw. Wasser (als Primerkontrolle) zugeben
- PCR Programm je nach verwendeten Primern starten.
 

1.	94°C	2 Minuten
2.	94°C	30 Sekunden
3.	Annealing temperatur	30 Sekunden
4.	72°	60 Sekunden
5.	Wiederholung des Zyklus ab dem 2. Schritt entsprechend der Zyklenzahl	
6.	72°	10 Minuten
7.	4°	∞
- Temperatur (zu Punkt 3.) siehe Tabelle 5
- In der Regel betrug die Zyklenzahl 23 (β-Actin, GAPDH, HPRT) – 27 (MCP-1, IL-12p40) Zyklen

### Agarose-gelelektrophorese und Auswertung

- Das PCR-Produkt wurde 5µl 10x BlueJuice Gel Loading Buffer (Fa. Gibco Nr.10816-015) gemischt.
- 9 µl dieser Lösung wurden auf ein Agarosegel (2,5%ig) aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die einzelnen Banden wurden im Fluor-S Multi Imager mit Multianalyst Software densitometrisch und hinsichtlich der Fragmentlänge analysiert.
- Als Größenstandard zur Bestimmung der Fragmentlänge wurden die DNA- Molekulargewichtsmarker „100 bp-Ladder“ (Fa. Invitrogen Lifetechnologies, Art.-Nr.: R310-01) und „Marker IV“ (Fa. Roche Molecular Biochemicals, Art.-Nr.1418009) verwendet. Die Detektion und Berechnung der Proben erfolgte mit dem Fluor-S Multi Imager und der Multianalyst Software der Fa. Biorad Laboratories GmbH.

- Die densitometrische Auswertung erfolgte ebenfalls mit dem Fluor-S Multi Imager und der Multianalyst Software der Fa. Biorad Laboratories GmbH. Zur Normalisierung der PCR von MCP-1 und IL-12p40 wurden die parallel durchgeführten Ansätze für GAPDH und  $\beta$ -Actin ausgewertet. Dabei wurden PCR-Ansätze mit unterschiedlichen Zyklenzahlen durchgeführt und nur der Ansatz mit einer verwertbaren Amplifikationseffizienz berücksichtigt. Ebenso wurden PCR-Ansätze mit unterschiedlichen Zyklenzahlen für MCP-1 und IL-12p40 durchgeführt und ausgewertet.

## 2.2.4. SDS-PAGE und Immunoblotting

SDS-PAGE und Westernblotting erfolgte gemäß den Herstellerangaben der Fa Invitrogen und der NOVEX-Electrophoresis GmbH.

10\*10<sup>6</sup> Zellen/Kavität wurden für 60 min stimuliert. Kernextrakte wurden präpariert wie es an anderer Stelle beschrieben worden ist <sup>191</sup>. 20  $\mu$ g Gesamtprotein wurden auf ein 4-12% Bis-Tris Gel mit MOPS Laufpuffer unter reduzierenden Bedingungen getrennt. NFATc3 wurde mit Antikörpern der Santa Cruz Biotechnology Inc. detektiert (sc-8321 and sc-2030). Die Peroxidase Chemiluminescence Markierungsreaktion wurde mit Lumi-Lightplus der Roche Diagnostics GmbH und dem Fluor-S Multi Imager der Fa. Biorad.

## 2.2.5. EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

EMSAs und Supershifts wurden in Anlehnung an die Methode Schaffner, W. et al. <sup>192</sup> und Verbesserungen von Krzesz, R. et al. <sup>191</sup> durchgeführt.

### **Markierung der Oligonucleotide (5'- end labelling kit: Amersham RPN 1509) :**

- 5'-OH DNA (5pmol, 5'-ends) 1,5  $\mu$ l
- 10 X Phosphorylationspuffer 0,5  $\mu$ l
- T4 PNK (10 units/ $\mu$ l) 0,5  $\mu$ l
- [ $\gamma$ -32 P]-ATP (5000 Ci/mmol, 10mCi/ml) 2,5  $\mu$ l
- 30 ' bei 37 °C inkubieren
- Enzymdeaktivierung bei 70 °C für 10 ' deaktivieren
- 
- Aufreinigung der markierten Oligonucleotide gemäß der Angaben des Qiagen Nucleotide Removal Kits:
- Eluat auf 40000 cpm/ $\mu$ l in TE - Puffer verdünnen)

### Präparation der Kernextrakte

- Kulturschalen auf Eis stellen.. Adherente Zellen mit einem Zellschaber lösen und mit dem Überstand (ca. 3 ml) in 15 ml Greinerzentrifugenröhrchen überführen.  $10 \cdot 10^6$  Zellen werden bei 300 – 600 g 1 min zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand für spätere ELISA-Bestimmungen bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Das Zellpellet wird in 2m eisgekühltem,  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freien PBS resuspendiert und kurz zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Zellpellet wird in 400  $\mu\text{l}$  Puffer A luftblasenfrei aufgenommen. Anschließend werden die Zellen zum Anschwellen für 15 min auf Eis gestellt. 25  $\mu\text{l}$  Igepal (Fa. Sigma, I-3021) werden zur Lyse der Zellwand in die Zellsuspension pipettiert. Nach Vortexen für 15 sec werden die Lysate bei 4500 g und  $+4^\circ\text{C}$  1 min zentrifugiert. Der Überstand zu 80  $\mu\text{l}$  aliquotiert und als cytoplasmatischer Extrakt in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Das Zellkernpellet wird in 50  $\mu\text{l}$  des eisgekühlten, hypotonischen Puffer C luftblasenfrei resuspendiert. Nach 15-minütigen Schütteln im Eiswasserbad werden die Probe 5 min bei 12000 g und  $+4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Anschließend werden die Überstände in Aliquots zu 10  $\mu\text{l}$  in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### Bindungsreaktion und Gelelektrophorese

- Das Gemisch für die Bindungsreaktion bestand aus 4  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein der Kernextrakte, 3  $\mu\text{l}$  5x Bindungspuffer (50 mM HEPES; pH 7,5; 500 mM NaCl; 5 mM EDTA; 25% Glycerin [w/v]), 2  $\mu\text{l}$  10 mM DTT 1  $\mu\text{l}$  poly-[dA-dT, 1mg/ml] und wahlweise 2  $\mu\text{l}$  des Supershift-Antikörpers (200  $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$  PBS) mit einem Gesamtvolumen von 15  $\mu\text{l}$ . Vor der Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  eines radioaktiv markierten Oligonukleotids (ca. 20000-40000 cpm/  $\mu\text{l}$ ) konnte 1  $\mu\text{l}$  eines 10-100-fach höher konzentrierten unmarkierten Oligonukleotids als Kompetitor zugegeben werden. Die Dauer der Bindungsreaktion betrug 30 min und wurde auf Eis durchgeführt. Wurde auf eine Supershift-Analyse verzichtet, entfiel eine zusätzliche Präinkubationszeit von 30 min. Am Ende der Bindungsreaktion wurde 8 - 10  $\mu\text{l}$  des Gemisches auf ein 6%iges Polyacrylamidgel mit 0,5 x TBE geladen, das zuvor für eine Stunde bei 350 Volt in 0,25xTBE-Puffer und unter Kühlung kalibriert worden war. Die eigentliche Gelelektrophorese für die Proben wurde für 2,5 Stunden unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Anschließend wurden die Gele in einer wässrigen Lösung mit 10 % Essigsäure und 12 % Methanol fixiert. Das fixierte Gel wurde im Geltdrockner für die Autoradiografie vorbereitet. Ein geeigneter Röntgenfilm (Kodak X-OMAT) wurde auf das getrocknete Gel gelegt und über einen angemessenen Zeitraum exponiert. Danach wurde der Film entwickelt und ausgewertet.

## 2.2.6. Decoy-Technik

Zur funktionelle Untersuchung von einzelnen Promotorregionen werden Promotorfragmente als Oligonukleotide nachsynthetisiert. Nach einer erfolgreichen Transfektion rekrutieren diese Köder (engl. für Decoy) die potentiellen Transkriptionsfaktoren, die normalerweise jene Promotorregion binden würden. Phosphorthioat-Modifikationen schützen die Oligonukleotide vor einer Degradation durch Endo- und Exonukleasen.

Es wurde die Methode von Krzesz, R. et al ( **Krzesz R**, Wagner AH, Cattaruzza M, Hecker M FEBS Lett 1999 Jun 18;453(1-2):191-6 ) angewendet. Alternativ wurde für den Schritt der Transfektion mit den Lipofektionsreagenzien der Fa. Qiagen nach den Herstellerangaben gearbeitet.

Folgende Decoy-Oligonukleotide wurden eingesetzt:

- **dNF-κB**

Phosphorothioat

5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C -3'  
3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG ACC G -5'

- **scrdNF-κB** (scrambled; Negativkontrolle von dNF-κB)

5'-AGC GTA GAC TGC AGT TCG GTG C -3'  
3'-TCG CAT CTG ACG TCA AGC CAC G -5'

- **dAP1con** (decoy AP1con)

5'-CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA- 3'  
3'-GCG AAC TAC TGA GTC GGC CTT- 5'

- **dHMCPATKd** (decoy HMCPATKd)

5'- CCT CTG GGG GCC TTT CCC TTG TGT GT-3'  
3'- GGA GAC CCC CGG AAA GGG AAC ACA CA-5'

- **ditMCPlong** (decoy ditMCPlong)

5'- CCT CTG GGG GCC TTT CCC TTG **TGT GTC** CCC-3'  
3'- GGA GAC CCC CGG AAA GGG AAC ACA CAG GGG-5'

---

## III. Ergebnisse

### 1. Charakterisierung der myelomonocytierten Zelllinie THP-1 als Modell für die Stimulation *ex vivo* isolierter humaner Monozyten durch bakterielle Substanzen

Die myelomonocytierte Zelllinie THP-1 wurde vielfach zur Untersuchung immunologischer Fragestellungen bei humanen Monozyten und Makrophagen eingesetzt. Mit Hilfe dieser Zellen wurde beispielsweise eine NF- $\kappa$ B-Bindungsstelle des IL-12p40-Promotors in monozytären Zellen identifiziert<sup>193</sup>. Des Weiteren konnten Untersuchungen an THP-1-Zellen eine Assoziation zwischen der Expression der Carboxypeptidase M und der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen zeigen<sup>194</sup>.

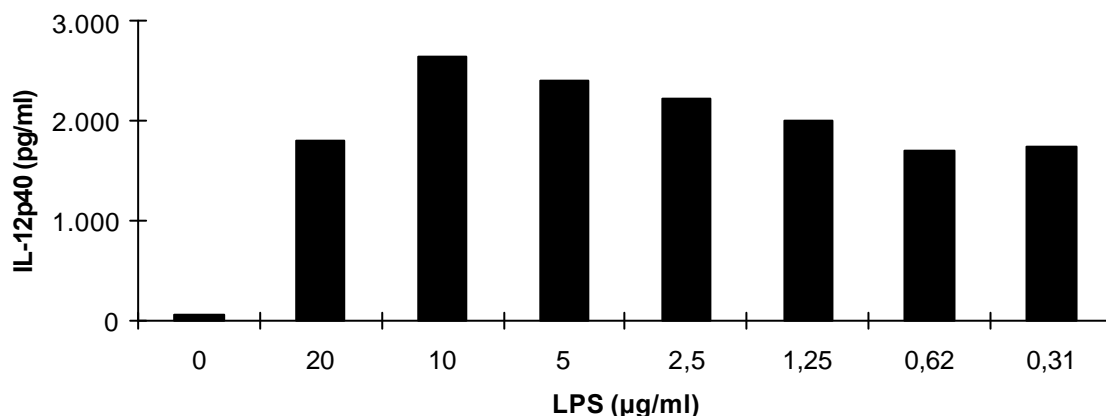
#### 1.1. Bildung der Zytokine IL-6, TNF- $\alpha$ und IL-12p40 als Aktivierungsparameter nach Stimulation von monozytären Zellen durch LPS

Monozyten und Makrophagen können als Zellen der angeborenen Immunabwehr direkt durch Gram-negative Bakterien aktiviert werden, da sie durch die Oberflächenexpression der TLRs und CD 14 das mikrobielle Produkt Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil Gram-negativer Bakterien, erkennen können. Die Stimulation von Monozyten bzw. Makrophagen mit LPS induziert die Expression von (inflammatorischen) Zytokinen wie Tumor Nekrose Faktor - alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin (IL) -12 und IL-6.



Zunächst wurde die Frage untersucht, ob THP-1-Zellen ein geeignetes *in vitro* System darstellen, um die Induktion und Expression von Zytokinen und Chemokinen bei primären aus dem peripheren venösen Blut isolierten Monozyten widerzuspiegeln (PBMC-Monozyten). Dazu wurden frisch isolierte Monozyten und THP-1-Zellen in Medium inkubiert und wahlweise mit oder ohne LPS behandelt. Aus den Kulturüberständen wurden die verschiedenen Zytokine mit Hilfe der ELISA-Technik quantifiziert und die Ergebnisse für beide Zelltypen miteinander verglichen.

Die Aktivierung von PBMC-Monozyten mit LPS führt zur Expression von IL-12p40, TNF- $\alpha$  und IL-6 (Abb.1, Abb.2 und Abb.3).

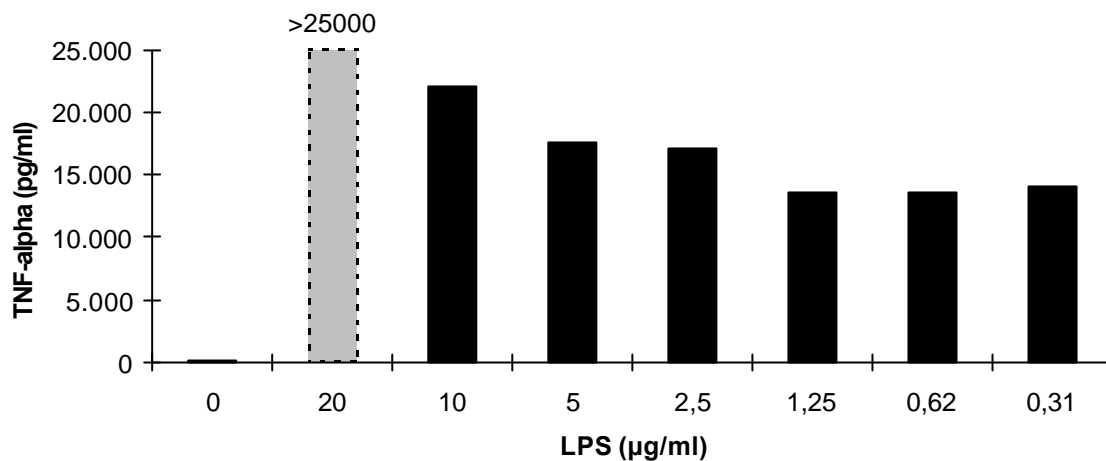


**Abb. 1**

Etablierung der Stimulationsbedingungen zur Induktion von Interleukin (IL)-12p40 mit Lipopolysaccharid (LPS) bei PBMC-Monozyten.

Monozyten wurden mittels Ficoll Dichtegradientenzentrifugation und anschließender positiver Selektion gegen CD 14 mittels magnetischer Zelltrennung aus venösen Blut gesunder Spender isoliert ( CD14<sup>+</sup> PBMC-Monozyten).  $3 \cdot 10^5$  Zellen/Kavität wurden in Mikrotiterplatten für 24 Stunden kultiviert. Zytokine wurden aus dem Kulturüberstand mittels ELISA quantifiziert. Einzelheiten der Verfahren sind unter dem Kapitel Material und Methoden beschrieben. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS ("Medium") kultiviert und wurden wahlweise mit unterschiedlichen Konzentrationen an LPS stimuliert. Die untere Detektionsgrenze für IL-12p40 betrug 15 pg/ml. Ansätze, in denen kein Zytokin detektiert wurde, sind als N.D. ("not detected") gekennzeichnet.

Stimulation von PBMC-Monozyten mit 10µg/ml LPS induziert detektierbare und maximale Mengen an IL-12p40.

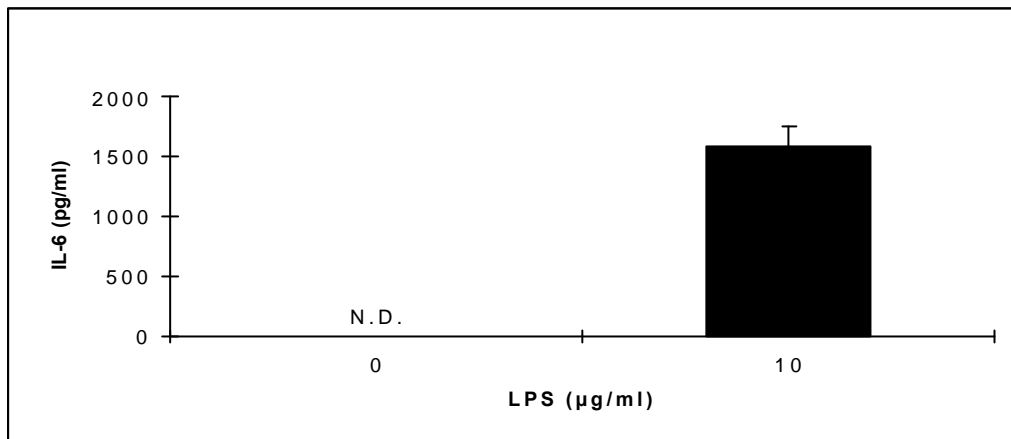
**Abb. 2**

Etablierung der Bedingungen zur Stimulation der TNF- $\alpha$ -Bildung in PBMC-Monozyten mit Lipopolysaccharid (LPS).

Monozyten wurden mittels Ficoll Dichtegradientenzentrifugation und anschließender positiver Selektion gegen CD 14 mittels magnetischer Zelltrennung aus venösen Blut gesunder Spender isoliert (CD14<sup>+</sup> PBMC-Monozyten).  $3 \cdot 10^5$  Zellen/Kavität wurden in Mikrotiterplatten für 24 Stunden kultiviert. Zytokine wurden aus dem Kulturüberstand mittels ELISA quantifiziert. Einzelheiten der Verfahren sind im Kapitel Material und Methoden beschrieben. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS ("Medium") kultiviert und wahlweise mit unterschiedlichen Konzentrationen an LPS stimuliert. Die untere Detektionsgrenze für TNF- $\alpha$  betrug 15 pg/ml, die obere 25000 pg/ml. Ansätze, in denen kein Zytokin detektiert wurde, sind als N.D. ("not detected") gekennzeichnet.

Stimulation mit 10 µg/ml LPS induziert in PBMC-Monozyten detektierbare Mengen an TNF- $\alpha$ .

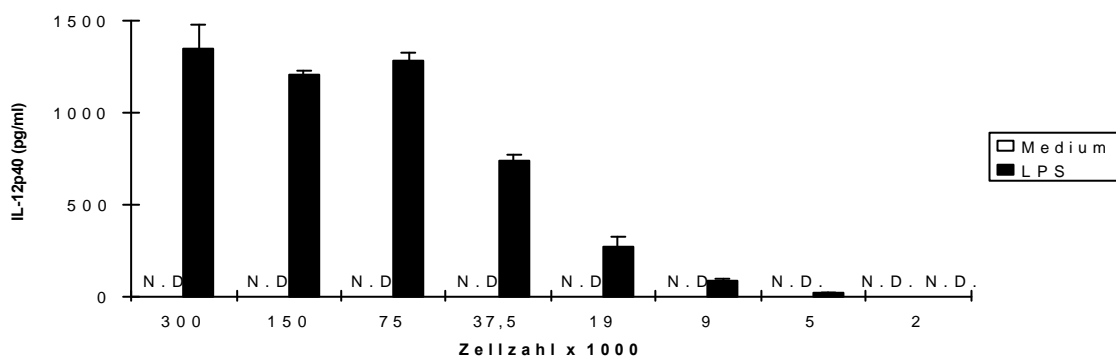
Lipopolysaccharid induziert alle drei Zytokine über einen breiten Konzentrationsbereich, wie Titrationsexperimente (50 ng/µl - 20 µg/ml) gezeigt haben. Die Verwendung einer Endkonzentration von 10 µg/ml führt zu einem starken Anstieg der Zytokine im Kulturüberstand. Eine Versuchsreihe mit abnehmenden Zellzahlen ergab, daß bei Verwendung von  $1-3 \cdot 10^5$  Monozyten / Kultur einer Mikrotiterplatte die Induktion der Zytokinbildung im optimalen Bereich liegt (Abb. 4).

**Abb. 3**

Aktivierung der IL-6-Expression von PBMC-Monozyten durch Stimulation mit LPS.

Monozyten wurden mittels Ficoll Dichtegradientenzentrifugation und anschließender positiver Selektion gegen CD 14 durch magnetischer Zelltrennung aus peripherem venösen Blut gesunder Spender isoliert (CD14<sup>+</sup> PBMC-Monozyten).  $3 \cdot 10^5$  Zellen/Kavität wurden in Mikrotiterplatten für 24 Stunden kultiviert. Zytokine wurden aus dem Kulturüberstand mittels ELISA quantifiziert. Einzelheiten der Verfahren sind unter dem Kapitel Material und Methoden beschrieben. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS ("Medium") kultiviert und konnten wahlweise mit LPS stimuliert werden. Die Detektionsgrenze für IL-6 betrug 15 pg/ml. Ansätze, in denen kein Zytokin detektiert wurde, sind als N.D. ("not detected") gekennzeichnet. Unstimulierte PBMC-Monozyten exprimieren keine detektierbaren oder geringe Mengen (40 pg/ml) an IL-6. Die Standardabweichung der Werte ist ebenfalls dargestellt.

Aktivierung von PBMC-Monozyten mit 10µg/ml LPS führt zu deutlichen Mengen an IL-6 in Kulturüberständen.

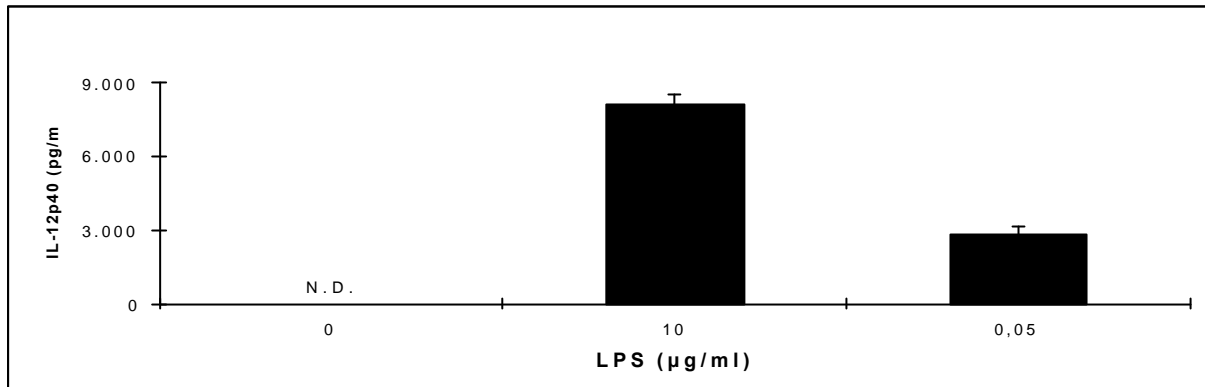
**Abb. 4**

Etablierung der Stimulationsbedingungen hinsichtlich eingesetzter Zellzahlen zur Induktion von Interleukin (IL)-12p40 mit Lipopolysaccharid (LPS) bei PBMC-Monozyten.

Monozyten wurden mittels Ficoll Dichtegradientenzentrifugation und anschließender positiver Selektion gegen CD 14 mittels magnetischer Zelltrennung aus venösen Blut gesunder Spender isoliert (PBMC-Monozyten). Die angegebene Zellzahl / Kavität (Zellzahl x 1000) wurden in Mikrotiterplatten für 24 Stunden kultiviert. Zytokine wurden aus dem Kulturüberstand mittels ELISA quantifiziert. Einzelheiten der Verfahren sind unter dem Kapitel Material und Methoden beschrieben. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS ("Medium") kultiviert und konnten wahlweise mit 10 µg/ml LPS stimuliert werden. Die Detektionsgrenze für IL-12p40 betrug 15 pg/ml. Ansätze, in denen kein Zytokin detektiert wurde, sind als N.D. ("not detected") gekennzeichnet.

$3 \cdot 10^5$  Zellen / Kavität sind zur Detektion von IL-12p40 von PBMC-Monozyten bei Stimulation mit 10µg/ml LPS geeignet.

Die Aktivierung von THP-1-Zellen mit LPS führt wie bei PBMC-Monozyten ebenfalls zur Expression von IL-12p40, TNF- $\alpha$  und IL-6 ( Abb. 5, Abb. 6 und Abb. 7); die beiden *in vitro* Systeme gleichen sich hinsichtlich der Induktion der Zytokinbildung weitgehend.

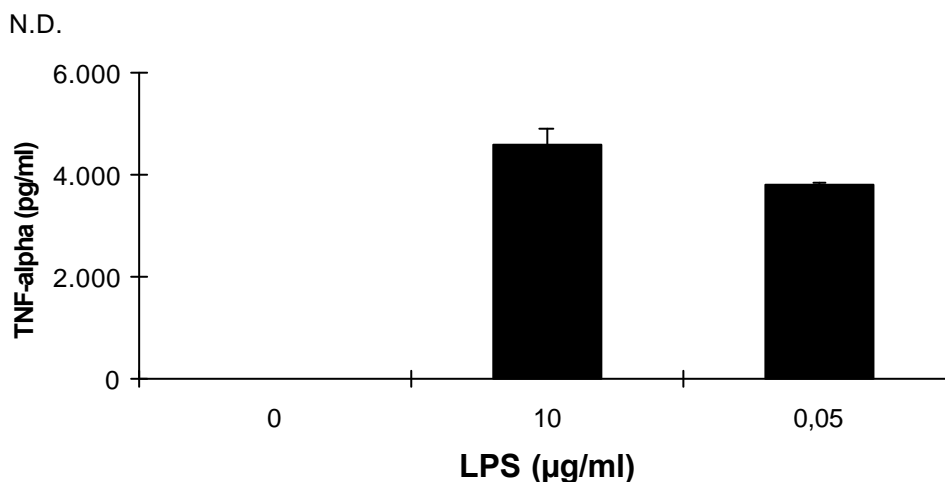


**Abb. 5**

Dosisabhängige Aktivierung der IL-12p40-Expression in THP-1-Zellen bei Stimulation mit LPS.

$2 \cdot 10^5$  Zellen/Kavität wurden in Mikrotiterplatten für 24 Stunden kultiviert. Zytokine wurden aus dem Kulturüberstand mittels ELISA quantifiziert. Einzelheiten der Verfahren sind im Kapitel Material und Methoden beschrieben. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS ("Medium") kultiviert und konnten wahlweise mit unterschiedlichen Konzentrationen an LPS stimuliert werden. Die Detektionsgrenze für IL-12p40 betrug 15 pg/ml. Ansätze, in denen kein Zytokin detektiert wurde, sind als N.D. ("not detected") gekennzeichnet.

THP-1-Zellen zeigen eine dosisabhängige Induktion von IL-12p40 bei Aktivierung mit LPS, vergleichbar mit PBMC-Monozyten.

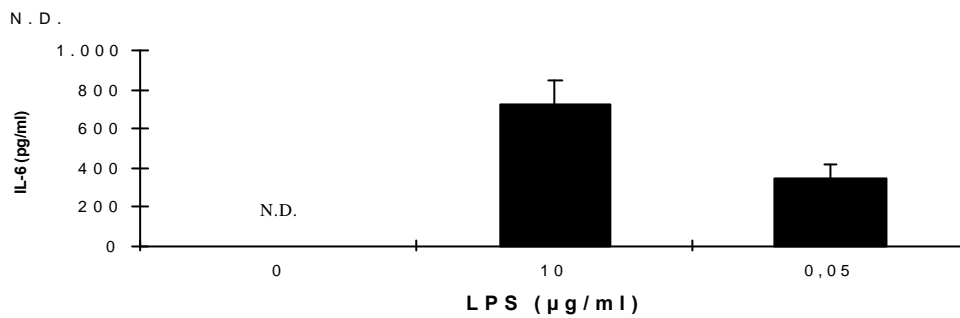


**Abb. 6**

Dosisabhängige Aktivierung der TNF- $\alpha$ -Expression in THP-1-Zellen bei Stimulation mit LPS.

$2 \cdot 10^5$  Zellen/Kavität wurden in Mikrotiterplatten für 24 Stunden kultiviert. Zytokine wurden aus dem Kulturüberstand mittels ELISA quantifiziert. Einzelheiten der Verfahren sind im Kapitel Material und Methoden beschrieben. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS ("Medium") kultiviert und konnten wahlweise mit unterschiedlichen Konzentrationen an LPS stimuliert werden. Die Detektionsgrenze für TNF- $\alpha$  betrug 15 pg/ml. Ansätze, in denen kein Zytokin detektiert wurde, sind als N.D. ("not detected") gekennzeichnet.

THP-1-Zellen zeigen eine dosisabhängige Induktion von TNF- $\alpha$  bei Aktivierung mit LPS, vergleichbar mit PBMC-Monozyten.

**Abb. 7**

Dosisabhängige Aktivierung der IL-6 Expression in THP-1-Zellen bei Stimulation mit LPS.

$2 \cdot 10^5$  Zellen/Kavität wurden in Mikrotiterplatten für 24 Stunden kultiviert. Zytokine wurden aus dem Kulturüberstand mittels ELISA quantifiziert. Einzelheiten der Verfahren sind im Kapitel Material und Methoden beschrieben. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS ("Medium") kultiviert und konnten wahlweise mit unterschiedlichen Konzentrationen an LPS stimuliert werden. Die Detektionsgrenze für IL-6 betrug 15 pg/ml. Ansätze, in denen kein Zytokin detektiert wurde, sind als N.D. ("not detected") gekennzeichnet.

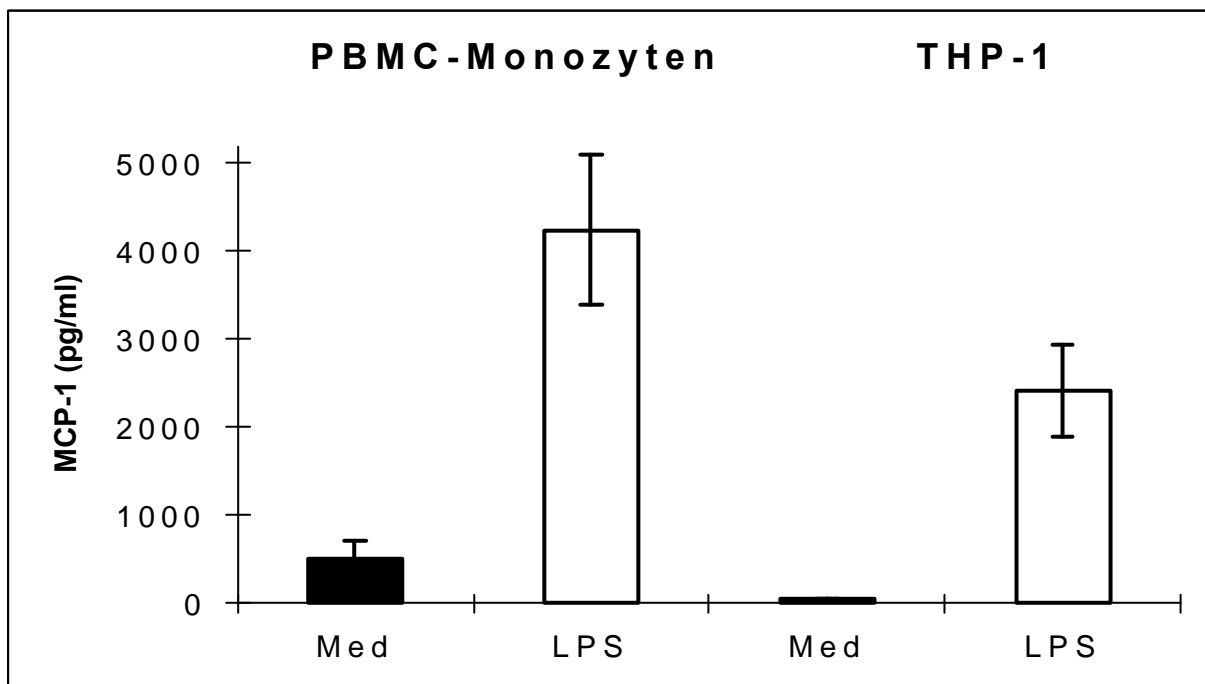
THP-1-Zellen zeigen eine dosisabhängige Induktion von IL-6 bei Aktivierung mit LPS wie bei PBMC-Monozyten, die Höhe der Expression ist aber geringer.

## 1.2. Bildung des Chemokins MCP-1 als Aktivierungsparameter nach Stimulation von Monozyten durch LPS

An Tiermodellen für die Alveolitis und Glomerulonephritis konnte gezeigt werden, daß im Rahmen entzündlicher Prozesse die lokalen Zellen wie mesangiale Zellen der Glomeruli oder Fibroblasten MCP-1 sezernieren können<sup>195;196</sup>. Dadurch können Monozyten MCP-1 an den Ort der Infektion rekrutiert werden. Interessanterweise können Monozyten, Zielzellen von MCP-1, dieses Chemokin selbst synthetisieren und damit zur Pathogenese von inflammatorischen Erkrankungen beitragen, wie dies beispielsweise für die durch das Ross River Virus ausgelöste epidemische Polyarthritits beschrieben wurde<sup>197</sup>. Aufgrund der physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung von MCP-1 sowie der

autosekretorischen Eigenschaften der Monozyten, interessierte die Frage, ob LPS monozytäre Zellen zur Sekretion von MCP-1 aktivieren kann. Dazu wurden PBMC-Monozyten sowie myelomonozytäre THP-1-Zellen mit LPS stimuliert und die Bildung von MCP-1 mittels ELISA und RT-PCR untersucht.

Eine Stimulation mit LPS führt sowohl in PBMC-Monozyten als auch in THP-1-Zellen zur MCP-1-Expression (Abb.8). Die basale Expression bei Kultivierung ohne LPS schwankt für PBMC-Monozyten bei den einzelnen Experimenten, wohingegen unstimulierte THP-1-Zellen reproduzierbar kaum detektierbare MCP-1-Mengen sezernieren.



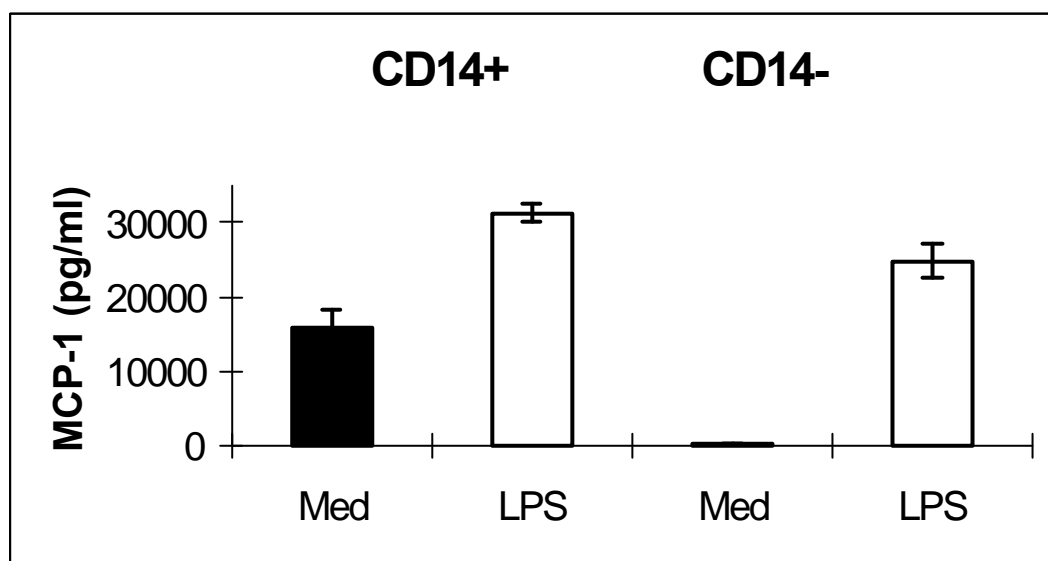
**Abb. 8**

Vergleich der MCP-1-Expression von PBMC-Monozyten und THP-1-Zellen bei Aktivierung mit LPS.

$4 \cdot 10^5$  PBMC-Monozyten / Kavität bzw.  $3 \cdot 10^5$  THP-1-Zellen / Kavität wurden für 24 Stunden auf Mikrotiterplatten inkubiert. Dabei wurde wahlweise RPMI 1640-Medium mit 10% FCS ohne LPS ("Medium") oder mit LPS ("LPS") in einer Endkonzentration von  $10 \mu\text{g/ml}$  eingesetzt. Aus den Kulturüberständen wurde MCP-1 mittels ELISA bestimmt.

Aktivierung durch LPS induziert sowohl in PBMC-Monozyten als auch in der monozytären Linie THP-1 MCP-1, wobei die basale Expression bei PBMC-Monozyten über dem Niveau der THP-1-Zellen liegen kann.

Als eine mögliche Ursache für die schwankende basale MCP-1-Expression wurde die Aufreinigung der PBMC-Monozyten durch die Positiv-Selektion mit Hilfe von Anti-CD14-Antikörper-beschichteten Magnetpartikeln in Erwägung gezogen. Deshalb wurden THP-1-Zellen dem gleichen Verfahren der Positiv-Selektion unterzogen und die MCP-1-Expression dieser THP-1-Zellen mit unselektierten THP-1-Zellen verglichen. In Übereinstimmung mit der Hypothese zeigen die positiv selektierten THP-1-Zellen eine erhöhte basale MCP-1-Expression wie sie bei PBMC-Monozyten zu beobachten ist (Abb. 9). Die CD14-negative Fraktion und THP-1-Zellen, die nicht dem Selektionsverfahren unterzogen wurden, zeigen keine signifikante basale Expression. Hinsichtlich der MCP-1-Expression entsprechen THP-1-Zellen daher den PBMC-Monozyten, mit dem Vorteil, daß eine Positiv-Selektion und deren Einflüsse vermieden werden können.



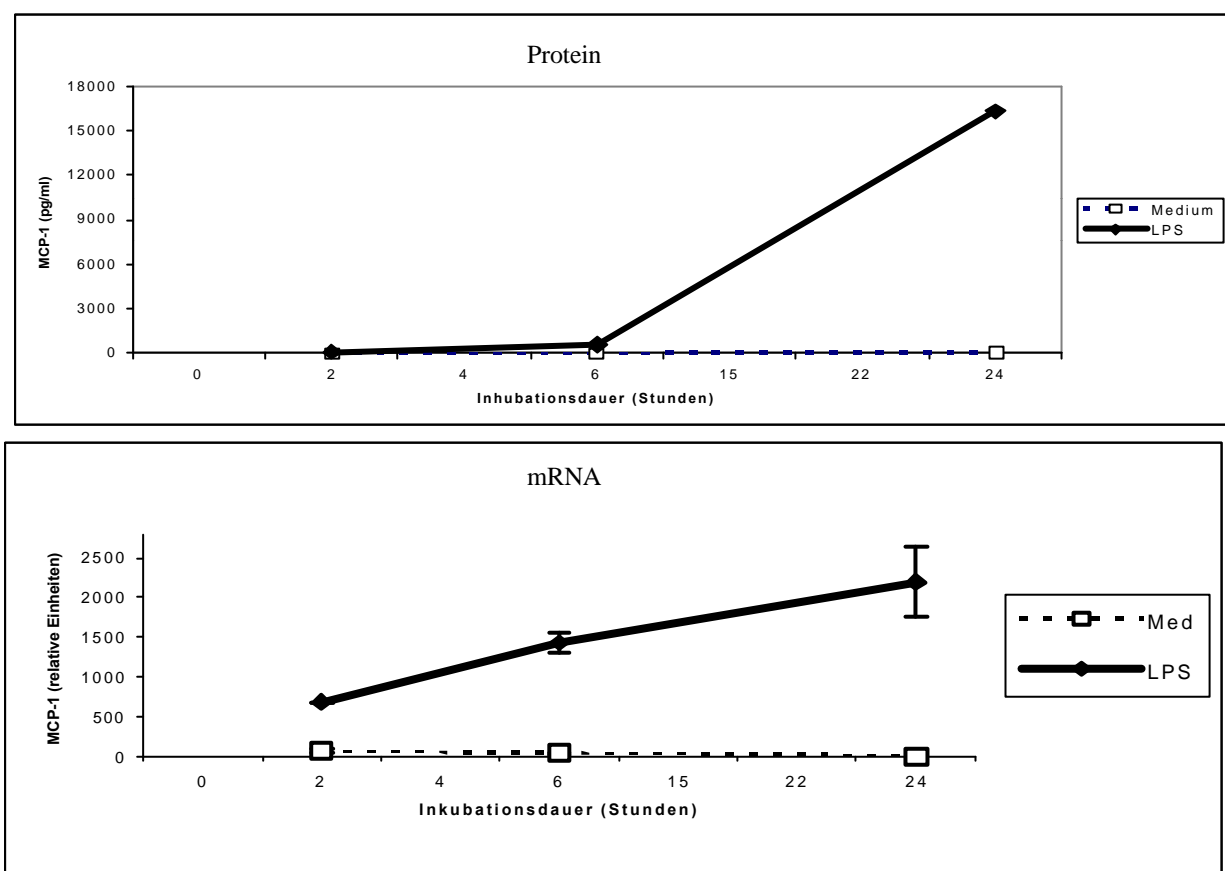
**Abb. 9**

Einfluß der CD14 -Selektion auf die MCP-1-Expression von THP-1-Zellen bei Aktivierung mit LPS.

Die Zellen wurden wahlweise einer Positiv-Selektion für CD14 (CD14+) unterzogen. Dabei wurde das Verfahren zur Isolierung von PBMC-Monozyten verwendet, wie es im Kapitel Material und Methoden beschrieben ist.  $3 \cdot 10^5$  THP-1-Zellen/Kavität wurden für 24 Stunden auf Mikrotiterplatten inkubiert. Dabei wurde wahlweise RPMI 1640-Medium mit 10% FCS ohne LPS ("Medium") oder mit LPS ("LPS") in einer Endkonzentration von  $10 \mu\text{g/ml}$  eingesetzt. Aus den Kulturüberständen wurde MCP-1 mittels ELISA bestimmt.

Die Positiv-Selektion von THP-1-Zellen über CD14 beeinflusst die basale MCP-1-Expression, die mit dem Expressions-Niveau der positiv selektierten PBMC-Monozyten vergleichbar ist.

Im folgenden wurde der Zeitverlauf der MCP-1-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene untersucht. Dazu wurden unbehandelte oder mit LPS stimulierte THP-1-Zellen für unterschiedliche Zeitperioden inkubiert und anschließend RT-PCRs mit der zellulären RNA oder ELISAs für MCP-1 mit den Kulturüberständen durchgeführt. Maximale Mengen an MCP-1 wurden sowohl auf mRNA als auch Protein-Ebene nach 20-24 Stunden gemessen (Abb. 10), ähnlich wie dies auch für IL-12p40 gefunden wurde (Abb. 11).



**Abb. 10**

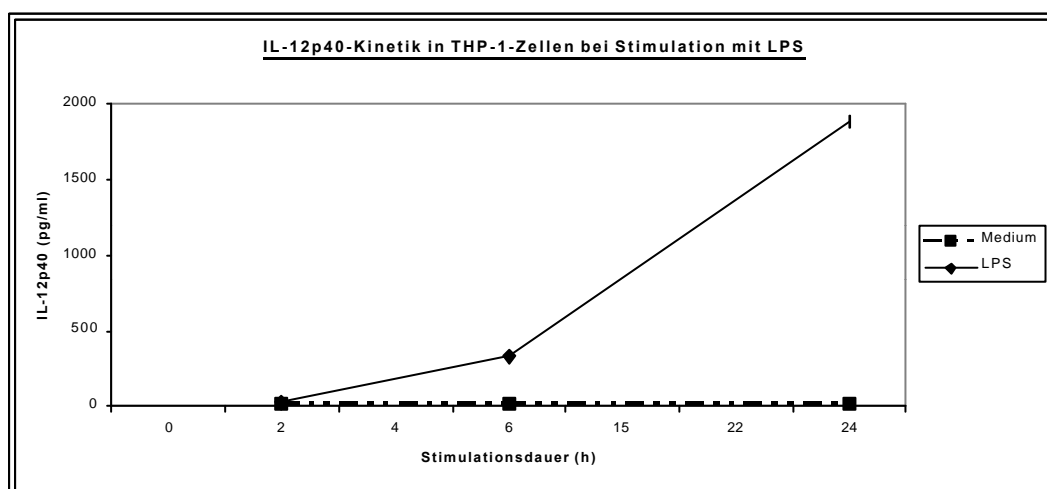
Zeitverlauf der MCP-1-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene bei Stimulation mit LPS.

$4 \cdot 10^6$  THP-1-Zellen/Kavität wurden in 2ml-Kulturenplatten für unterschiedliche Zeitperioden in Medium ohne oder mit LPS ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) kultiviert. Zelluläre RNA wurde für RT-PCR Analysen der MCP-1-Expression eingesetzt, die Kulturüberstände dienen der Quantifizierung der MCP-1-Proteinmengen mittels ELISA, wie in Material und Methoden beschrieben. Die Zellkulturen wurden jeweils zweifach angesetzt. Mehrere unabhängige Experimente konnten die Ergebnisse bestätigen. Die Detektionsgrenze für MCP-1 im ELISA betrug  $31 \text{ pg/ml}$ . Ansätze, in denen kein MCP-1 detektiert wurde, sind als N.D. ("not detected") gekennzeichnet.

Maximale Mengen an mRNA und Protein für MCP-1 werden nach 24 Stunden nachgewiesen.



Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, daß Aktivierung von PBMC-Monozyten mit LPS *in vitro* dosisabhängig zur Induktion und Expression von der Zytokine IL-12p40, IL-6 und TNF- $\alpha$  führt. Ebenso kommt es zur Expression des Chemokins MCP-1. Die monozytäre Zelllinie THP-1 eignet als Modellzelle zur weiteren Charakterisierung dieser Aktivierung monozytärer Zellen mit dem Vorteil, daß Schwankungen der basalen MCP-1-Expression, wie sie nach Isolierung von frischen Monozyten aus PBMC auftreten, vermieden werden können.. Die Zeitverläufe der MCP-1- und IL-12p40-Expression zeigen ein spätes Maximum nach ca 20-24 Stunden im Gegensatz zur Kinetik der Expression von beispielsweise TNF- $\alpha$ .  $1-3 \cdot 10^5$  THP-1-Zellen / Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit LPS in einer Endkonzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  sind geeignete Bedingungen zur Detektion der Induktion von IL-12p40, MCP-1, TNF- $\alpha$  und IL-6.



**Abb. 11**

Zeitverläufe der IL-12p40-Expression bei Stimulation von THP-1-Zellen mit Lipopolysaccharid (LPS).

$4 \cdot 10^6$  THP-1-Zellen/Kavität wurden auf Gewebekulturplatten mit 6 Kavitäten verteilt und über den angegebenen Zeitraum kultiviert. Die Endkonzentration für LPS betrug  $10 \mu\text{g/ml}$ , Medium bezeichnet den Versuchsansatz der Negativkontrolle mit RPMI 1640-Medium und 10% FCS ohne LPS. Anschließend wurde IL-12p40 im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt.

Die maximale IL-12p40-Expression wird nach etwa 24 Stunden erreicht.

## 2. Mechanismen der Signaltransduktion bei der Bildung von MCP-1 durch monozytäre Zellen

Zur weiteren Charakterisierung der Mechanismen, die in monozytären Zellen zur Bildung von MCP-1 führen, wurde am Modell der Linie THP-1 zunächst geprüft, ob neben LPS auch andere bakterielle Substanzen sowie Stimulatoren bestimmter Signalwege wie Phorbol ester oder ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor die MCP-1-Expression induzieren können. Weiter wurden pharmakologische Inhibitoren eingesetzt, um Hinweise auf die Beteiligung verschiedener intrazellulärer Signaltransduktionswege zu erhalten. Die Beteiligung von Transkriptionsfaktoren wurde mittels Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)s und Westernblot-Analysen von SDS-PAGE-Experimenten nukleärer Extrakte untersucht. Abschließend wurde die Frage, an welche Regionen des MCP-1-Promotors die beteiligten Transkriptionsfaktoren binden können, mittels promotor spezifischer EMSAs verfolgt.

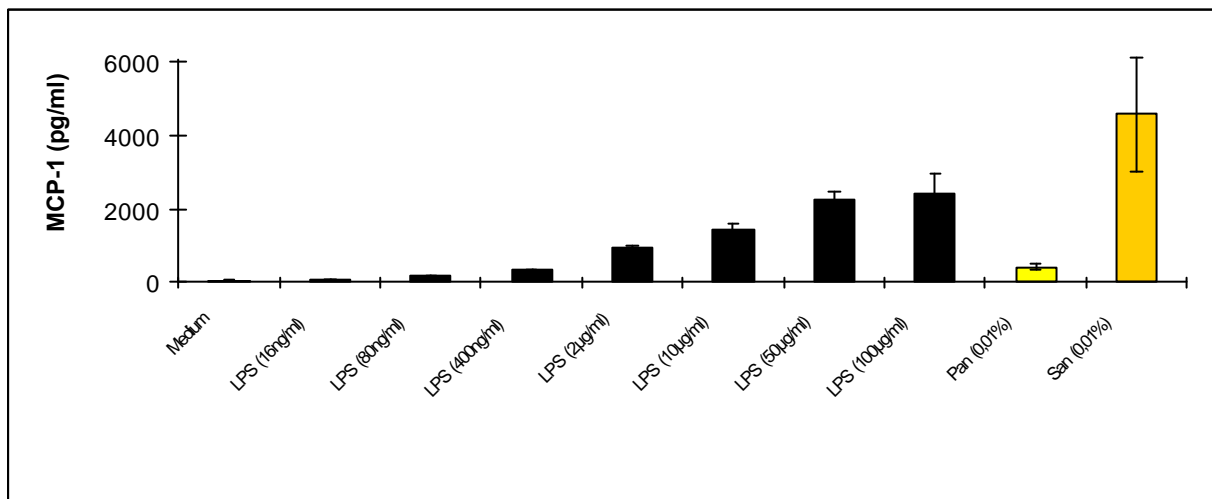
### 2.1. Vergleich verschiedener bakterieller und nicht-bakterieller Stimuli bei der Bildung des Chemokins MCP-1 durch Makrophagen

Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien, induziert in Endothelzellen MCP-1<sup>198</sup>. Kapsuläre Polysaccharide von dem Gram-positiven Bakterium *Staphylococcus aureus* aktivieren humane Monozyten zur IL-8-Expression, einem Chemokin der CXC-Familie<sup>199</sup>. Daraus ergab sich die Frage, ob Bestandteile Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien MCP-1 in monozytären Zellen induzieren können. Monozytäre THP-1-Zellen wurden daher in Medium kultiviert, das wahlweise LPS oder Präparationen abgetöteter Gram-positiver *Staphylococcus aureus*-Bakterien enthielt. Nach 24 Stunden

wurde die Bildung von MCP-1 mittels ELISA in den Kulturüberständen gemessen. Es zeigte sich, daß THP-1-Zellen sowohl durch LPS Gram-negativer Bakterien als auch durch Sansorbin- und Pansorbin-Präparationen von Gram-positivem *Staphylococcus aureus* zur Expression von MCP-1 dosisabhängig aktiviert werden (Abb.12). So enthielten Ansätze unstimulierter THP-1-Zellen MCP-1-Mengen an der unteren Detektionsgrenze (48 +/- 18 pg/ml ), während sie in Ansätzen mit 50 µg/ml LPS (2273 +/- 184 pg MCP-1 /ml) und mit 0,01% Sansorbin (4574 +/- 1572 pg MCP-1 /ml) nachweisbar waren.

**Abb. 12**

Aktivierung der MCP-1-Expression in monozytären THP-1-Zellen durch Stimulation mit Komponenten

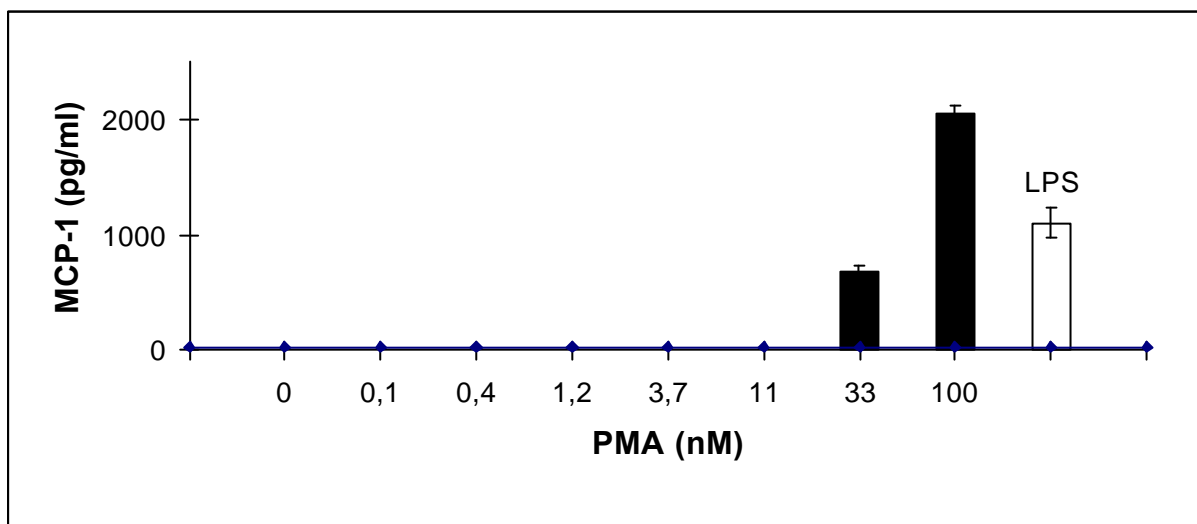


Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien.

$3 \cdot 10^5$  Zellen/Kavität wurden in Mikrotiterplatten für 24 Stunden kultiviert. Zytokine wurden aus dem Kulturüberstand mittels ELISA quantifiziert. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS ("Medium") kultiviert und konnten wahlweise mit unterschiedlichen Konzentrationen an LPS Gram-negativer Bakterien oder Pansorbin- bzw. Sansorbin-Präparationen abgetöteter Gram-positiver *Staphylococcus aureus*-Bakterien stimuliert werden. Die Sansorbin-Präparationen enthalten im Gegensatz zu den Pansorbin-Präparationen kein Immunglobulin bindendes Protein A. Die untere Detektionsgrenze für MCP-1 betrug 31 pg/ml. Ansätze, in denen kein Zytokin detektiert wurde, sind als N.D. ("not detected") gekennzeichnet.

Sowohl Bestandteile Gram-negativer als auch Gram-positiver Bakterien aktivieren monozytäre THP-1-Zellen zur Expression von MCP-1.

Neben LPS sind auch Phorbolster als Induktoren von MCP-1 in Endothelzellen beschrieben worden<sup>198</sup>. Während LPS über die Bindung von CD 14 und den TLR4 die Zellen über komplexe Signalkaskaden stimuliert, wirken Phorbolster direkt durch Aktivierung der Proteinkinase C. Deshalb interessierte die Frage, ob Phorbolster eine MCP-1-Expression auch in monozytären THP-1-Zellen induzieren können. Titrationsexperimente mit dem Phorbolster Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) führten zu nachweisbaren MCP-1-Konzentrationen in 24-stündigen Kulturüberständen ab einer Konzentration von 33 nM PMA (Abb. 13).



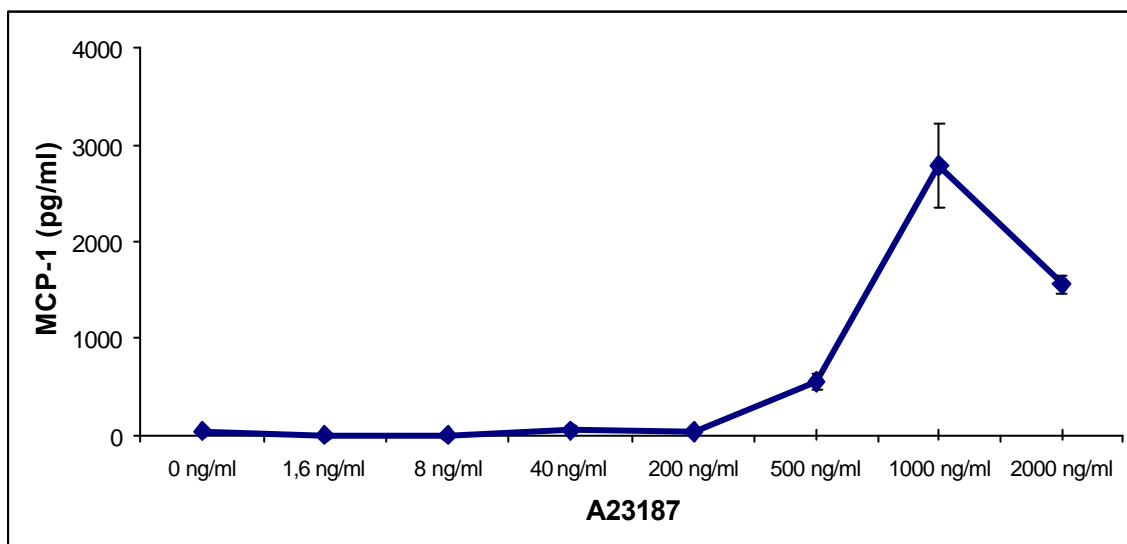
**Abb. 13**

MCP-1-Expression von THP-1-Zellen bei Stimulation mit Phorbolster (PMA).

$3 \cdot 10^5$  Zellen/Kavität wurden in Mikrotiterplatten für 24 Stunden kultiviert. Zytokine wurden aus dem Kulturüberstand mittels ELISA quantifiziert. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS ("Medium") kultiviert und konnten wahlweise mit unterschiedlichen Konzentrationen des Phorbolsters Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) oder 10  $\mu\text{g/ml}$  LPS stimuliert werden. Die untere Detektionsgrenze für MCP-1 betrug 31 pg/ml. Einzelheiten sind im Kapitel Material und Methoden beschrieben. Alle Ansätze enthielten Dimethylsulfoxid (DMSO), das Lösungsmittel von PMA.

Titrationsexperimente mit dem Phorbolster PMA zeigen eine induzierbare MCP-1-Expression in THP-1-Zellen ab einer Endkonzentration von 33 nM.

Aufgrund des Befundes, daß eine Stimulation von Fibroblasten über den IL- 6 Rezeptor zur MCP-1-Bildung führte, bei der auch ein Anstieg von intrazellulärem Calcium beobachtet wurde<sup>200</sup>, wurde im folgenden getestet, ob eine Erhöhung von intrazellulärem Calcium auch in THP-1-Zellen zur Expression von MCP-1 führt. Dazu wurden THP-1-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Calcium-Ionophors A23187 behandelt und nach 24 Stunden die Menge an MCP-1 im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Tatsächlich zeigte sich eine dosisabhängige Induktion der MCP-1-Expression durch Stimulation mit dem Calcium-Ionophor A23187 (Abb.14). Bei Konzentrationen von A23187 ab 5 µM wurden in den Kulturen allerdings Zelltrümmer beobachtet. Die Abnahme der MCP-1-Konzentration bei höheren Konzentrationen des Ionophors kann also auf dessen toxischer Wirkung beruhen.



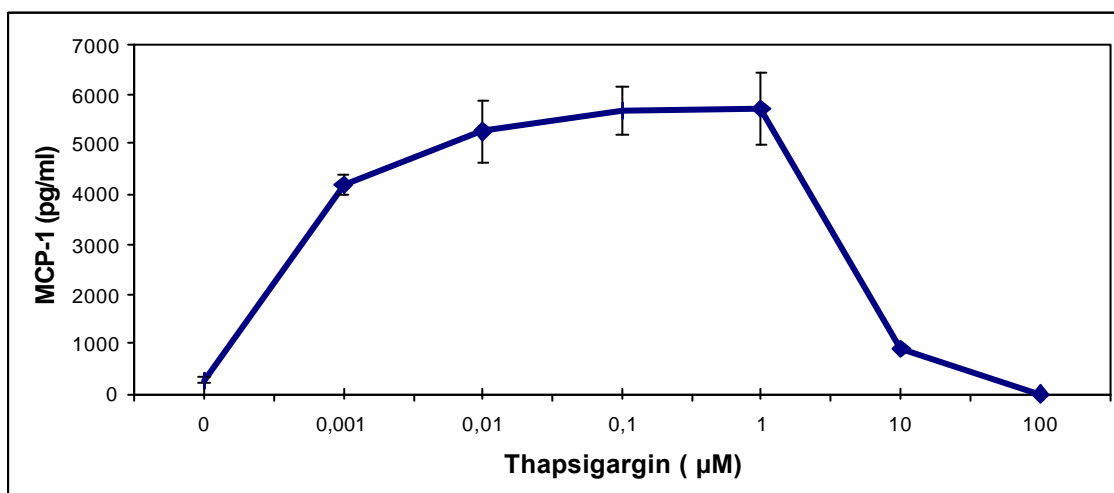
**Abb. 14**

Induktion von MCP-1 durch Erhöhung des intrazellulären Calciums mittels Calcium-Ionophor (A23187).

$3 \cdot 10^5$  THP-1-Zellen/Kavität wurden in Mikrotiterplatten für 24 Stunden kultiviert. Zytokine wurden aus dem Kulturüberstand mittels ELISA quantifiziert. Einzelheiten sind im Kapitel Material und Methoden beschrieben. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS ("Medium") kultiviert und konnten wahlweise mit unterschiedlichen Konzentrationen des Calcium-Ionophors A23187 stimuliert werden. Vorversuche haben gezeigt, daß Konzentrationen von 5000 ng/ml cytotoxisch wirken. Deshalb wurde A23187 in dieser Konzentration in diesem Versuch nicht mehr eingesetzt. Die Detektionsgrenze für MCP-1 betrug 31 pg/ml.

Die Induktion von MCP-1 durch Behandlung von THP-1-Zellen mit dem Calcium-Ionophor A23187 bestätigt die Vermutung, daß ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration zur Expression von MCP-1 führt.

Nachdem gezeigt worden war, daß die Erhöhung des intrazellulären Calciums durch Import von extrazellulären Calcium mittels des Calcium-Ionophors A13187 die MCP-1-Expression aktivieren kann, sollte geprüft werden, ob Verschiebungen des endogenen intrazellulären Calciums zwischen den zellulären Kompartimenten bzw. sekundäre Erhöhungen des cytoplasmatischen Calciums ebenfalls zur MCP-1-Expression führen. Dazu wurden THP-1-Zellen wahlweise ohne oder mit unterschiedlichen Konzentrationen von Thapsigargin behandelt. Diese Substanz inhibiert den  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-abhängigen Export von Calcium aus dem Cytoplasma in das endoplasmatische Reticulum <sup>201</sup>. Infolge dieser selektiven Ausschaltung einer der verschiedenen unidirektionalen Calcium-Kanäle bzw. Pumpen wurde ein Anstieg des cytoplasmatischen Calciums postuliert und gemessen <sup>202</sup>. Die Behandlung von THP-1-Zellen mit Thapsigargin führte tatsächlich zu einer meßbaren dosisabhängigen Induktion von MCP-1, die wie das Calcium-Ionophor einen glockenförmigen Verlauf aufwies, aber einen breiteren Konzentrationsbereich überspannte (Abb. 15).



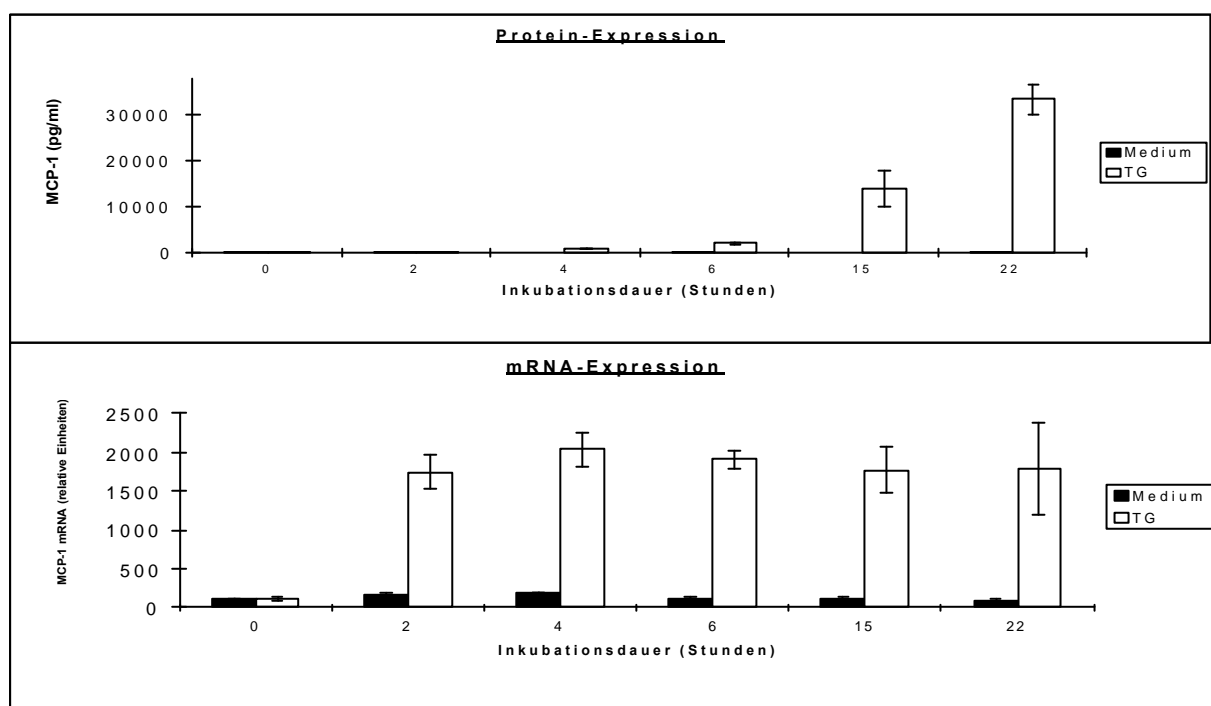
**Abb. 15**

Induktion der MCP-1-Expression in THP-1-Zellen durch den Calcium-ATPase-Inhibitor Thapsigargin.

$4 \cdot 10^5$  Zellen/Kavität wurden in Mikrotiterplatten für 24 Stunden kultiviert. Zytokine wurden aus dem Kulturüberstand mittels ELISA quantifiziert. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS kultiviert und konnten wahlweise mit unterschiedlichen Konzentrationen von Thapsigargin behandelt werden. Zusätzliche Experimente zur Induktion von MCP-1 wiesen nach, daß Konzentrationen von 1 - 5 µM TG noch nicht im supraoptimalen Dosisbereich liegen (Daten nicht gezeigt). Die Detektionsgrenze für MCP-1 betrug 31 pg/ml..

Sekundäre Erhöhungen der cytoplasmatischen Calciumkonzentration durch den Calcium-ATPase-Inhibitor Thapsigargin sind ebenfalls in der Lage, die MCP-1-Expression in THP-1-Zellen zu aktivieren.

Die drei wirksamen Stimuli zur Induktion der MCP-1-Expression - LPS , PMA und Thapsigargin - wurden hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs näher charakterisiert. Dazu wurden THP-1-Zellen wahlweise in Medium ohne oder mit Stimulus inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten die zelluläre RNA für RT-PCR-Analysen sowie der Kulturüberstand für Proteinbestimmungen mittels ELISAs verwendet. ELISAs für MCP-1 aus Kulturüberständen zeigen einen kontinuierlichen Anstieg der Proteinmengen bei allen Stimuli, dessen Maximum zum Endzeitpunkt von 22 - 24 Stunden erreicht wird (Abb. 16 und Abb. 17). RT-PCR-Analysen für MCP-1 deuten auf einen ähnlichen Verlauf für die mRNA-Mengen hin, wobei eine Induktion schon nach 2 Stunden bei Stimulation mit LPS oder Thapsigargin gesehen werden kann (Abb. 17).



**Abb. 16**

Zeitverlauf der MCP-1-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene in THP-1-Zellen bei Behandlung mit dem Calcium-ATPase-Inhibitor Thapsigargin.

$4 \cdot 10^6$  Zellen/Ansatz wurden in Multischalen zu 6 Kavitäten für die angegebenen Zeitperioden kultiviert. Zelluläre mRNA wurde für RT-PCR-Analysen der MCP-1-mRNA-Expression verwendet. Die Protein-Expression wurde mittels ELISA in den entsprechenden Kulturüberständen quantifiziert. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS ("Medium") kultiviert und konnten wahlweise mit TG in einer Endkonzentration von  $2,5 \mu\text{M}$  behandelt werden. Die Detektionsgrenze für MCP-1 betrug  $31 \text{ pg/ml}$ .

Unter Behandlung mit Thapsigargin nimmt die Proteinmenge an MCP-1 von Kulturüberständen kontinuierlich bis 22 Stunden Inkubationsdauer zu. RT-PCR-Analysen für MCP-1 zeigen eine Aktivierung der mRNA-Expression schon nach 2 Stunden Inkubationsdauer, die bis zum Endzeitpunkt von 22 Stunden anhält.

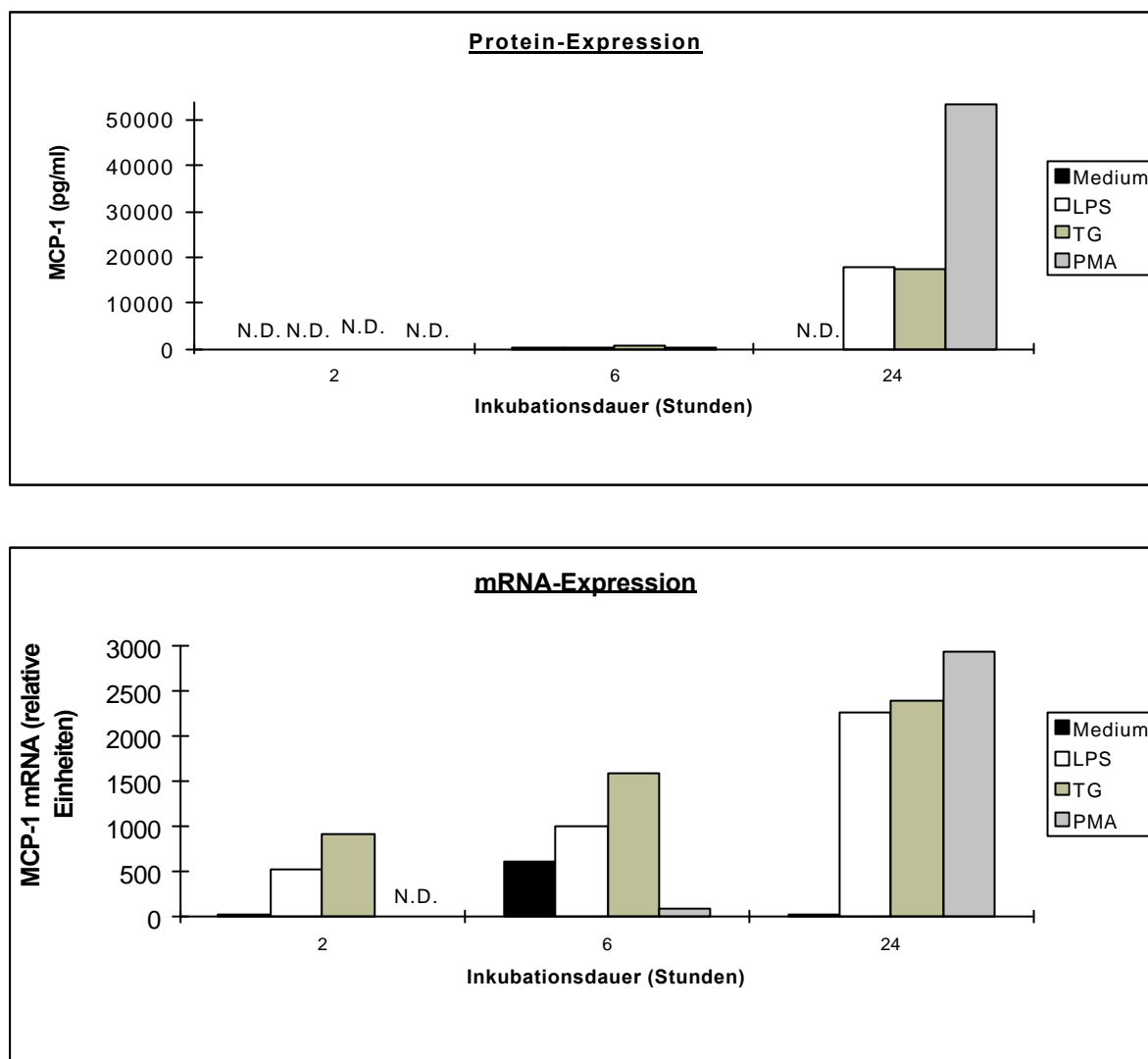


Abb. 17

Vergleich der Zeitverläufe der MCP-1-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene in THP-1-Zellen bei Behandlung mit LPS, Thapsigargin und PMA.

$4 \cdot 10^6$  Zellen/Ansatz wurden in Multischalen zu 6 Kavitäten für die angegebenen Zeitperioden kultiviert. Zelluläre mRNA wurde für RT-PCR-Analysen der mRNA-Expression von MCP-1 verwendet. Die Protein-Expression wurde mittels ELISA von dem entsprechenden Kulturüberstand quantifiziert. Einzelheiten sind im Kapitel Material und Methoden beschrieben. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS ("Medium") kultiviert und konnten wahlweise mit  $10 \mu\text{g/ml}$  LPS,  $2,5 \mu\text{M}$  TG oder  $50 \text{ nM}$  PMA behandelt werden. Die Detektionsgrenze für MCP-1 betrug  $31 \text{ pg/ml}$ .

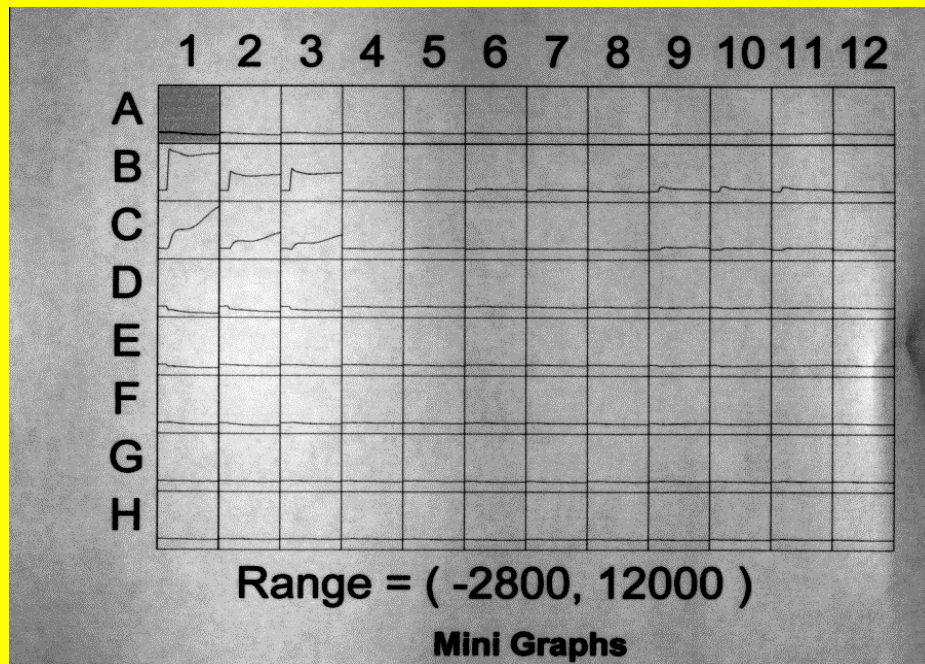
Unter Behandlung mit allen drei Stimuli - LPS, TG und PMA - nimmt die Proteinmenge an MCP-1 von Kulturüberständen kontinuierlich mit der Inkubationsdauer zu, deren Maximum bei 24 Stunden erreicht ist. RT-PCR-Analysen für MCP-1 zeigen eine Aktivierung der mRNA-Expression schon nach 2 Stunden Inkubationsdauer, die bis zum Endzeitpunkt von 24 Stunden anhält. Diese Ergebnisse wurden in Folgeexperimenten bestätigt.



Weiterhin wurde zur Charakterisierung der drei Stimuli der MCP-1-Expression der Einfluß auf die intrazellulären Calciumkonzentrationen von monozytären THP-1-Zellen untersucht. Dazu wurden THP-1-Zellen in Medium kultiviert, das wahlweise 10 µg/ml LPS, 5 µM TG, 10 nM PMA oder als Positivkontrolle 1 µg/ml Calcium-Ionophor A23187 enthielt. Unmittelbar nach Substanzzugabe wurden für 4 min Änderungen der cytoplasmatischen bzw. intrazellulären Calciumkonzentrationen mittels Fluo-4 und einem "Fluorometric Imaging Plate Reader" (FLIPR) detektiert. Im Gegensatz zum Ansatz mit Medium als Negativkontrolle sorgt das Calcium-Ionophor A23187 als Positivkontrolle für einen sekundenschnellen Anstieg des intrazellulären Calciums, der über den Detektionszeitraum von 4 min erhalten bleibt (Abb. 18 Gesamtübersicht und Detailansicht, A1 im Vergleich zu B1). Der Calcium-ATPase-Inhibitor Thapsigargin induziert ebenfalls einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, der Zeitverlauf ist aber verzögerter und zweistufig (Abb. 18, C1) <sup>203</sup>. Dahingegen verursacht die Behandlung mit LPS oder PMA keinen derartigen Anstieg von Calcium innerhalb des gemessenen Zeitraums (Abb. 18, D1 und F1).

Der Vergleich verschiedener bakterieller und nicht-bakterieller Stimuli bei der Bildung des Chemokins MCP-1 durch Makrophagen hat ergeben, daß LPS Gram-negativer Bakterien (*E. coli*) als auch Sansorbin- oder Pansorbin-Präparationen Gram-positiver Staphylokokken MCP-1 induzieren. Der Phorbolster PMA aktiviert nicht nur Endothelzellen, sondern auch die monozytären THP-1-Zellen zur MCP-1-Expression. Ein neuer Weg zur Stimulation der Bildung von MCP-1 besteht in der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration durch die Verwendung des Calcium-Ionophors A23187 und dem Ca<sup>2+</sup>-ATPase-Inhibitor Thapsigargin. Der zeitliche Verlauf der induzierten Protein-Expression von MCP-1 ist für LPS, TG und PMA ähnlich insofern, als nach 2-6 Stunden MCP-1 im Kulturüberstand

Gesamtansicht



Detailansicht

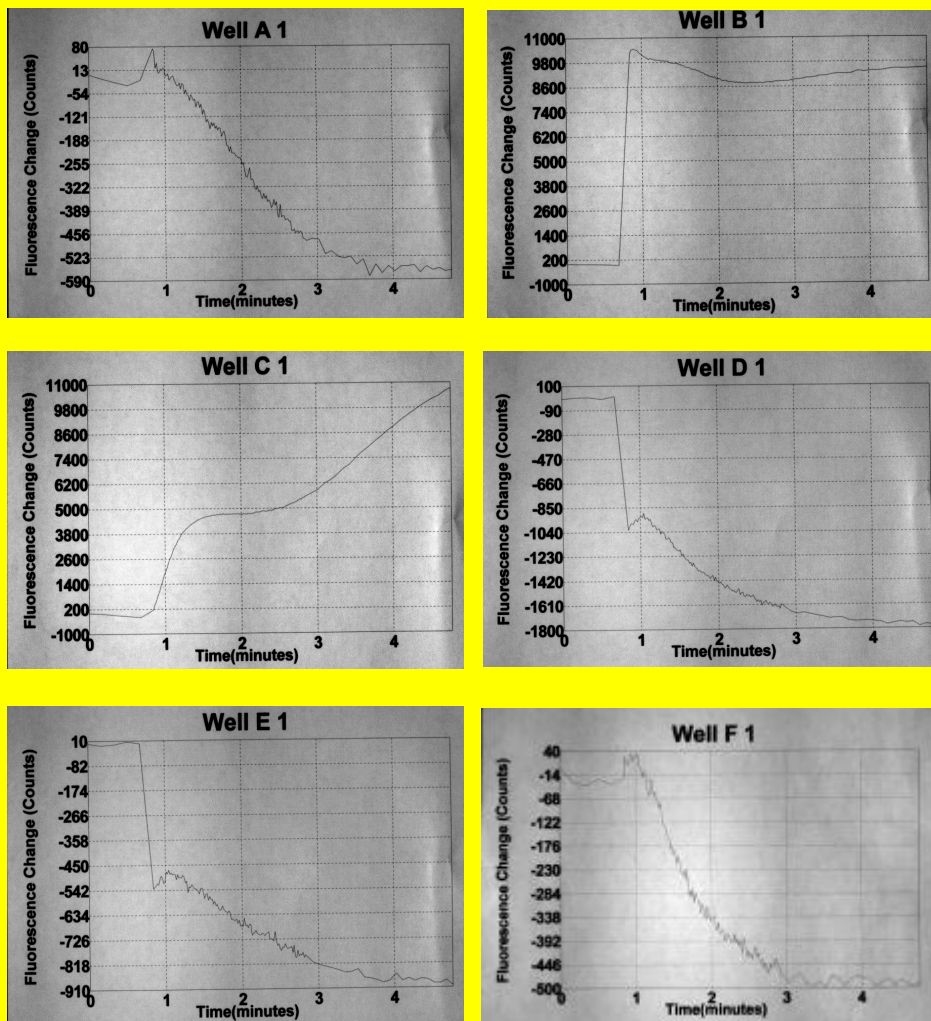


Abb. 18

---

Einfluß von MCP-1 induzierenden Substanzen auf die intrazellulären Calciumkonzentrationen bei THP-1-Zellen.

$5 \cdot 10^4$  Zellen/Kavität wurden alternativ in Medium ohne oder mit 1  $\mu\text{g/ml}$  A23187, 5  $\mu\text{M}$  Thapsigargin (TG), 10  $\mu\text{g/ml}$  LPS, 100nM Okadain Säure (OA) oder 50 nM Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) kultiviert. Unmittelbar nach Substanzzugabe wurden für 4 min Änderungen des cytoplasmatischen bzw. intrazellulären Calciums mittels Fluo-4 AM und einem "Fluorometric Imaging Plate Reader" (FLIPR) detektiert. Die Dreifach-Ansätze waren folgendermaßen aufgeteilt : Medium (A 1-3, Negativkontrolle), A23187 (B 1-3, Positivkontrolle), TG (C 1-3), LPS (D 1-3), OA (E 1-3) und PMA (F 1-3). Gesamtansicht : Der Wert auf der Ordinate ist proportional zur Konzentration des intrazellulären Calciums und wurde zur Negativkontrolle (Kavität A1) normalisiert. Detailansicht einzelner Kavitäten : Die Änderungen der Calciumkonzentration sind für jeden Ansatz separat dargestellt. Die Einzelheiten des Kurvenverlaufs werden durch eine entsprechende Skalierung der Ordinate deutlich. Einzelheiten sind unter Material und Methoden aufgeführt. Die Versuchsergebnisse wurden in weiteren Experimenten bestätigt.

Das Calcium-Ionophor A23187 und der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-Inhibitor Thapsigargin verursachen in THP-1-Zellen einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, der bei TG einen zweistufigen Verlauf hat. Im Gegensatz dazu führen die Stimuli LPS und PMA zu keinem direkten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration.

---

detektiert werden kann und die höchsten Konzentrationen nach 22 bis 24 Stunden erreicht werden. Die Expression von MCP-1-spezifischer mRNA beginnt nach 2 Stunden und hält bis zu 24 Stunden an. Deutliche Unterschiede zwischen den Stimuli LPS, TG und PMA haben intrazelluläre Calcium-Messungen ergeben. Behandlung mit TG resultiert in einem unmittelbaren Anstieg der intrazellulären bzw. cytoplasmatischen Calciumkonzentration, was bei Stimulation mit LPS oder PMA nicht der Fall ist.

## 2.2. Differentielle Wirkungen unterschiedlicher Stimuli auf Kinasen und Phosphatasen

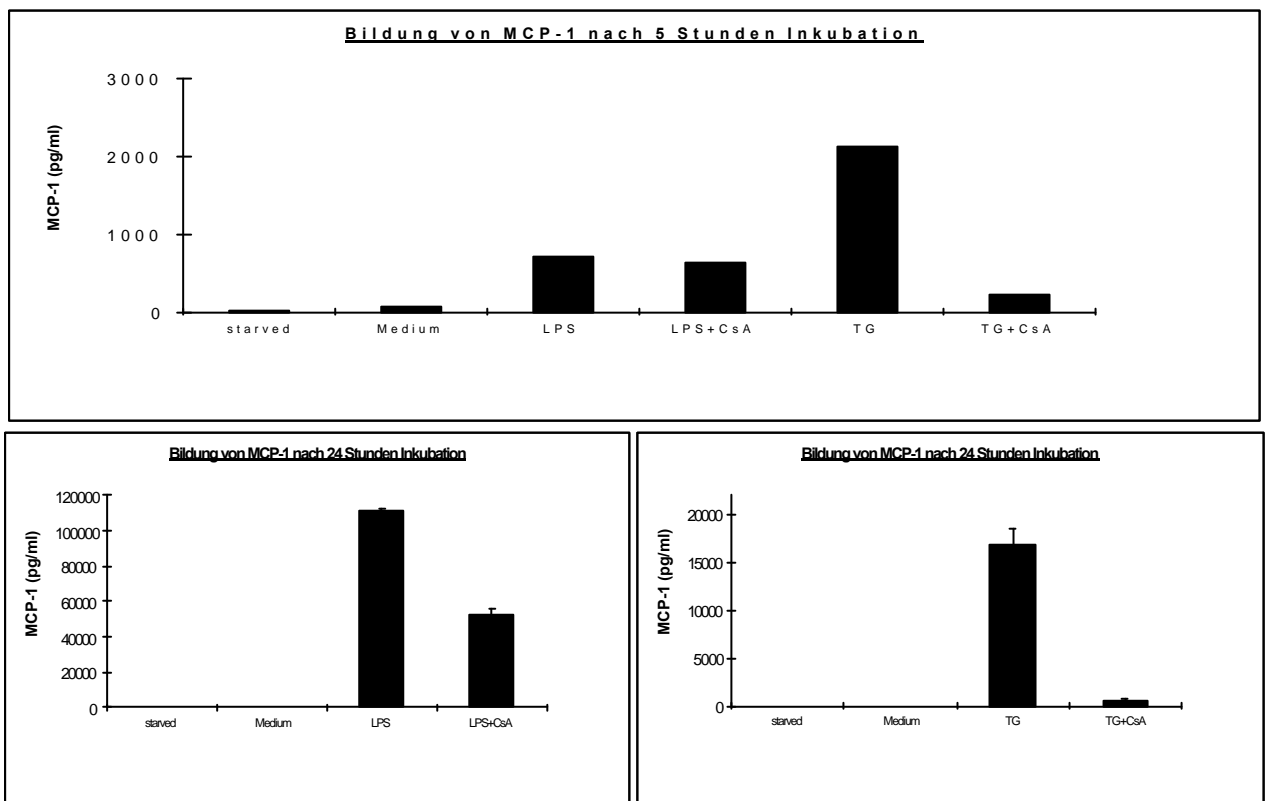
Nachdem verschiedene Stimuli zur Induktion von MCP-1 gefunden worden waren, wurden die einzelnen Stimuli hinsichtlich der beteiligten Signaltransduktionspfade charakterisiert.

### 2.2.1. Stimuluspezifische Rolle von CaN und CaMKs

Die Stimuli PMA, LPS und Thapsigargin aktivieren die MCP-1-Expression, jedoch ist ihr Einfluß auf die intrazelluläre Calciumkonzentration unterschiedlich, wie die bisherigen Experimente gezeigt haben. Eine Stimulation von THP-1-Zellen mit LPS oder PMA führt nicht zu direkten Erhöhungen der intrazellulären Calciumkonzentration, wie Messungen mit dem "Fluorometric Imaging Plate Reader" (FLIPR) ergaben. Andererseits waren das Calcium-Ionophor A23187 und Thapsigargin zur Stimulation von MCP-1 ausreichend, was auf Calcium bei der Aktivierung der MCP-1-Expression hinweist. Die unterschiedliche Bedeutung des intrazellulären Calciums für die jeweilige Stimulation mit LPS, TG oder PMA führte zu der Annahme, daß Calcium-abhängige Kinasen und Phosphatasen in Abhängigkeit zur Art des Stimulus eine unterschiedliche Rolle spielen könnten.

Zur Prüfung dieser Annahme wurden monozytäre THP-1-Zellen in Medium kultiviert, wahlweise mit LPS, PMA oder TG zur MCP-1-Expression aktiviert und der Einfluß pharmakologischer Inhibitoren von Calcium-abhängiger Phosphatase Calcineurin (CaN) und Calcium-abhängigen Calmodulinkinasen (CaMKs) untersucht. Bei Behandlung von THP-1-Zellen mit Thapsigargin kommt es zu einem Anstieg der MCP-1-Mengen im Kulturüberstand, der schon nach 5 Stunden meßbar ist, aber noch unter dem Maximum des Endzeitpunktes von 24 Stunden liegt (s. Abb. 19). So enthielt der Ansatz mit TG nach 5 Stunden 2130 pg/ml MCP-1 im Vergleich zu 73 pg/ml zum Ansatz unbehandelter THP-1-Zellen. Nach 24 Stunden war in den Ansätzen mit TG 16896 pg/ml (+/- 1534) MCP-1 gemessen worden, unbehandelte THP-1-Zellen zeigten kein detektierbares MCP-1 in den Kulturüberständen ( d.h. unter der Detektionsgrenze von 31 pg /ml). Zusätzliche Behandlung der THP-1-Zellen mit Cyclosporin A (CsA) resultierte in einer drastischen Reduktion der MCP-1-Mengen in den Kulturüberständen, die schon nach 5 Stunden detektierbar war. Kulturüberstände von THP-1-

Zellen nach Behandlung mit CsA und TG enthielten nur 229 pg/ml MCP-1 im Vergleich zu dem Kulturüberstand TG-behandelter Zellen, der eine Konzentration von 2130 pg/ml MCP-1 zeigte (s. Abb.19). Nach 24 Stunden betrug die Reduktion der MCP-1-Mengen durch CsA mehr als 90 %. So wiesen Kulturüberstände nach Behandlung mit TG nach 24 Stunden 16896 pg/ml MCP-1 (+/- 1534) auf, Parallelansätze mit zusätzlichem CsA jedoch nur 618 pg/ml MCP-1 (+/- 29) (s. Abb. 19). Die drastische Reduktion der TG-induzierten MCP-1-Expression durch Inaktivierung von Calcineurin mittels CsA deutet auf eine entscheidende Abhängigkeit der TG-induzierten MCP-1-Expression von Calcineurin hin.



**Abb. 19**

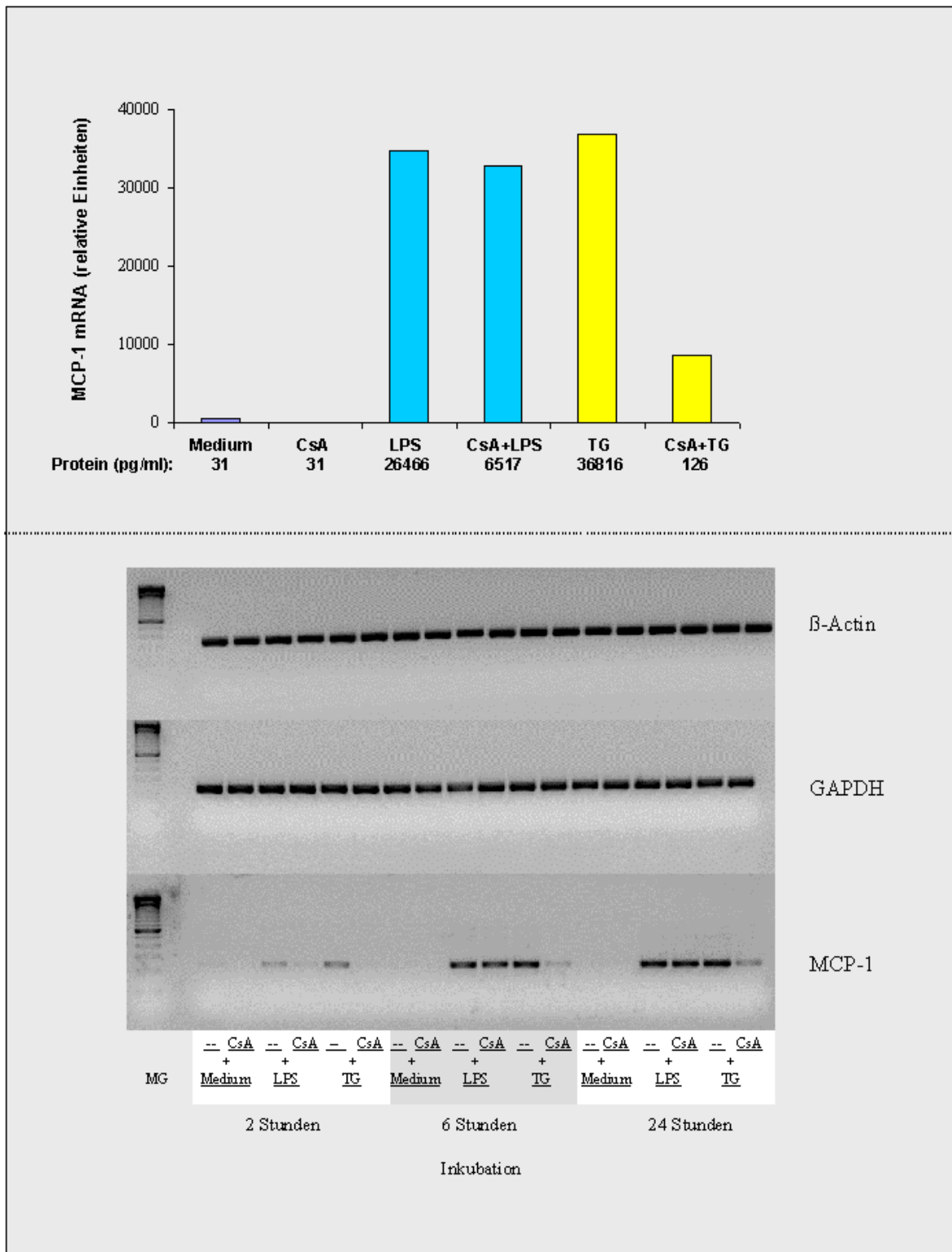
Abhängigkeit der MCP-1-Produktion von der Calcium-abhängigen Phosphatase Calcineurin bei Stimulation mit LPS oder Thapsigargin.

$4 \cdot 10^6$  Zellen/Ansatz wurden in Multischalen zu 6 Kavitäten für die angegebenen Zeitperioden kultiviert. Die Expression von MCP-1 wurde mittels ELISA quantifiziert. Die Zellen wurden am Versuchstag in Medium mit unverbrauchtem 10 % FCS ("Medium") kultiviert oder es wurde das Medium der Vorkultur weiterverwendet ("starved"). Wahlweise konnten die THP-1-Zellen mit TG in einer Endkonzentration von  $2,5 \mu\text{M}$ , mit LPS (10mg/ml) oder dem Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A (CsA) in einer Endkonzentration von  $1 \mu\text{g/ml}$  behandelt werden. Die Detektionsgrenze für MCP-1 betrug 31 pg/ml.

Die Hemmung der Calcium-abhängigen Phosphatase Calcineurin durch CsA reduziert die TG-induzierte Bildung von MCP-1 drastisch, was auf die Notwendigkeit von aktivem Calcineurin für TG-induziertes MCP1 hinweist. Im Vergleich zu TG ist die Reduktion der LPS-induzierten MCP-1-Expression schwächer ausgeprägt, die läßt auf eine allerdings nicht essentielle Beteiligung von Calcineurin hindeutet bei diesem Stimulus schließen.

Inaktivierung von Calcineurin durch CsA führt zur drastischen Reduktion der TG-induzierten MCP-1-Expression, jedoch nicht bei der LPS-induzierten MCP-1-Expression. Behandlung von THP-1-Zellen mit LPS führt nach 5 Stunden zu 704 pg/ml MCP-1 in Kulturüberständen. Parallelansätze mit zusätzlichem CsA zeigen eine Reduktion der MCP-1-Konzentrationen um nur 9 % auf 641 pg/ml MCP-1 (s. Abb. 19). Inkubation von THP-1-Zellen über 24 Stunden resultiert bei Stimulation mit LPS in 111461 pg/ml MCP-1 (+/- 1516) , Parallelansätze mit CsA reduzieren die MCP-1-Expression um 53% auf 52961 pg/ml (+/- 3091) (s. Abb. 19). Die Ergebnisse deuten an, daß Calcineurin zur LPS-induzierten MCP-1-Expression zwar in (geringem) Maße beiträgt, aber eine substantielle MCP-1-Expression unabhängig von Calcineurin ist. Unterschiede zwischen der LPS-induzierter und der TG-induzierter MCP-1-Expression hinsichtlich der Abhängigkeit von Calcineurin zeigte sich auch auf der Ebene der mRNA-Expression. Detektion der mRNA durch RT-PCR-Analysen deuten an, daß bei der TG-aktivierten MCP-1-Expression sich eine Hemmung der Calcium-abhängigen Phosphatase Calcineurin durch Cyclosporin A stärker auswirkt als bei der LPS-induzierten MCP-1-mRNA-Expression (s. Abb. 20).

Die Rolle von Calcineurin für die PMA-induzierte MCP-1-Expression wurde ebenfalls untersucht. Die Kulturüberstände unbehandelter THP-1-Zellen wiesen eine geringe Konzentration von MCP-1 an der unteren Nachweisgrenze auf ( 52 pg/ml [+/- 13]); die Behandlung der Zellen mit 10 nM PMA führte zu 2151 pg/ml MCP-1 (+/- 218). Diese PMA-induzierte MCP-1-Expression wurde durch zusätzliche Behandlung mit dem Calcineurin-Inhibitor CsA um 42 % auf 1258 pg/ml MCP-1 (+/- 615) gesenkt (s. Abb. 21). Die Resultate deuten an, daß aktives Calcineurin zur PMA-induzierten MCP-1-Expression beitragen kann, aber eine substantielle Induktion von MCP-1 durch PMA unabhängig von Calcineurin möglich ist, ähnlich wie im Falle von LPS.



**Abb. 20**

Modulation der mRNA-Expression von MCP-1 bei Inhibition der Calcium-abhängigen Phosphatase Calcineurin nach Stimulation mit LPS oder Thapsigargin.

4\*10<sup>6</sup> Zellen/Ansatz wurden in Multischalen zu 6 Kavitäten für 2, 6 und 24 Stunden kultiviert. Die Auswertung der mRNA-Expression nach 24-stündiger Inkubation ist als Balkendiagramm dargestellt. Die dazugehörige

---

Protein-Expression wurde mittels ELISA im Kulturüberstand quantifiziert und ist unterhalb der Grafik in pg/ml angegeben. Die Expression der mRNA wurde mittels RT-PCR bestimmt, wovon die Gelelektrophorese unterhalb des Balkendiagramms zu sehen ist. "MG" bezeichnet den "100 bp ladder"-Molekulargewichtsmarker von der Fa. Life Technologies. Für die RT-PCR wurde zunächst die zelluläre RNA durch eine Trizol-Präparation gewonnen. Für die Reverse Transcription (RT) wurden 4 µg RNA und das Omniscript-System von Qiagen eingesetzt. Die Amplifikation der MCP-1-cDNA erfolgte in 27 Zyklen. Die Ergebnisse wurden gegen eine PCR-Reaktion für β-Actin normalisiert. Als Kontrolle wurde eine GAPDH-PCR durchgeführt. Die Zellen wurden am Versuchstag in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS ("Medium") kultiviert. Wahlweise wurden die THP-1-Zellen mit dem Calcium-ATPase-Inhibitor Thapsigargin (TG) in einer Endkonzentration von 2,5 µM, mit LPS (10mg/ml) oder dem Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A (CsA) in einer Endkonzentration von 1 µg/ml inkubiert. Die Detektionsgrenze für MCP-1 betrug 31 pg/ml. Einzelheiten sind im Kapitel Material und Methoden beschrieben.

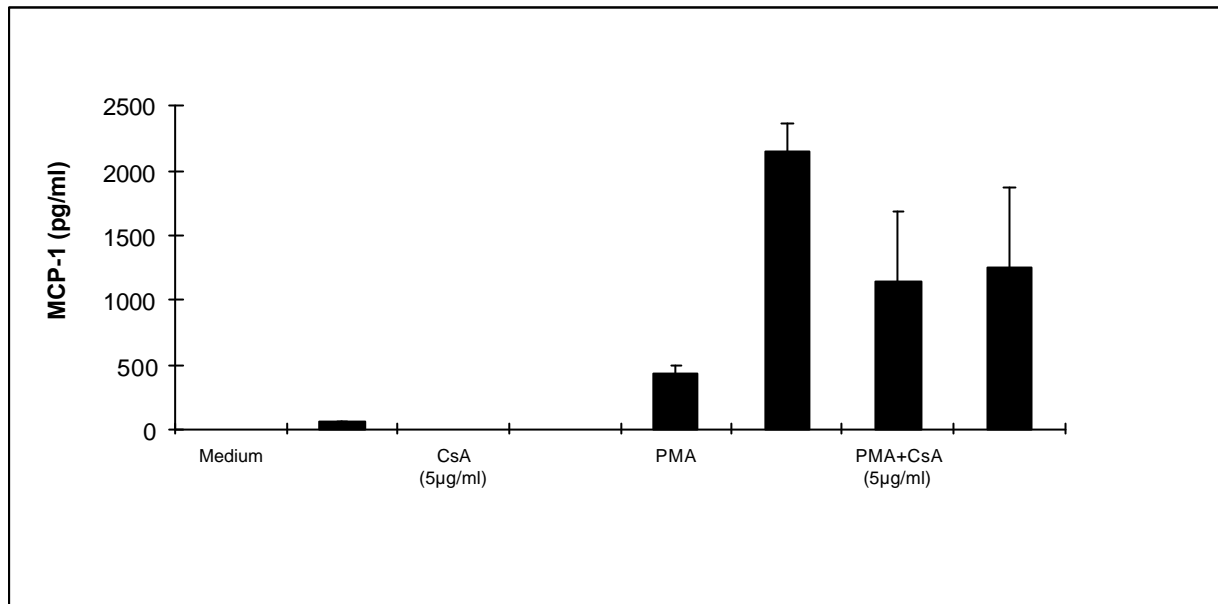
Die Detektion der MCP-1-mRNA durch RT-PCR-Analysen zeigt, daß sich eine Hemmung der Calcium-abhängigen Phosphatase Calcineurin durch Cyclosporin A bei der TG-aktivierten MCP-1-Expression stärker auswirkt als bei der durch LPS induzierten Expression.

---

Zur Bestätigung, daß die beobachteten Modulationen der MCP-1-Expression durch CsA tatsächlich auf eine Inaktivierung von Calcineurin zurückzuführen sind, wurden parallele Experimente mit einem anderen Calcineurin-Inhibitor, FK506, durchgeführt. Beide Substanzen, CsA und FK506, hemmen Calcineurin, jedoch über einen anderen Wirkmechanismus. CsA bindet an das Immunophilin Cyclophilin, um seine inhibitorische Aktivität auf Calcineurin ausüben, FK506 bindet an ein anderes Immunophilin, FKBP12, zur Hemmung von Calcineurin<sup>204</sup>. FK506 führte zu der gleichen Stimulus-spezifischen Reduktion der MCP-1-Expression wie CsA (s. Abb. 22). So führte Behandlung von THP-1-Zellen mit FK506 zu einer drastischen Reduktion der TG-induzierten MCP-1-Expression, wie sie auch bei Behandlung mit CsA beobachtet werden konnte. Die Inkubation von THP-1-Zellen in Medium mit 2,5 nM TG resultierte in 1278 pg/ml MCP-1 (+/- 320) in Kulturüberständen, die zusätzliche Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an FK506 führte zu einer drastischen Reduktion von MCP-1 unter die untere Nachweisgrenze (s. Abb. 22). Die LPS-induzierte und die PMA-induzierte MCP-1-Expression wurde durch FK506 wie bei der Behandlung mit CsA zwar moduliert, aber es konnte wie bei Behandlung mit CsA keine Reduktion der MCP-1-Konzentration um mehr als 90 % beobachtet werden (s. Abb. 22). Die Modulation der MCP-1-Expression durch den Calcineurin-Inhibitor FK506



bestätigen die mit CsA erzielten Ergebnisse. Calcineurin trägt zur PMA-induzierten und zur LPS-induzierten MCP-1-Expression bei, aber nur für die TG-induzierte MCP-1-Expression ist aktives Calcineurin zwingend erforderlich.



#### Abb. 21

Abhängigkeit der PMA-induzierten MCP-1-Expression von Calcineurin.

$3 \times 10^5$  THP-1-Zellen/Ansatz wurden in Mikrotiterplatten für 24 Stunden kultiviert. Die Protein-Expression wurde mittels ELISA im Kulturüberstand quantifiziert. Die Zellen wurden am Versuchstag in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS ("Medium") kultiviert. Wahlweise wurden den Kulturen Phorbol ester (PMA) in einer Endkonzentration von 10 nM, das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid („DMSO“; Kontrolle) und der Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A (CsA) in einer Endkonzentration von 2,5 oder 5 µg/ml zugesetzt. Die Detektionsgrenze für MCP-1 betrug 31 pg/ml. Einzelheiten sind im Kapitel Material und Methoden beschrieben.

Die Quantifizierungen von MCP-1 aus Kulturüberständen zeigen, daß die Aktivierung der MCP-1-Expression durch PMA nicht in dem Maße von Calcineurin abhängt wie dies für die Aktivierung durch TG der Fall ist.

Die bisherigen Experimente haben gezeigt, daß die drei Stimuli LPS, TG und PMA die MCP-1-Expression aktivieren und sich dabei hinsichtlich ihres Einflusses auf die intrazelluläre Calciumkonzentration unterscheiden. Allein die Behandlung von THP-1-Zellen mit TG führt zur unmittelbaren Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Dieser Stimulus-spezifische Einfluß auf die intrazelluläre Calciumkonzentration führte zu der Frage, ob

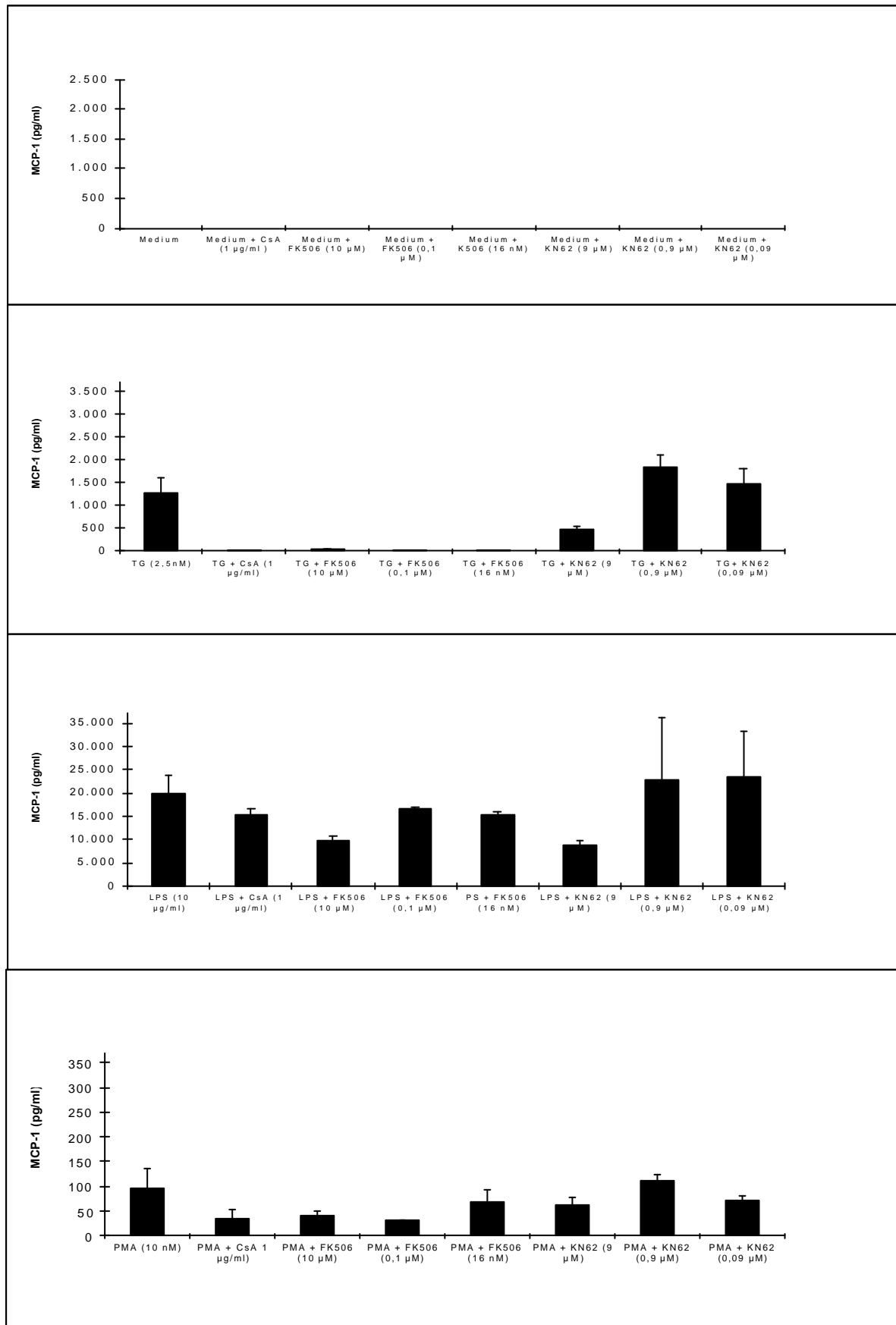


Abb. 22

Bedeutung der CaMKs und Calcineurin für die MCP-1-Expression nach Stimulation durch LPS, TG oder PMA.

$3 \times 10^5$  Zellen/Ansatz wurden in Mikrotiterplatten für 24 Stunden kultiviert. Die Bildung von MCP-1 wurde mittels ELISA in den Kulturüberständen quantifiziert. Die Zellen wurden am Versuchstag in RPMI 1640-

---

Medium mit 10 % FCS ("Medium") kultiviert. Wahlweise wurden die THP-1-Zellen mit Phorbol ester (PMA) in einer suboptimalen Endkonzentration von 10 nM, mit TG in einer suboptimalen Endkonzentration von 2,5 nM oder mit 10 µg/ml LPS stimuliert. Als Calcineurin-Inhibitoren wurden CsA in einer Endkonzentration von 1 µg/ml oder das potentere FK506 eingesetzt. Zur Inaktivierung von Calmodulinkinasen wurde die Substanz KN62 verwendet. Alle Ansätze enthielten das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Detektionsgrenze für MCP-1 betrug 31 pg/ml. Einzelheiten sind im Kapitel Material und Methoden beschrieben.

Eine starke Reduktion der Bildung von MCP-1 bei Behandlung mit dem CaMK-Inhibitor zeigte sich nur in den Kulturüberständen der Stimulation durch TG, nicht bei Stimulation durch LPS oder PMA. Nur die MCP-1-Expression durch TG ist essentiell von Calcineurin abhängig, wie die drastische Reduktion von MCP-1 zur unteren Nachweisgrenze durch die Inhibitoren von Calcineurin zeigt.

---

Calcium-abhängige Phosphatasen und Kinasen in Abhängigkeit vom Stimulus eine unterschiedliche Rolle bei der MCP-1-Expression spielen. In der Tat konnte gezeigt werden, daß Calcineurin nur für die MCP-1-Expression durch TG zwingend erforderlich ist. Diese Befunde ließen vermuten, daß ebenso der Einfluß Calcium-abhängiger Calmodulinkinasen (CaMKs) auf die MCP-1-Expression vom Einfluß des Stimulus auf die intrazelluläre Calciumkonzentration abhängig ist. THP-1-Zellen wurden daher mit den drei Stimuli LPS, TG und PMA behandelt und der Einfluß von KN62, ein pharmakologischer Inhibitor der CaMK, auf die MCP-1-Expression untersucht.

Die stärkste Beteiligung von CaMKs an der MCP-1-Expression wurde für den Stimulus TG gefunden, welcher auch die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöht (s. Abb. 22). Die MCP-1-Konzentration der Kulturüberstände TG-aktivierter THP-1-Zellen von 1278 pg/ml (+/- 320) war bei zusätzlicher Behandlung mit dem CaMK Inhibitor KN62 (9 µM) um 63% auf 477 pg/ml (+/- 78) reduziert. Im Falle von LPS wurde unter dem Einfluß von KN62 eine 56 %-ige Reduktion von 19914 pg/ml (+/- 4008) auf 8751 pg/ml (+/- 1012) beobachtet. Die PMA-induzierte MCP-1-Synthese wurde bei Behandlung mit KN62 von 95 pg/ml (+/- 45) um 35 % auf 62 pg/ml (+/- 15) erniedrigt (s. Abb. 22).

Diese Experimente haben gezeigt, daß die drei Stimuli LPS, PMA und TG sich unterschiedlich auf die intrazelluläre Calciumkonzentration auswirken, die mit einer unterschiedlichen Beteiligung der Calcium-abhängigen Phosphatase Calcineurin und der Calcium-abhängigen Calmodulinkinasen bei der MCP-1-Expression einhergeht. Nur für die Stimulation der MCP-1-Expression durch Thapsigargin (TG), das auch als einziger Stimulus zu unmittelbaren Erhöhungen der intrazellulären Calciumkonzentration führt, ist die aktive Calcium-abhängige Phosphatase Calcineurin zwingend erforderlich. Die Calcium-abhängigen Calmodulinkinasen tragen in geringerem Maße zur MCP-1-Expression bei, jedoch wurde die größte Beteiligung bei TG als Stimulus gemessen.

### 2.2.2. Beteiligung von MAPKs an der Bildung von MCP-1

Die vorherigen Experimente haben insofern zum Verständnis der MCP-1-Expression in monozytären THP-1-Zellen beigetragen, als daß sie eine Bedeutung der Calcium-abhängigen Phosphatase Calcineurin und der Calcium-abhängigen Calmodulinkinasen aufzeigen konnten, die in Abhängigkeit von den Stimuli LPS, TG oder PMA unterschiedlich groß ist. Um weitere Kinasen zu finden, die für die Aktivierung der MCP-1-Expression in monozytären THP-1-Zellen relevant sind, wurden die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) untersucht. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß p38 MAPKs zur IL-1 $\beta$  induzierten Expression von MCP-1 in humanen mesangialen Zellen beitragen können <sup>205</sup> und sogar eine entscheidende Rolle für die TNF- $\alpha$ -induzierte MCP-1-Expression in humanen Endothelzellen spielen <sup>206</sup>. Zur Untersuchung der Beteiligung der MAPKs an der Expression von MCP-1 in humanen monozytären Zellen wurden Zellen der Linie THP-1 mit LPS oder TG stimuliert und der Einfluß pharmakologischer Inhibitoren der MAPKs auf die Konzentration von MCP-1 in den

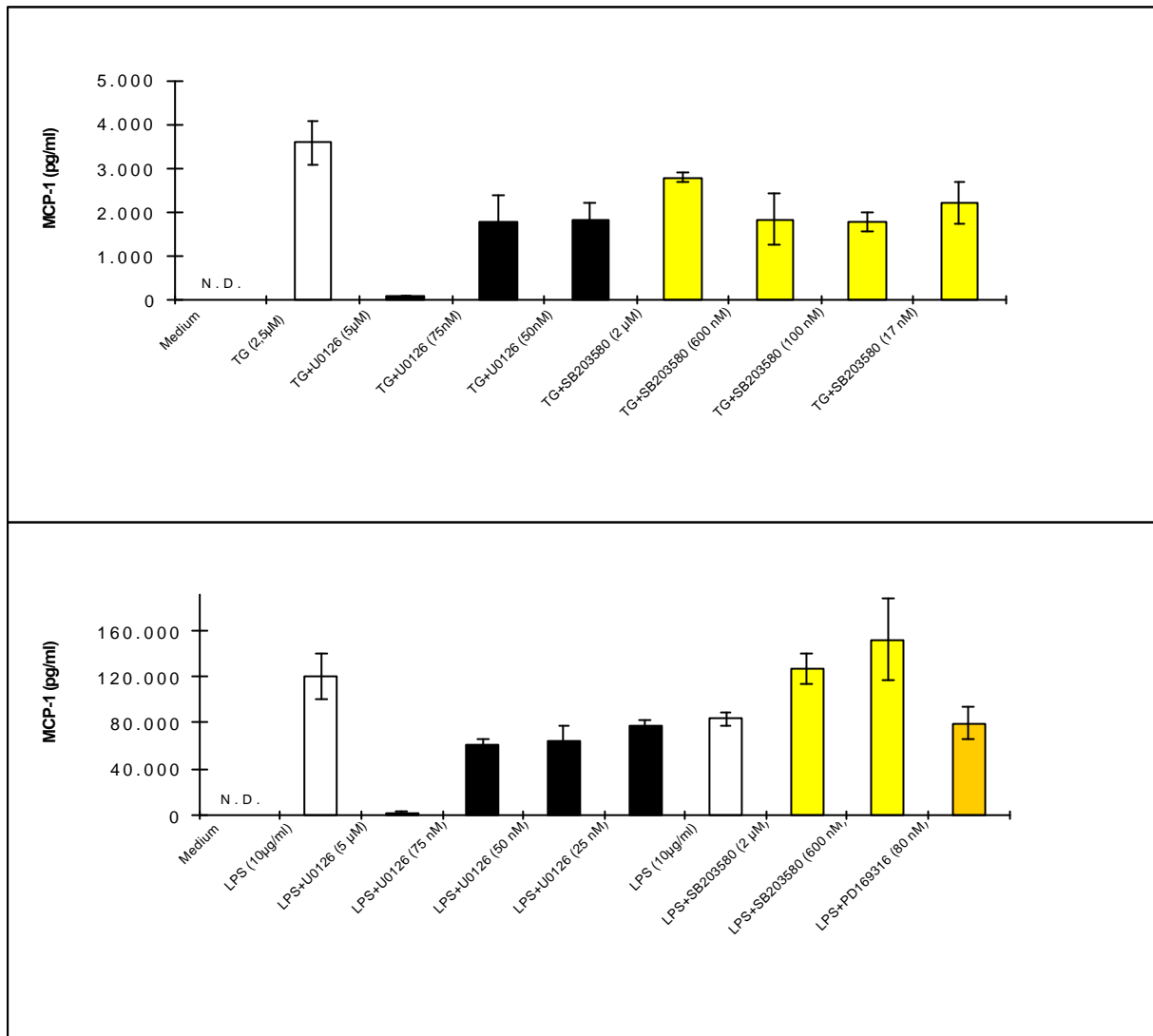
---

Kulturüberständen mittels ELISA untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluß auf die MCP-1-mRNA-Mengen durch RT-PCR-Analysen bestimmt.

Die Behandlung von THP-1-Zellen mit dem MEK-1/MEK-2-Inhibitor U0125 führte zu einer drastischen Reduktion sowohl der LPS-induzierten als auch der TG-induzierten Bildung von MCP-1. So weisen Kulturüberstände nach Stimulation mit 10 µg/ml LPS eine MCP-1-Konzentration von 119677 pg/ml (+/- 19753) auf, die unter dem Einfluß von 5 µM U0126 um mehr als 90% auf 1683 pg/ml (+/- 619) reduziert wird (s. Abb. 23). In ähnlicher Weise ist in Ansätzen mit TG und 5 µM U0126 im Vergleich zu dem Ansatz mit TG allein die MCP-1-Konzentration um 98 % vermindert, von 3591 pg/ml (+/- 489) auf 89 pg/ml (+/- 12). Die starke Abhängigkeit der LPS-induzierten und der TG-induzierten MCP-1-Expression von den Kinasen MEK-1/MEK-2 konnte auch bei Verwendung eines anderen MEK-1/MEK-2 Inhibitors, PD 58059, gemessen werden (s. Abb. 24).

Dieser starke Einfluß einer Blockierung der Aktivierung von ERK-1/ERK-2 durch Inhibitoren von MEK-1/MEK-2 deutet an, daß sowohl für die LPS-induzierte als auch für die TG-induzierte MCP-1-Expression aktive ERK-1 und/ oder ERK-2 MAPK erforderlich sind.

Im Vergleich zu der MAPK-Unterfamilie der ERK s beeinflusst die Inhibition der p38 MAPKs durch die Substanzen SB203580 oder PD169316 die LPS-induzierte und die TG-induzierte MCP-1-Expression nicht im gleichen Ausmaß (s. Abb. 23). ELISAs ergaben für LPS-Ansätze einen Wert von 82955 pg MCP-1 /ml (+/- 5406), der unter dem Einfluß von 2 µM SB203580 sogar auf 127088 pg/ml (+/- 12950) anstieg. Die Stimulation von THP-1-Zellen mit TG

**Abb. 23**

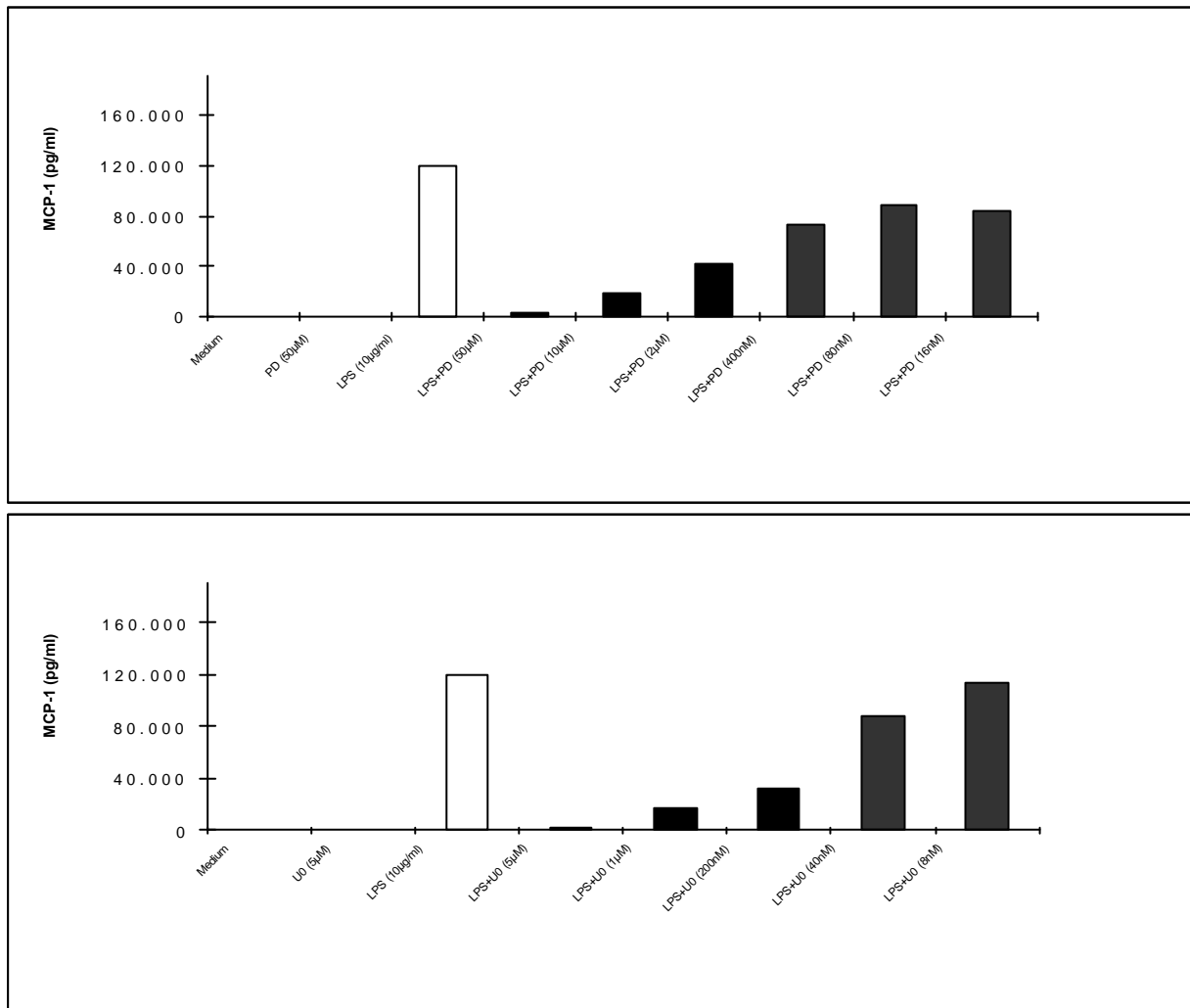
Einfluß von MAPK-Inhibitoren auf die TG- oder LPS-induzierte MCP-1-Expression.

$3 \times 10^5$  Zellen/Ansatz wurden in Mikrotiterplatten zu 96 Kavitäten für 24 Stunden in Kulturmedium inkubiert und wahlweise mit den angegebenen Stimuli und pharmakologischen MAPK-Inhibitoren behandelt. Die Expression von MCP-1 wurde mittels ELISA in den entsprechenden Kulturüberständen quantifiziert. Zur Induktion von MCP-1 wurde entweder Thapsigargin (TG) in einer Endkonzentration von 2,5 µM oder Lipopolysaccharid (LPS) in einer Endkonzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Als p38 MAPK-Inhibitoren wurden die angegebenen Konzentrationen von SB203580 und PD169316 verwendet. Die Modulation der LPS-induzierten MCP-1-Expression durch die Substanzen U0126 und SB203580 bzw. PD169316 wurden auf getrennten Mikrotiterplatten mit einer eigenen Positivkontrolle (LPS) angesetzt. Zur Blockierung einer Aktivierung der MAPK ERK-1 und ERK-2 wurde die Substanz U0126 verwendet, welche die ERK-1 und ERK-2 aktivierenden Kinasen MEK-1 und MEK-2 inhibiert. Die untere Nachweisgrenze für MCP-1 betrug 31 pg/ml. ELISA-Ergebnisse unterhalb dieses Wertes sind mit N.D. ("not detected") gekennzeichnet. Alle Ansätze wurden als Dreifachansätze durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in mehreren Experimenten bestätigt. Einzelheiten sind im Kapitel Material und Methoden beschrieben.

Sowohl die TG- als auch die LPS-induzierte Expression von MCP-1 wird durch den MEK-1/MEK-2-Inhibitor U0126 bei einer Endkonzentration von 5 µM drastisch, d.h. um mehr als 90%, reduziert, was auf eine kritische Abhängigkeit der MCP-1-Expression von aktivem ERK-1 und/oder ERK-2 hinweist. Im Vergleich zu dem MEK-1/MEK-2-Inhibitor U0126 verursachen die p38 MAPKs-Inhibitoren SB203580 und PD169316 nur eine mäßige Modulation der MCP-1-Expression, was auf eine untergeordnete Rolle der p38 MAPKs hindeutet.

fürte zu 3591 pg MCP-1 /ml (+/- 489) in Kulturüberständen und zu einer 23 %-igen Erniedrigung auf 2784 pg/ml (+/- 116) in Gegenwart des Inhibitors.

RT-PCR-Analysen der MCP-1-Expression zeigen, daß die starke Reduktion der Bildung von MCP-1 in Kulturüberständen durch den MEK-1/MEK-2 Inhibitor U0126 mit einer drastischen Verminderung des mRNA-Gehalts korreliert (s. Abb. 25).

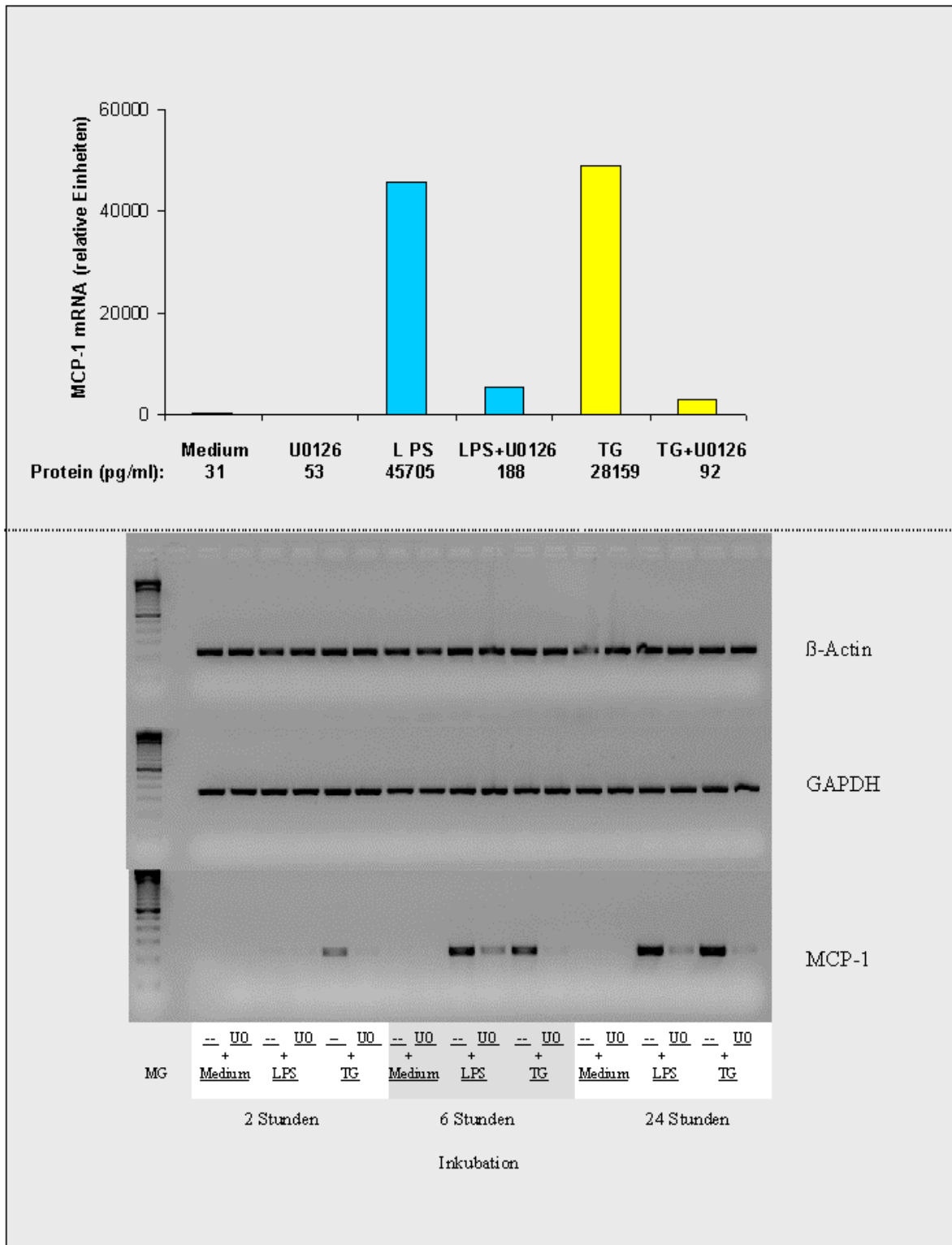


**Abb. 24**

Einfluß von zwei MEK-1/MEK-2-Inhibitoren auf die LPS-induzierte MCP-1-Expression.

Die Konzentration von MCP-1 in Kulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt.  $2 \cdot 10^5$  THP-1-Zellen/Ansatz wurden in Mikrotiterplatten zu 96 Kavitäten für 24 Stunden in Kulturmedium (Medium) mit LPS als Stimulus und den pharmakologischen MEK-1/MEK-2-Inhibitoren U0126 (U0) oder PD 98059 (PD) in den angegebenen Endkonzentrationen inkubiert. Die untere Nachweisgrenze für MCP-1 betrug 31 pg/ml. Einzelheiten sind im Kapitel Material und Methoden beschrieben.

Der MEK-1/MEK-2 Inhibitor PD 98059 bestätigt die Ergebnisse des Inhibitors U0126, wonach die LPS-induzierte MCP-1-Expression entscheidend von aktiven MEK-1 und/oder MEK-2 Kinasen abhängt.



**Abb. 25**

Einfluß eines MEK-1/MEK-2 Inhibitors auf die mRNA-Expression von MCP-1.



---

Dargestellt sind die Gelektrophoresen von RT-PCR-Analysen für  $\beta$ -Actin, GAPDH und MCP-1 unterschiedlich behandelter THP-1-Zellen. Das Histogramm repräsentiert die densitometrische Auswertung der MCP-1 RT-PCR nach 24-stündiger Inkubation. Die dazugehörige Protein-Expression wurde mittels ELISA von dem entsprechenden Kulturüberstand quantifiziert und ist unterhalb der Grafik in pg/ml angegeben.  $4 \cdot 10^6$  Zellen/Ansatz wurden in Multischalen zu 6 Kavitäten für 2, 6 und 24 Stunden mit unterschiedlicher Behandlung kultiviert. Zur Induktion von MCP-1 wurden die Zellen mit 10  $\mu$ g/ml LPS (LPS) oder 2,5  $\mu$ M Thapsigargin (TG) stimuliert, alternativ wurden unstimulierte Zellen allein in Kulturmedium angesetzt (Medium). Als MEK-1/MEK-2 Inhibitor wurde die Substanz U0126 in einer Endkonzentration von 5  $\mu$ M eingesetzt (U0). Für die RT-PCR wurde zunächst die zelluläre RNA durch eine Trizol Präparation gewonnen. Für die Reverse Transkription (RT) wurden 4  $\mu$ g RNA und das Omniscript-System von Qiagen eingesetzt. Zur Detektion der MCP-1-cDNA wurden 27 Zyklen für die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Ergebnisse wurden gegen eine PCR-Reaktion für  $\beta$ -Actin normalisiert. Als weitere Kontrolle wurde eine GAPDH-PCR durchgeführt. Die untere Nachweisgrenze des ELISAs für MCP-1 betrug 31 pg/ml. "MG" bezeichnet den "100 bp ladder"-Molekulargewichtsmarker von der Fa. Life Technologies. Einzelheiten sind im Kapitel Material und Methoden beschrieben. Die Ergebnisse konnten in zwei weiteren Experimenten bestätigt werden.

Die starke Reduktion der Proteinmengen an MCP-1 in Kulturüberständen durch den MEK-1/MEK-2 Inhibitor korreliert mit einer drastischen Verminderung des mRNA-Gehalts in RT-PCR-Analysen.

---

Bei der Untersuchung der Bedeutung von MAPK für die LPS- und TG-induzierte MCP-1-Expression zeigten Versuche mit selektiven Inhibitoren, daß die MCP-1-Expression nahezu absolut von aktiver MEK-1/MEK-2 Kinase abhängt. Dies weist auf eine kritische Rolle der ERK-1/ERK-2-Subfamilie der MAPKs für die Bildung von MCP-1 hin. Im Gegensatz zu den MEK-1/MEK-2 Kinasen beeinflußt die Hemmung der p38 Subfamilie der MAPKs die MCP-1-Expression nur geringfügig, was auf eine untergeordnete Rolle der p38-Subfamilie der MAPKs bei der LPS- oder TG-induzierten MCP-1-Expression hindeutet.

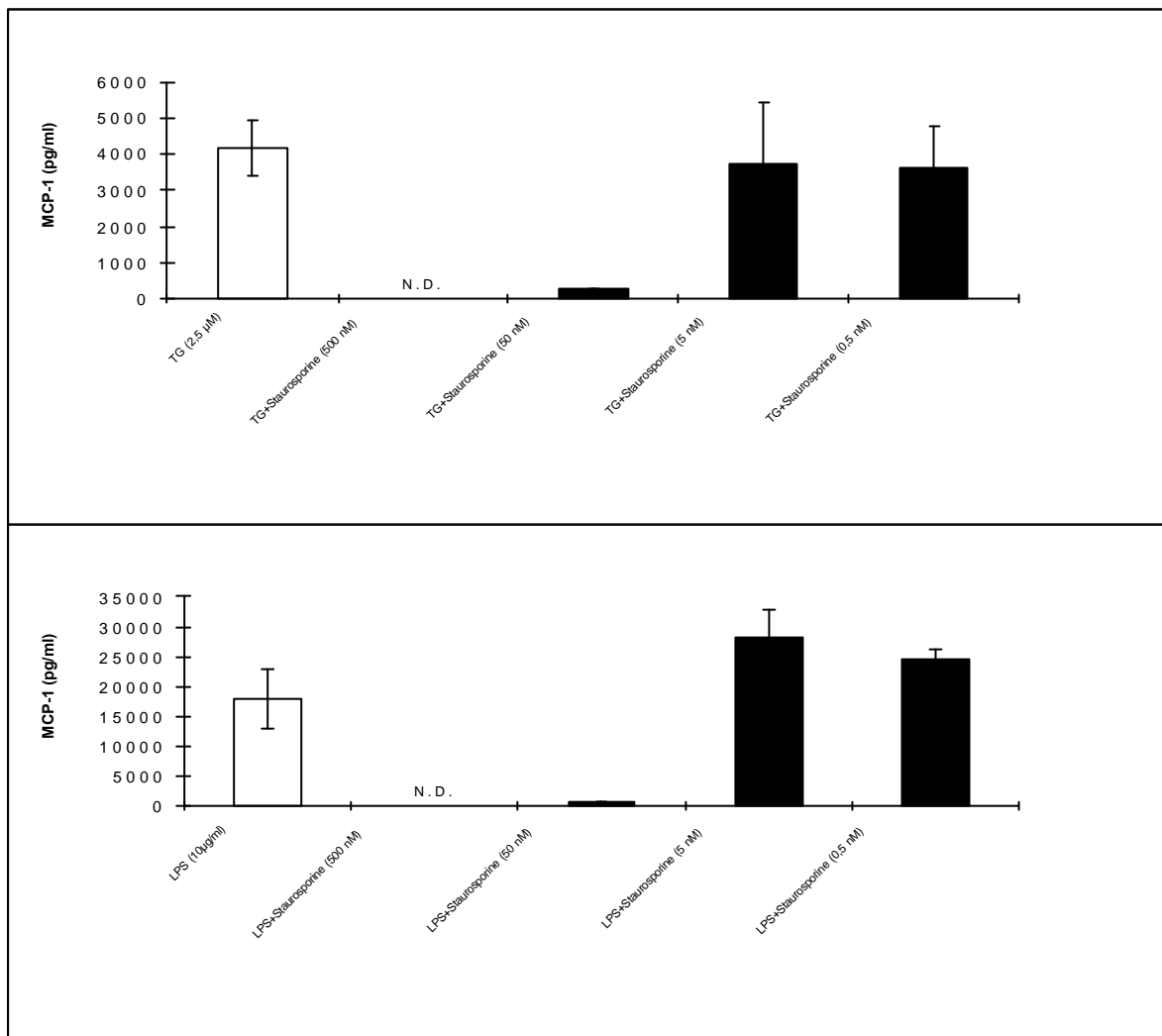
Der Einfluß von Inhibitoren für die JNK-Subfamilie der MAPKs auf die MCP-1-Expression konnte nicht untersucht werden, da keine etablierten pharmakologischen Inhibitoren verfügbar waren.

### 2.2.3. Inhibition der MCP-1-Expression durch Staurosporin und Rolle der PKA

Die bisher durchgeführten Experimente haben ergeben, daß Calcineurin, Calmodulinkinasen (CaMKs) und MAPKs an der durch LPS- oder TG-induzierten MCP-1-Expression beteiligt sind. Um weitere beteiligte Kinasen zu finden, wurde aufgrund fehlender konkreter Literaturhinweise zunächst ein pharmakologischer Inhibitor eingesetzt, der verschiedene Klassen von Proteinkinasen inaktiviert. Anschließend sollte die Bedeutung der für die MCP-1-Expression in Frage kommenden Kinasen mit selektiven Inhibitoren näher untersucht werden.

Um einen ersten Hinweis auf die Bedeutung verschiedene Kinasen bei der LPS- und TG-induzierten MCP-1-Expression zu erhalten, wurde Staurosporin in Stimulationsexperimenten von THP-1-Zellen verwendet. Staurosporin ist ein zellpermeabler Inhibitor für ein breites Spektrum an Proteinkinasen, wie der Proteinkinasen C (PKC), PKA, PKG, CaMK und der Myosin-Leichte-Kette-Kinase (MLCK, „Myosin Light Chain Kinase“)<sup>111</sup>. THP-1-Zellen wurden alternativ mit LPS oder TG in Mikrotiterplatten zur Induktion von MCP-1 stimuliert und mit unterschiedlichen Konzentrationen an Staurosporin behandelt. Nach 24 Stunden wurde die Konzentration an MCP-1 mittels ELISA in den Kulturüberständen ermittelt. Die Messungen ergaben, daß sowohl die TG-induzierte als auch die LPS-induzierte MCP-1-Expression unter dem Einfluß von Staurosporin stark inhibiert wird (s. Abb 26). So ist die Konzentration von MCP-1 in Kulturüberständen bei Stimulation mit 2,5 µM TG von 4174 pg/ml (+/- 741) unter dem Einfluß von 50 nM Staurosporin um 93% auf 272 pg/ml (+/- 41) reduziert. In ähnlicher Weise ist die Konzentration von MCP-1 in Kulturüberständen bei Stimulation mit 10 µg/ml LPS von 18016 pg/ml (+/- 5045) unter dem Einfluß von 50 nM Staurosporin um 96% auf 810 pg/ml (+/- 50) verringert worden. Diese starke Inhibition der

MCP-1-Expression durch den Proteinkinase Inhibitor Staurosporin weist darauf hin, daß eine Beteiligung der oben genannten Proteinkinasen in Frage kommt.



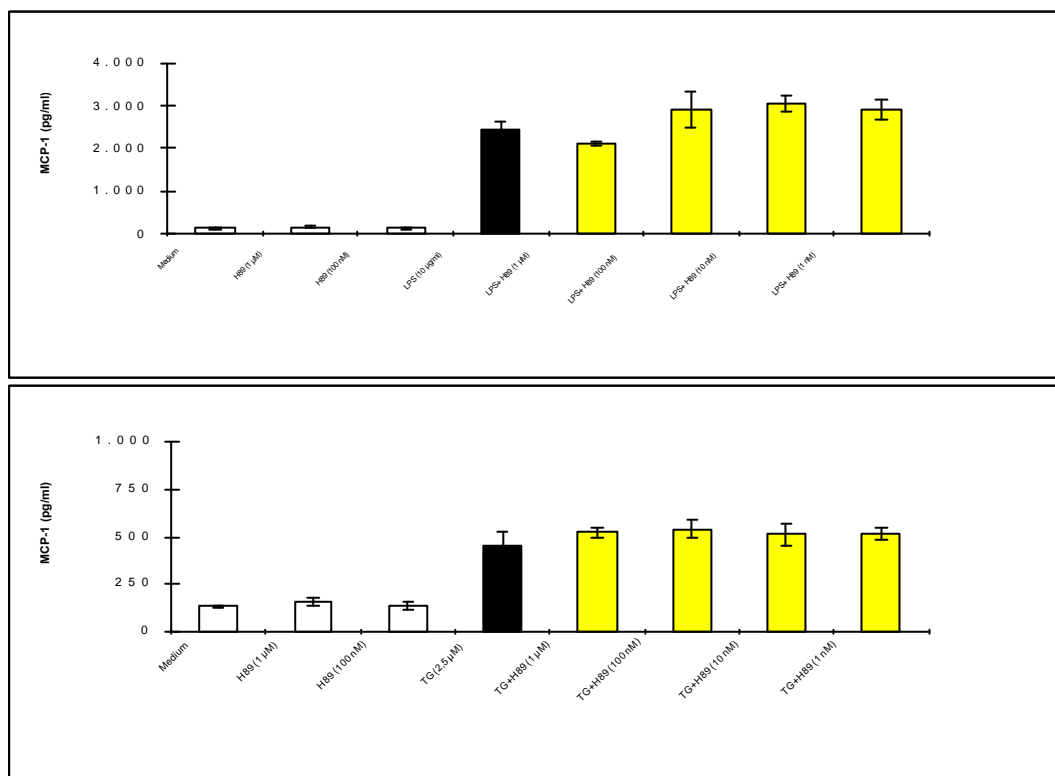
**Abb. 26**

Modulation der induzierten MCP-1-Expression durch Staurosporin.

Die Induktion und Modulation der MCP-1-Expression durch Stimulation von  $3,75 \cdot 10^5$  THP-1-Zellen/Ansatz mit LPS oder TG als Stimulus und Staurosporin als pharmakologischem Modulator wurden mittels nach 24 Stunden Inkubationsdauer bestimmt. Die Endkonzentrationen der Substanzen sind in der Grafik angegeben. Die ELISA-Ergebnisse unterhalb dieses Wertes sind mit N.D. ("not detected") gekennzeichnet. Die Resultate konnten in weiteren Experimenten bestätigt werden.

Der Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin mit Selektivität für die Kinasen PKC, PKA, PKG, CaMK und MLCK hebt die LPS- und TG-induzierte MCP-1-Expression nahezu auf, was daraufhin deutet, daß eine Beteiligung dieser Kinasen bei der induzierten MCP-1-Expression in Frage kommt.

Im weiteren Verlauf wurde zunächst untersucht, ob für diesen Effekt die Proteinkinase A (PKA) mitverantwortlich ist. Dazu wurden THP-1-Zellen mit LPS oder TG zur MCP-1-Expression stimuliert und der Einfluß des pharmakologischen PKA-Inhibitors H89<sup>207</sup> auf die MCP-1-Konzentration im Kulturüberstand untersucht. Die Experimente zeigen, daß eine Inhibition der cAMP-abhängigen Kinase PKA mit H89 nur einen geringen Einfluß auf die LPS- oder TG-induzierte MCP-1-Expression hat (s. Abb. 27). So wird die LPS-induzierte MCP-1-Konzentration in Kulturüberständen von 2427 pg/ml (+/- 228) unter dem Einfluß von 1 µM H89 um 13 % auf 2106 pg/ml (+/- 48) vermindert. Ähnliche gering ist die Wirkung auf die TG-induzierte MCP-1-Expression (s. Abb. 27).



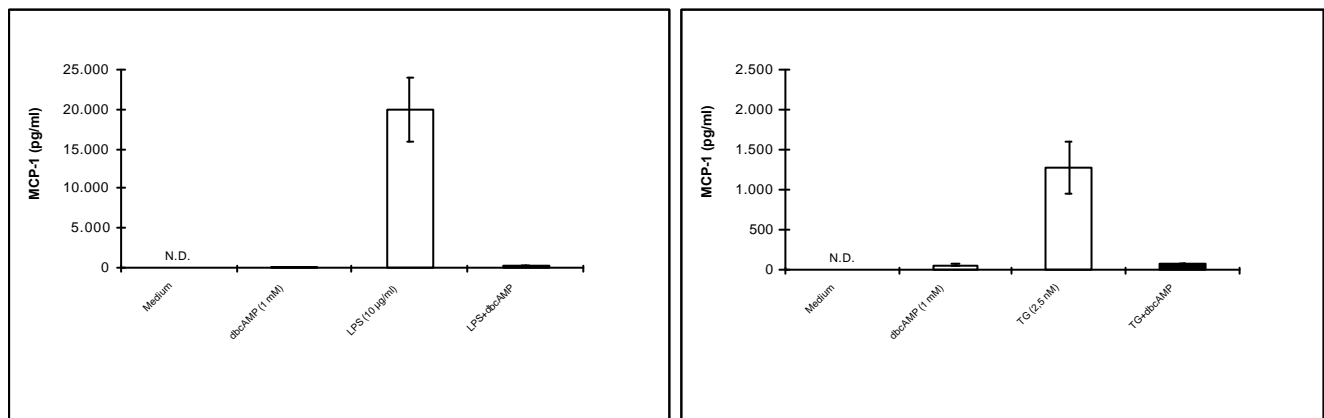
**Abb. 27**

#### Einfluß eines PKA Inhibitors auf die MCP-1-Expression

Die Induktion und Modulation der MCP-1-Expression durch die Stimulation von  $3 \cdot 10^5$  THP-1-Zellen/Ansatz mit LPS oder TG als Stimulus und H89 als pharmakologischem PKA-Inhibitor wurden mittels ELISA nach 24 Stunden Inkubationsdauer bestimmt. Die Endkonzentrationen der Substanzen sind in der Grafik angegeben. Es wurden Dreifach-Ansätze durchgeführt.

Inaktivierung der cAMP-abhängigen Kinase PKA durch den selektiven Inhibitor H89 hat keinen großen Einfluß auf die LPS- oder TG-induzierte MCP-1-Expression, was gegen eine Beteiligung der PKA unter diesen Stimulationsbedingungen spricht.

Aufgrund dieser Befunde wurde geprüft, ob eine Erhöhung der PKA-Aktivität durch exogenes cAMP zu einer Verstärkung der MCP-1 Bildung führt. Zur Aktivierung der cAMP-abhängigen PKA<sup>208</sup> wurden daher THP-1-Zellen mit dem zellpermeablen Dibutyryl-cAMP (dbcAMP) behandelt und der Einfluß auf die LPS- und TG-induzierte MCP-1-Expression mittels ELISA bestimmt. Es zeigte sich, daß die Behandlung von THP-1-Zellen mit 1 mM dbcAMP zu einer signifikanten Verminderung der LPS- bzw. TG-induzierten MCP-1-Bildung um mehr als 90 % führt (s. Abb. 28). Die Kulturüberstände mit dbcAMP und LPS enthielten nach 24 Stunden Inkubation 260 pg/ml MCP-1 (+/- 28) im Vergleich zu 19914 pg/ml MCP-1 (+/- 4008) der Parallelansätze nach Stimulation mit LPS allein. Bei Stimulation mit 2,5 nM TG ist die MCP-1-Konzentration von 1278 pg/ml (+/- 320) unter dem Einfluß von dbcAMP um 93 % auf 73 pg/ml (+/- 3) gesenkt worden (s. Abb. 28).



**Abb. 28**

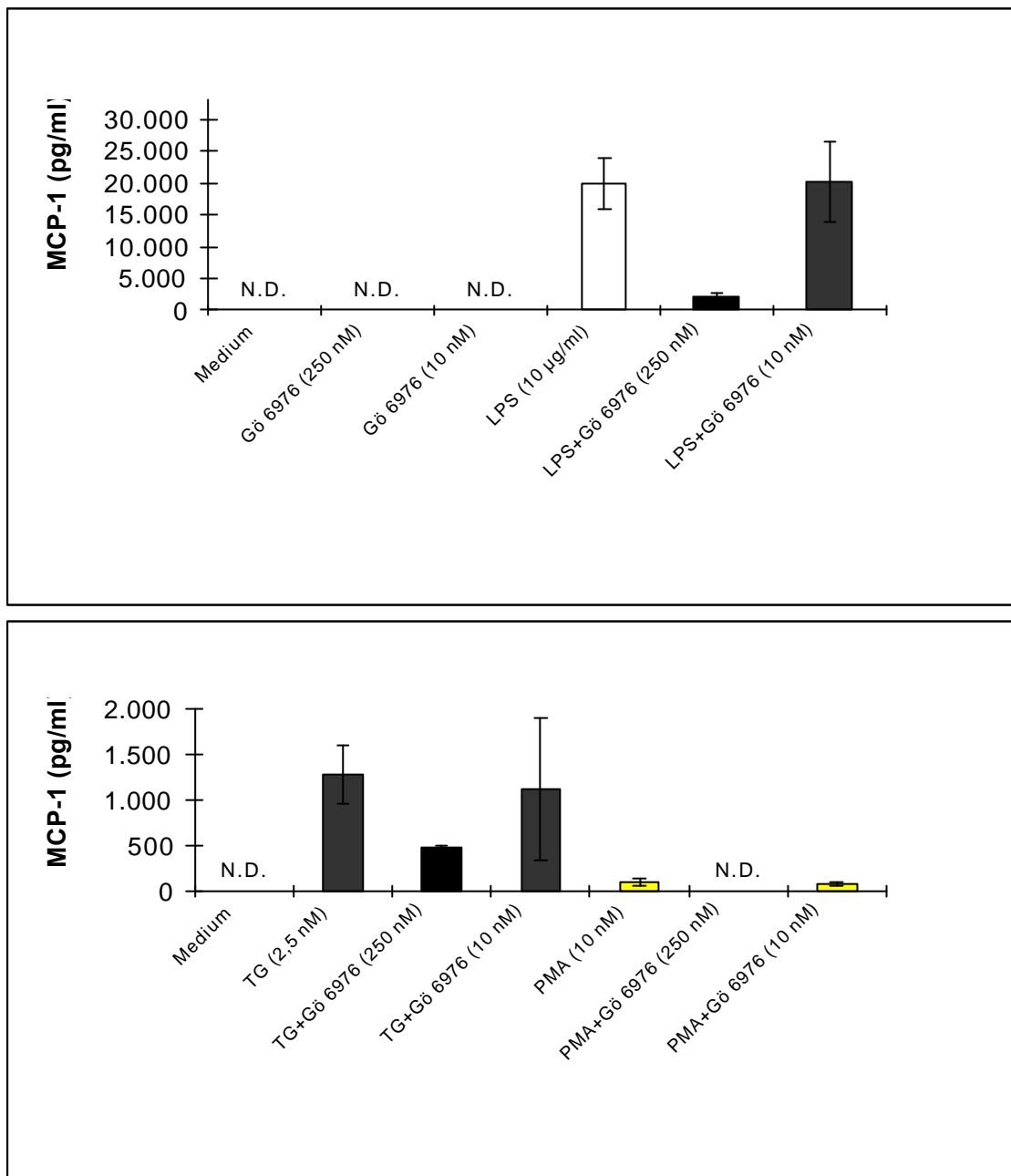
#### Modulation der LPS- und TG-induzierten MCP-1 Expression durch exogenes cAMP

$3 \cdot 10^5$  THP-1-Zellen/Ansatz wurden alternativ mit LPS oder TG zur MCP-1 Expression für 24 Stunden in Mikrotiterplatten stimuliert und wahlweise zusätzlich mit exogenem Dibutyryl-cAMP (dbcAMP) als Immunmodulator behandelt. Die Konzentration an MCP-1 wurde mittels ELISA gemessen. Die Endkonzentrationen der Substanzen sind in der Grafik angegeben. Die ELISA-Ergebnisse unterhalb dieses Wertes sind mit N.D. ("not detected") gekennzeichnet.

Die Behandlung von THP-1-Zellen mit exogenem cAMP führt zu einer starken Inhibition sowohl der LPS- als auch der TG-induzierten MCP-1 Expression.

#### 2.2.4. Beitrag von cPKCs an der Bildung von MCP-1

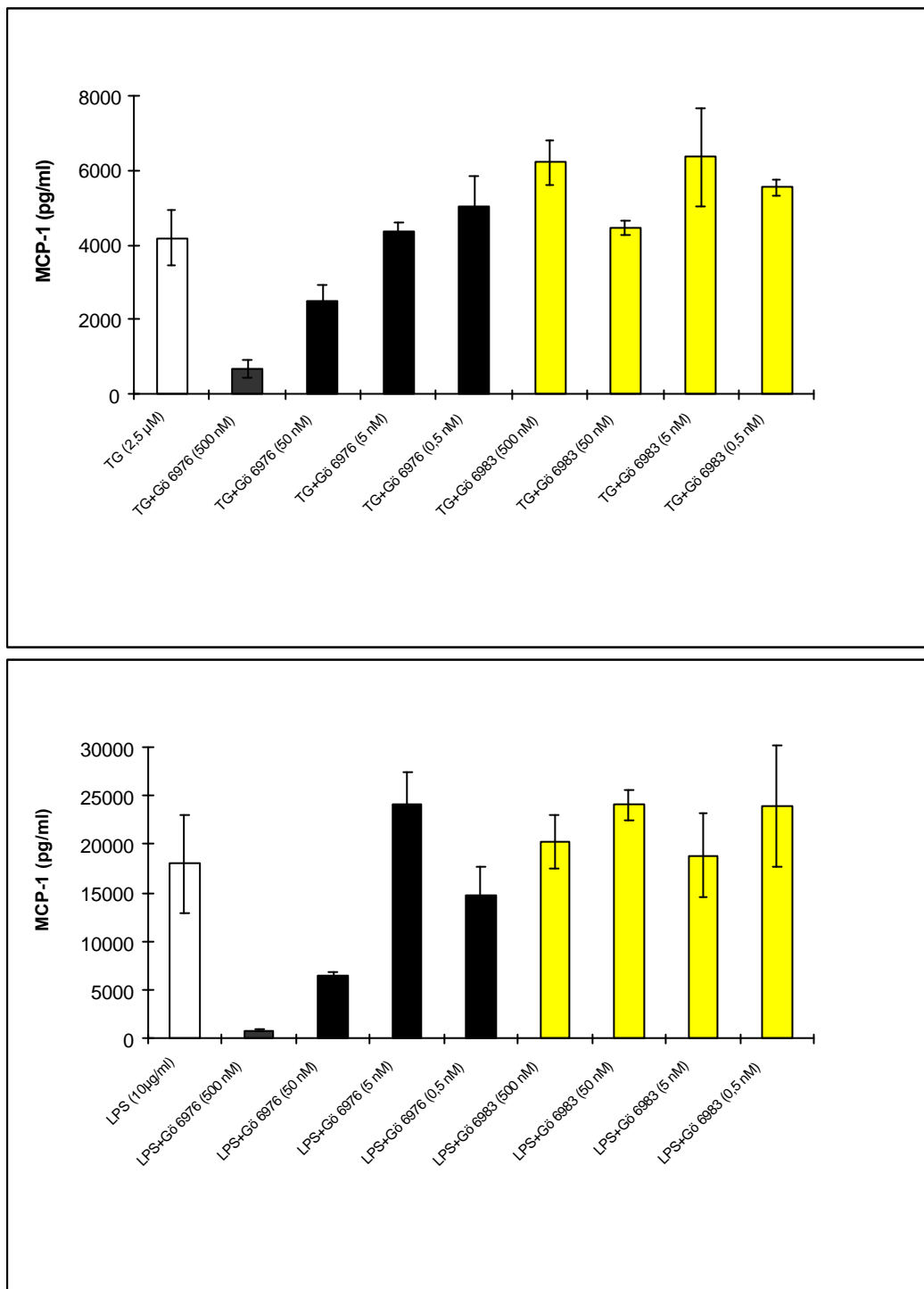
Die starke Inhibition der MCP-1-Expression durch Staurosporin war ein Hinweis darauf, daß die Proteinkinasen PKC, PKA, PKG, CaMK und MLCK an der LPS- und TG-induzierten MCP-1-Expression beteiligt sein könnten. Die geringen Effekte des PKA Inhibitors H89 sprechen gegen eine bedeutende Rolle der PKA bei der LPS- und TG-induzierten MCP-1-Expression. Als nächstes wurde die Beteiligung der in Frage kommenden PKCs an der LPS- und TG-induzierten MCP-1-Expression untersucht. Dazu wurden THP-1-Zellen alternativ mit LPS oder TG zur Expression von MCP-1 aktiviert und der Einfluß einer Behandlung mit verschiedenen PKC-Inhibitoren auf die MCP-1-Konzentration der Kulturüberstände mittels ELISA gemessen. Die Behandlung von THP-1-Zellen mit dem Inhibitor Gö 6976, der eine Selektivität für PKC $\mu$  sowie die calciumabhängigen PKC-Mitglieder PKC $\alpha$ , PKC $\beta$  dieser Familie besitzt<sup>109;110</sup>, führte zu einer deutlichen Reduktion sowohl der LPS- als auch der TG-induzierten MCP-1-Expression (s. Abb. 29 & Abb. 30). Im Vergleich dazu beeinflusste der PKC-Inhibitor Gö 6983, der eine höhere Selektivität für die calciumunabhängigen Isozyme PKC $\gamma$ , PKC $\delta$  und PKC $\zeta$  besitzt, die MCP-1-Expression nur wenig (s. Abb. 30).

**Abb. 29**

Einfluß eines Inhibitors für die calciumabhängigen PKC-Isozyme auf die MCP-1-Expression.

$3 \cdot 10^5$  THP-1-Zellen/Ansatz wurden mit LPS, TG oder PMA zur Expression von MCP-1 aktiviert. Zusätzlich wurde in Parallelansätzen der Kinase-Inhibitor Gö6976 verwendet, der eine Selektivität für die calciumabhängigen Isozyme PKC $\alpha$  und PKC $\beta$  sowie des Calcium-unabhängigen Isozyms PKC $\mu$  besitzt. Nach einer Inkubation über 24 Stunden wurde die MCP-1-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Die Endkonzentrationen der Substanzen sind in der Grafik angegeben. Es wurden Die ELISA-Ergebnisse unterhalb dieses Wertes sind mit N.D. ("not detected") gekennzeichnet Die Resultate konnten in einem weiteren Experiment bestätigt werden.

Die Behandlung mit dem PKC-Inhibitor Gö 6976 reduzierte die MCP-1-Expression, was auf eine Beteiligung der Isozyme PKC $\alpha$ , PKC $\beta$  und PKC $\mu$  bei der MCP-1-Expression hindeutet.

**Abb. 30**

Modulation der induzierten MCP-1-Expression durch PKC-Inhibitoren verschiedener Selektivität.

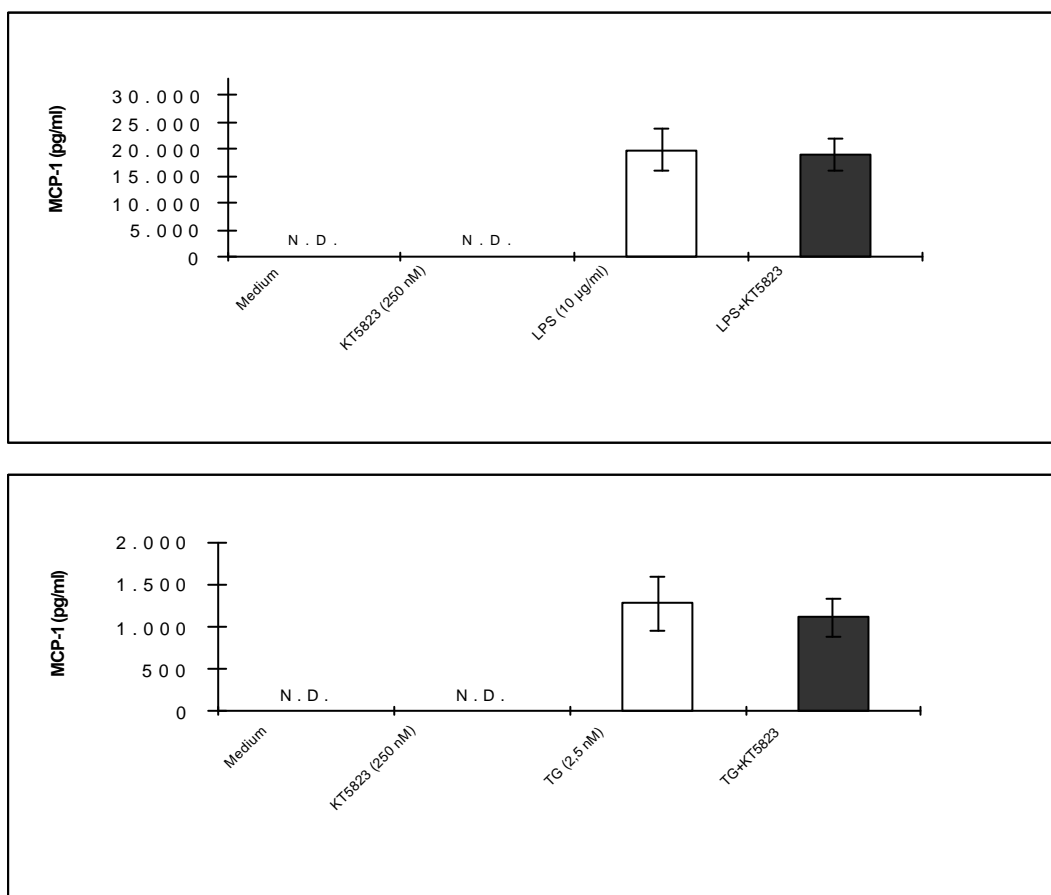
Zur Induktion von MCP-1 in THP-1-Zellen wurde LPS oder TG verwendet, als PKC-Inhibitoren wurden die Substanzen Gö 6976 und Gö 6983 in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Gö 6976 besitzt eine Selektivität für die Isozyme PKC $\alpha$ , $\beta$  und  $\mu$ , die Substanz Gö6983 besitzt eine hohe Selektivität für die Familienmitglieder PKC $\gamma$ , $\delta$  und  $\zeta$ . Nach 24-stündiger Inkubation von  $3 \cdot 10^5$  THP-1-Zellen/Ansatz wurde mittels ELISA die Konzentration von MCP-1 in dem jeweiligen Kulturüberstand bestimmt. ELISA-Ergebnisse unterhalb dieses Wertes sind mit N.D. ("not detected") gekennzeichnet.

Der PKC-Inhibitor Gö 6976, den eine Selektivität für die Isozyme PKC $\alpha$ , $\beta$  und  $\mu$  auszeichnet, hemmt dosisabhängig die MCP-1-Expression, im Gegensatz zu Gö6983, einem Inhibitor der Familienmitglieder PKC $\gamma$ , $\delta$  und  $\zeta$ .



### 2.2.5. Geringe Bedeutung der PKG bei der Induktion von MCP-1

Nachdem die Beteiligung der Proteinkinasen PKA und PKC untersucht worden war, sollte anschließend die Rolle der PKG beleuchtet werden. Dazu wurde die MCP-1-Expression durch Stimulation mit LPS oder TG induziert und der Einfluß einer Behandlung mit dem PKG-Inhibitor KT5823 auf die MCP-1-Konzentration in Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Die Behandlung mit dem PKG-Inhibitor hatte keinen deutlichen Einfluß auf die LPS-induzierte MCP-1-Expression, wie die schwache Hemmung von 5% zeigte. Auch die TG-induzierte MCP-1-Expression wurde nur um 13% gesenkt (s. Abb. 31).



**Abb. 31**

Modulation der MCP-1-Expression durch den PKG-Inhibitor KT5823.

$3 \cdot 10^5$  THP-1-Zellen/Ansatz wurden mit LPS oder TG zur Expression von MCP-1 aktiviert. Zusätzlich wurden Parallelansätze mit KT5823 behandelt. Nach Inkubation über 24 Stunden wurde die Konzentration von MCP-1 mittels ELISA bestimmt. Die Endkonzentrationen der Substanzen sind in der Grafik angegeben.

Die Inhibition der PKG durch Behandlung mit der Substanz KT5823 hatte keinen bedeutenden Einfluß auf die MCP-1-Expression.

Die vorangehenden Experimente konnten durch die Verwendung eines Inhibitors mit einer breiten Selektivität für verschiedenste Klassen an Proteinkinasen Hinweise auf Kinasen erbringen, die bei der LPS-induzierten oder TG-induzierten MCP-1-Expression eine Rolle spielen. Ein erster Hinweis war die starke Inhibition der MCP-1-Expression durch Staurosporin, welches eine „breite“ Selektivität für die Proteinkinasen PKA, PKC, PKG und CaMK besitzt. Daraufhin wurden die einzelnen Familien der Proteinkinasen näher untersucht. Die selektive Inhibition der PKC-Isozyme PKC $\alpha$ , PKC $\beta$  und PKC $\mu$  durch die Substanz Gö6976 und die Inhibition der CaMK durch die Substanz KN62 (s. vorherige Kap.) reduzierte die MCP-1-Expression moderat oder stark, was auf eine Beteiligung der calciumabhängigen PKCs und der CaMKs an der MCP-1-Expression hindeutet. Die Hemmung der PKA durch H89 hat keinen deutlichen Einfluß auf die MCP-1-Expression, jedoch führte die Behandlung von THP-1-Zellen mit cAMP, das unter anderem PKA aktiviert, zu einer drastischen Senkung der MCP-1-Konzentration. Die schwachen Effekte des PKG-Inhibitors KT5823 sprechen gegen eine wesentliche Rolle dieser Kinasen-Klasse an der MCP-1-Expression.

### 2.3. Aktivierung von Transkriptionsfaktoren nach Stimulation von monozytären Zellen mit LPS oder Thapsigargin

Die vorangegangenen Experimente haben sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede hinsichtlich der Beteiligung von Kinasen und Phosphatasen an der durch LPS oder durch TG induzierten MCP-1-Expression aufgezeigt (s. Kap. III.2.1 und Kap. III.2.2). Daraus kann auf eine unterschiedliche Bedeutung einzelner Transkriptionsfaktoren geschlossen werden. So ist die TG-induzierte MCP-1-Expression in kritischer Weise von aktivem Calcineurin abhängig, was auf eine wichtige Rolle der Transkriptionsfaktorfamilie NF-AT hinweist, dem

molekularen Ziel bzw. Substrat von Calcineurin. Im Vergleich dazu ist die Bedeutung von Calcineurin für die LPS-induzierte MCP-1-Expression geringer. Die fast vollständige Aufhebung der MCP-1-Expression durch Inhibitoren, die zu einer Inaktivierung der ERK-1/ERK-2-MAPK führen, deutet auf einen Beitrag der Transkriptionsfaktorfamilie AP-1 hin, deren Aktivierung durch ERK-1/ERK-2-MAPK aktiviert oder induziert werden kann<sup>209-211</sup>. Schließlich gibt es Hinweise, wonach NF- $\kappa$ B als dritte Familie von Transkriptionsfaktoren an der Induktion von MCP-1 durch LPS und TG beteiligt sein können<sup>212;213</sup>. Aufgrund dieser Befunde wurde die Bedeutung der Transkriptionsfaktorfamilien NF-AT, AP-1 und NF- $\kappa$ B für die MCP-1-Expression näher untersucht.

Zunächst interessierte, ob die Inhibition von Calcineurin durch CsA, die zu einer fast völligen Aufhebung der TG-induzierten MCP-1-Expression führte, mit der nukleären Lokalisation von NFAT-Mitgliedern korreliert. Aktives Calcineurin dephosphoryliert NF-AT, wodurch NF-AT in den Kern translozieren und transkriptionell aktiv werden kann. Zur Detektion einer Translokation von NF-AT-Mitgliedern in den Zellkern wurden "Electrophoretic Mobility Shift Assays" (EMSA) mit nukleären Extrakten unterschiedlich behandelter THP-1-Zellen und mit einer DNA-Sonde durchgeführt, die Bindungssequenzen für NF-AT-Mitglieder aufweist. Für die EMSA-Experimente wurden die THP-1-Zellen alternativ mit LPS oder TG behandelt, um die MCP-1-Expression zu induzieren. Weiterhin wurde von Parallelansätzen, die zusätzlich mit dem Calcineurin-Inhibitor CsA behandelt worden waren, Kernextrakte präpariert. In den EMSA-Analysen konnten Banden detektiert werden, die durch einen Überschuss an unmarkierter Sonde kompetitierbar waren, was auf eine sequenzspezifische Bindung von NF-AT-Mitgliedern hinweist (s. Abb. 32).

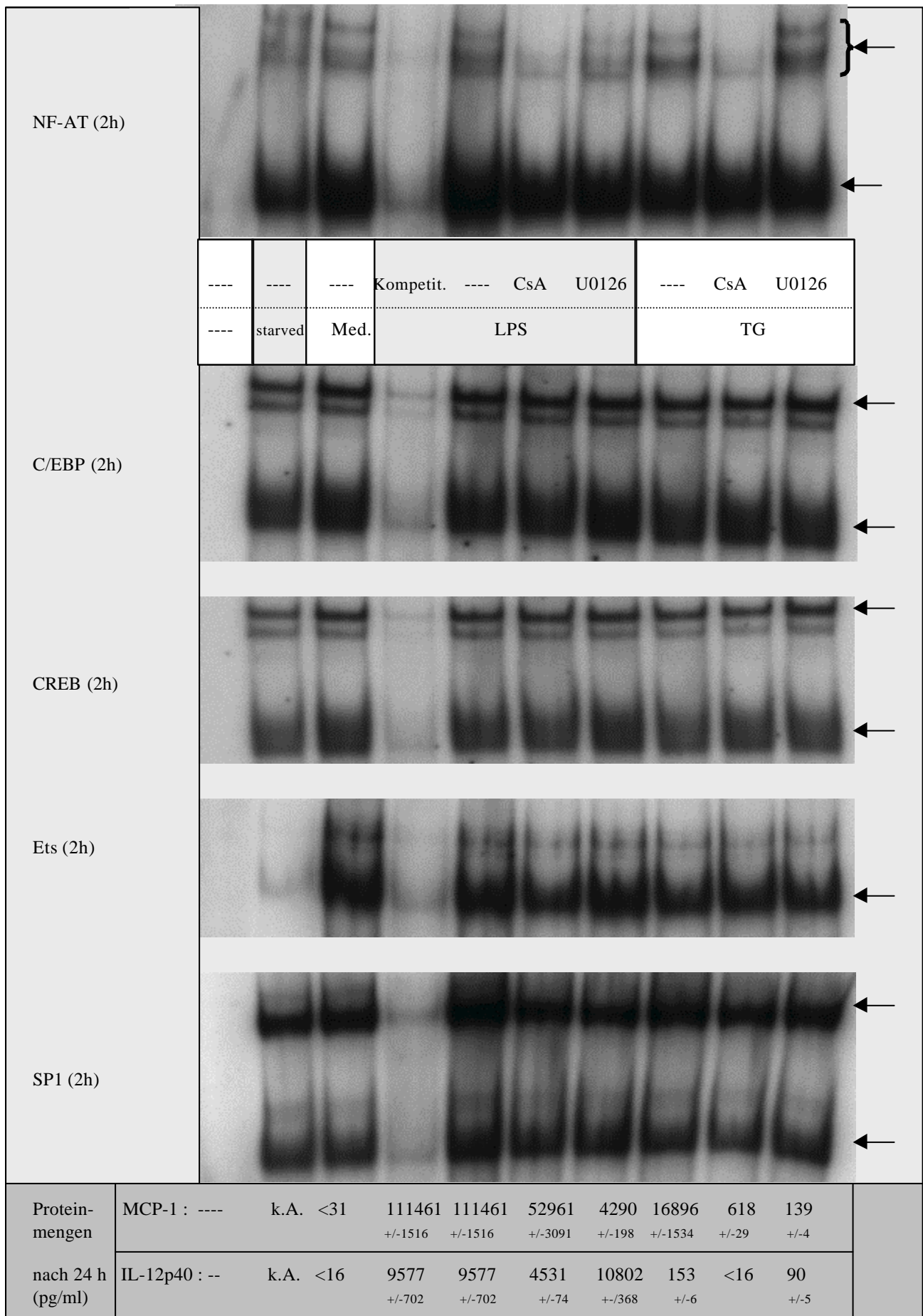


Abb. 32

**Abb. 32**

Detektion von Transkriptionsfaktoren in Kernextrakten stimulierter THP-1-Zellen.

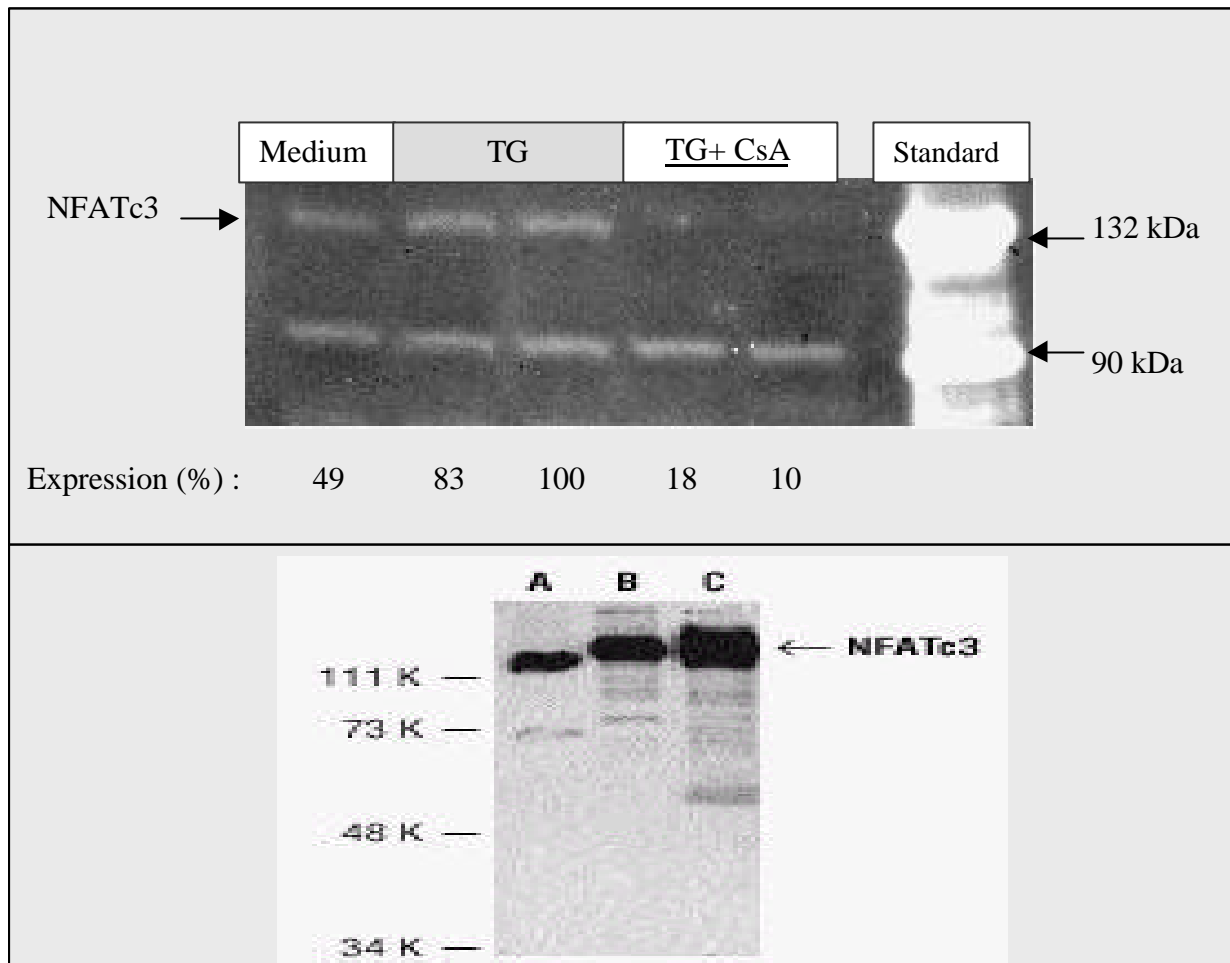
Dargestellt sind die autoradiografischen Aufnahmen von EMSA-Gelelektrophoresen mit DNA-Sonden, die die spezifischen Consensussequenzen für die untersuchten Transkriptionsfaktoren aufweisen. Die verschiedenen EMSAs sind zur besseren Vergleichbarkeit untereinander angeordnet. Banden, die sequenzspezifisch auftreten und durch einen Überschuß der jeweiligen unmarkierten Sonden ("Kompetit.") kompetitierbar sind, sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Es wurden Kernextrakte von THP-1-Zellen präpariert, die für 2h („2h“) unter den angegebenen Bedingungen inkubiert wurden. Alle Kernextrakte stammen aus einem Experiment. Zur Kontrolle der Induktion und Modulation der MCP-1-Expression wurden Parallel-Ansätze von THP-1-Zellen für 24 Stunden inkubiert und die Konzentration an MCP-1 mittels ELISA bestimmt.

Die Inhibition der MCP-1-Expression durch den Calcineurin Inhibitor CsA korreliert mit einer Reduktion an NF-AT in Kernextrakten.

---

Diese NF-AT-Banden waren in Kernextrakten unter dem Einfluß einer Behandlung des Calcineurin-Inhibitors CsA reduziert, der ebenfalls zur Reduktion der MCP-1-Expression führte (s. Abb. 32). Die Inhibition der MCP-1-Expression durch den Calcineurin-Inhibitor CsA korrelierte also mit der Reduktion der Menge an detektierbaren NF-AT Mitgliedern im Zellkern.

Zur Bestätigung dieser Befunde wurde mit nukleären Extrakten SDS-PAGE- und Western Blot-Experimente mit Antikörpern („Immunoblotting“) durchgeführt, die spezifisch für NF-AT-Mitglieder sind. Die Verwendung von Antikörpern, die spezifisch für NF-ATc3 sind, zeigten einen Anstieg von NF-ATc3 in Kernextrakten von THP-1-Zellen, die zur Induktion von MCP-1 mit TG behandelt worden waren (s. Abb. 33). Das nukleäre NF-ATc3 war unter zusätzlicher Behandlung mit CsA deutlich reduziert. Die deutliche Reduktion von nukleärem NF-ATc3 war nicht nur in Kernextraktken nach 2-stündiger Inkubation, sondern bereits nach einer einstündigen Behandlung der THP-1-Zellen sichtbar (Daten nicht gezeigt). NF-ATc2 und NF-ATc1 konnten in den untersuchten Kernextrakten mit spezifischen Antikörpern nicht detektiert werden.

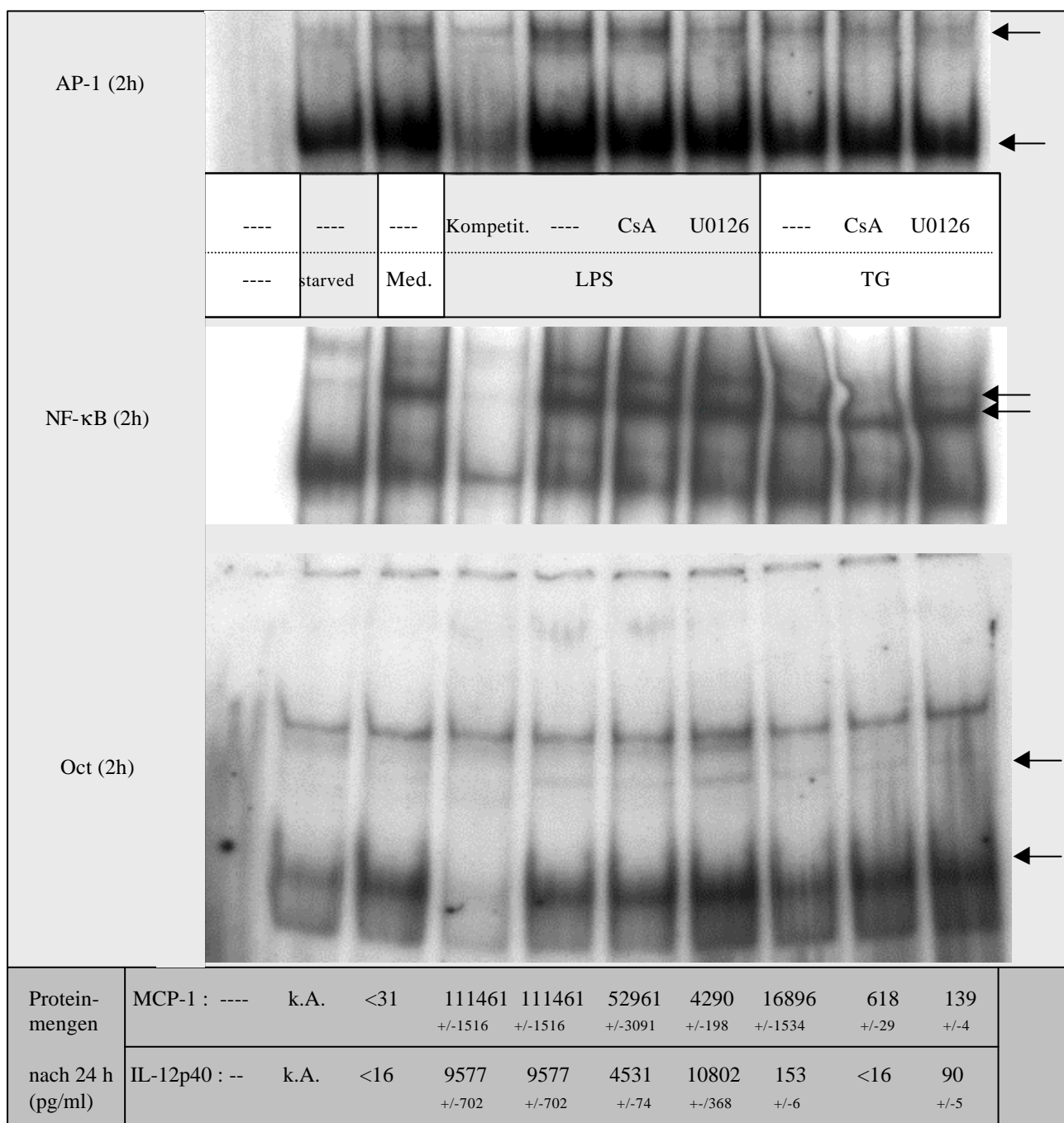
**Abb. 33**

Einfluß des Calcineurin-Inhibitors CsA auf nukleäres NF-ATc3.

Im oberen Teil der Abb. ist eine SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse von NF-ATc3 unterschiedlich behandelter THP-1-Zellen dargestellt.  $10^7$  Zellen wurden für 30 min stimuliert. Nukleäre Extrakte wurden wie beschrieben präpariert. 20 µg Protein wurden auf ein 4-12% Bis-Tris Gels geladen und aufgetrennt. Der Transkriptionsfaktor NF-ATc3 ("NFATc3") wurde mit den Antikörpern sc-8321x und sc-2030 detektiert. Der untere Teil der Abb. zeigt das molekulare Gewicht von NF-ATc3 (mit freundlicher Genehmigung der Fa. Santa Cruz). Diese Western Blot-Analyse der NF-ATc3 Expression in Jurkat (A), BYDP (B) und THP-1 (C) von Gesamtzell-Lysaten wurde mit dem Antikörper sc-8405 durchgeführt.

Die Behandlung von THP-1-Zellen mit TG führt zu einer Zunahme an NF-ATc3 in Kernextrakten, welches unter dem Einfluß von CsA deutlich reduziert wird.

Um den Hinweisen auf eine Bedeutung der Transkriptionsfaktorfamilie AP-1 für die MCP-1-Expression nachzugehen, wurden ebenfalls EMSAs durchgeführt. In Kernextrakten von THP-1-Zellen, die mit LPS oder TG zur Induktion von MCP-1 behandelt worden waren, war AP-1 nachweisbar. Die zusätzliche Behandlung der THP-1-Zellen mit dem MEK-1/MEK-2-Inhibitor U0126 führte zu einer gewissen Reduktion von kompetierbaren Banden, die für



**Abb. 34**

Regulation von AP-1 und NF-κB in THP-1-Kernextrakten bei Induktion und Modulation der MCP-1- bzw. IL-12p40-Expression

Dargestellt sind die autoradiografischen Aufnahmen von EMSA-Gelelektrophoresen mit den Consensussequenz-Sonden für die Transkriptionsfaktoren der Oct-, NF-κB- und AP-1-Familie. Die Beschriftungen und Bedingungen sind analog zu Abb. 33. Alle Kernextrakte stammen aus einem Experiment mit Ausnahme des EMSAs für NF-κB.

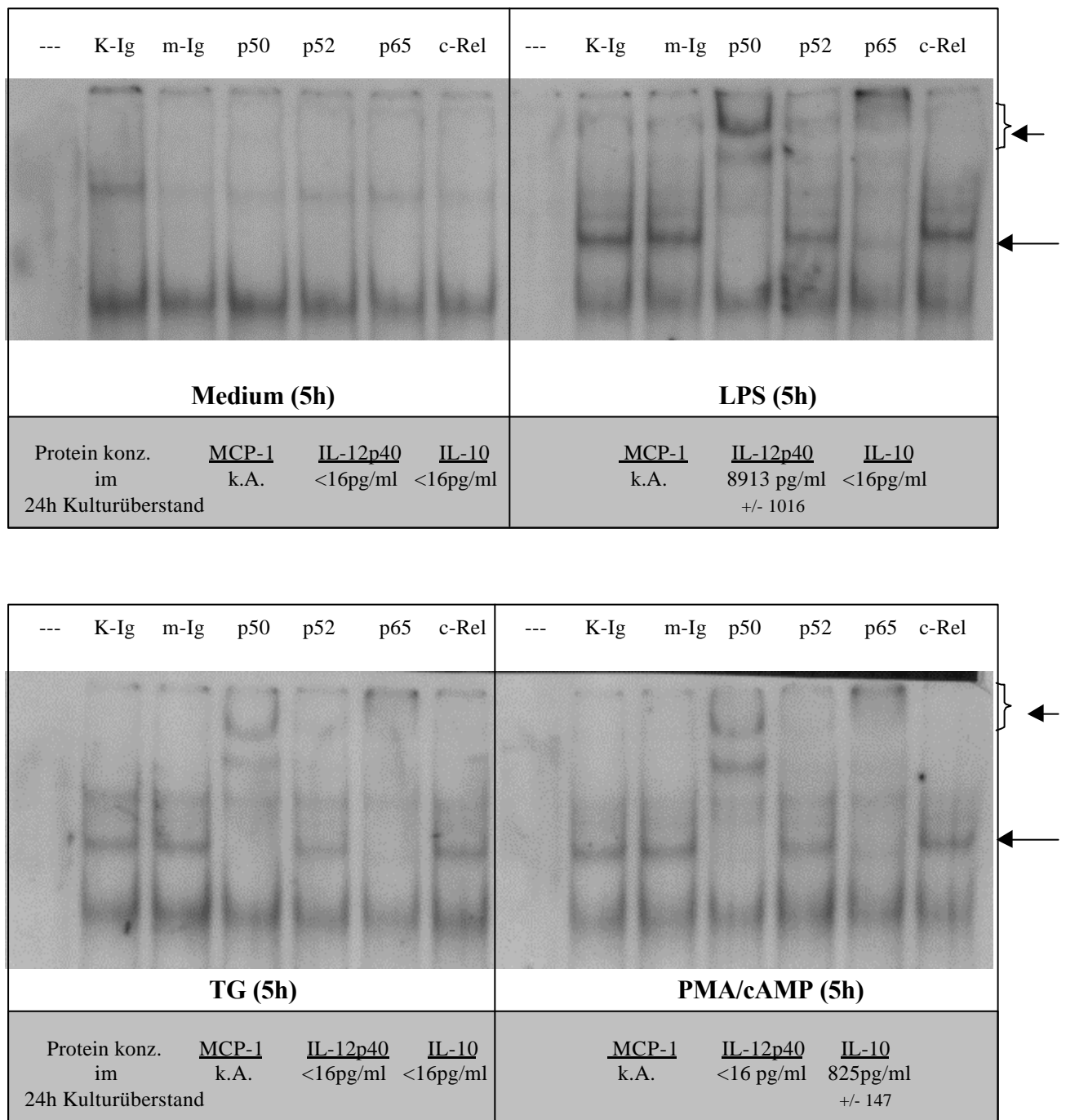
Bei der Induktion von MCP-1 ließen sich spezifische kompetitierbare Banden für AP-1- und NF-κB-Mitglieder in Kernextrakten nachweisen. Andeutungsweise senkt die Behandlung mit U0126 die Menge von nukleären AP-1 Mitgliedern.

AP-1 spezifisch waren. Die Inkubation der THP-1-Zellen in frischem Medium scheint im Vergleich zur Inkubation im Medium der Vorkultur (s. Ansatz "starved" im Vergleich zu "Medium" der Abb. 34) AP-1 zu induzieren. Ähnliche Ergebnisse wurden von Kernextrakten aus Parallelexperimenten erzielt, bei denen die THP-1-Zellen für 5 Stunden inkubiert wurden.

Als dritte Familie von Transkriptionsfaktoren wurden die NF- $\kappa$ B-Mitglieder und ihre Rolle bei der MCP-1-Expression mittels EMSA bzw. Supershift-Analysen untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluß pharmakologischer Inhibitoren, die die Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren hemmen, auf die MCP-1-Expression untersucht.

Zunächst sollte geklärt werden, ob im Zellkern von THP-1-Zellen eine Regulation der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren bei einer Induktion von MCP-1 durch LPS oder TG zu beobachten ist. Die Kernextrakte von THP-1-Zellen, die 2 oder 5 Stunden behandelt wurden, lassen Banden für diese Transkriptionsfaktoren in EMSAs erkennen (s. Abb. 34). Im Vergleich zur Medium-Kontrolle kommt es bei Stimulation mit LPS oder TG zu einer moderaten Zunahme an nukleärem NF- $\kappa$ B, wie Supershift-Analysen von Kernextrakten zeigten. So erfolgte nach einstündiger Stimulation von THP-1-Zellen mit LPS zu eine nukleäre Translokation von NF- $\kappa$ Bp50 und NF- $\kappa$ Bp65 (s. Abb. 35). Dies wurde auch für die Stimulation mit TG gefunden (s. Abb. 35). Überraschenderweise konnte kein c-Rel in Supershift-Analysen von Kernextrakten detektiert werden, obwohl sich mRNA für NF- $\kappa$ B c-Rel durch RT-PCR-Analysen nachweisen ließ (Daten nicht gezeigt) und auch in der Literatur die Expression von NF- $\kappa$ B c-Rel in THP-1-Zellen beschrieben worden ist <sup>214;215</sup>.



**Abb. 35****Einfluß von LPS und TG auf NF-κB-Mitglieder in Kernextrakten von THP-1-Zellen**

Autoradiografische Aufnahme eines EMSA.  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen wurden in Medium ohne ("Medium") oder mit LPS (10µg/ml) bzw. TG (2,5µM) oder einer Kombination aus 10nM PMA und 500µM dbcAMP ("PMA/cAMP") für 5 h kultiviert. Die Kulturüberstände wurden für ELISA verwendet, um die Aktivität der Substanzen zu kontrollieren. Aufgrund eines fehlerhaften ELISAs gibt es zu MCP-1 keine Angaben ("k.A."). Ein Menge von 4 µg Gesamt-Protein pro Gelspur führte in Titrationsexperimenten zu optimalen Ergebnissen. Als Sonde zur Detektion von NF-κB-Mitgliedern wurde eine modifizierte NF-κB-Consensussequenz<sup>216</sup> verwendet. Die EMSAs für die Oct-Transkriptionsfaktorfamilie wurden parallel durchgeführt und dienten der Normalisierung der eingesetzten Kernproteinmengen (Daten nicht gezeigt). Der Einfluß der Spezifität der Supershift-Antikörper wurde durch Ansätze ohne Antikörper ("---") oder mit unspezifischem Immunglobulin aus Mausserum ("m-Ig") oder Kaninchenserum ("K-Ig") kontrolliert. Die Gelspuren mit NF-κB-Antikörpern wurden mit der jeweiligen Spezifität für die Familienmitglieder gekennzeichnet. Supershift-Banden sind mit Pfeilen und Klammern

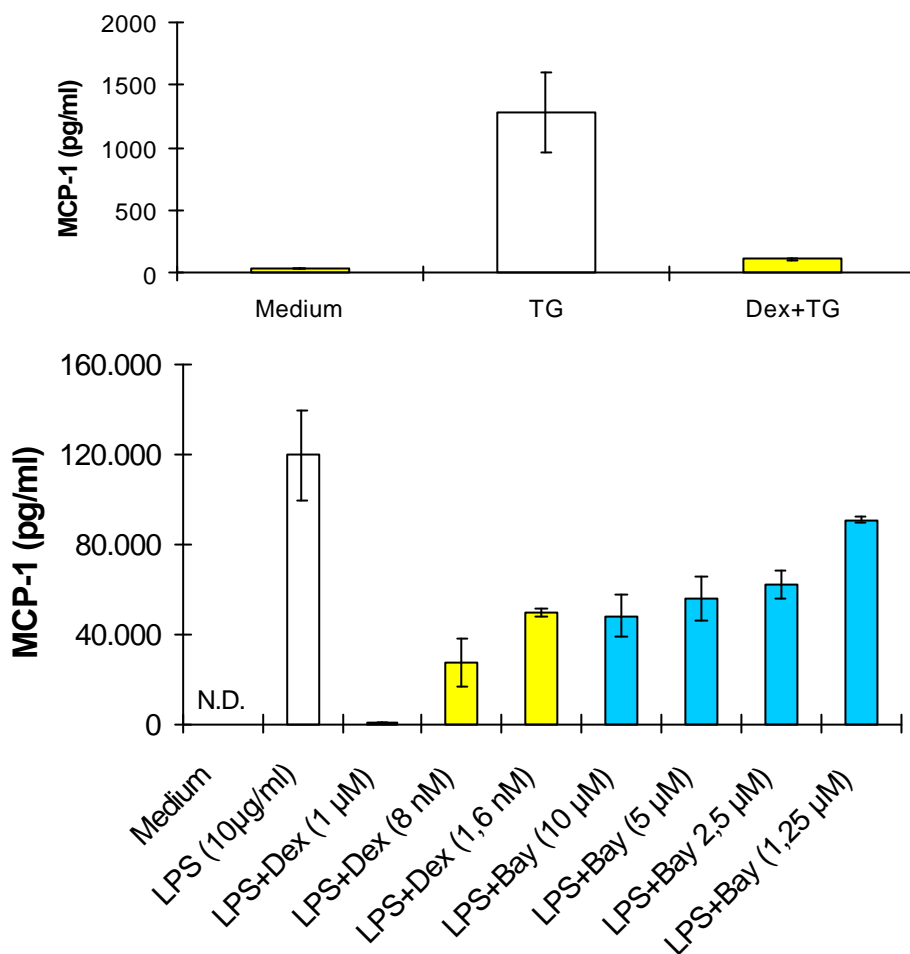
gekennzeichnet. Die Ergebnisse wurden in mehr als 3 Experimenten und für eine Inkubationsdauer von 2 Stunden bestätigt.

Es ist zu beachten, daß TG und PMA/cAMP in den verwendeten Konzentrationen i.d.R. keine nennenswerten Mengen an IL-12p40 in THP-1-Zellen induzierten. IL-10 wurde nicht durch LPS oder Thapsigargin, wohl aber durch PMA/cAMP induziert.

Die Behandlung von THP-1-Zellen mit LPS oder TG führte zur nukleären Translokation von NF- $\kappa$ Bp50 und NF- $\kappa$ Bp65.

---

Nachdem gezeigt worden war, daß die Stimulation mit LPS und TG zur Translokation von NF- $\kappa$ B in den Kern führt, sollte dessen Bedeutung für die MCP-1-Expression geklärt werden. Dazu wurde der Einfluß pharmakologischer Inhibitoren von NF- $\kappa$ B auf die LPS- und TG-induzierte MCP-1-Expression mittels ELISA untersucht. Das Glucocorticoide Dexamethason blockiert die NF- $\kappa$ B-abhängige Transkription<sup>217;218</sup> über Mechanismen, die noch nicht endgültig geklärt sind. Die Substanz Bay117085 sorgt dagegen für eine Retention von NF- $\kappa$ B im Cytoplasma durch die Inhibition der Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>219</sup>. Tatsächlich zeigte die starke Inhibition der MCP-1-Bildung durch Dexamethason und Bay117085, daß aktives NF- $\kappa$ B zur Expression von MCP-1 beiträgt und benötigt wird (s. Abb. 36).

**Abb. 36**

Einfluß von NF- $\kappa$ B-Inhibitoren auf die MCP-1-Expression.

$3 \cdot 10^5$  THP-1-Zellen/Ansatz wurden mit LPS oder TG zur Expression von MCP-1 aktiviert. Zusätzlich wurden Parallelansätze mit Dexamethason ("Dex") oder Bay117085 ("Bay") als NF- $\kappa$ B-Inhibitoren behandelt. Für den Ansatz mit TG wurde Dexamethason in einer Endkonzentration von 1  $\mu$ M verwendet. Die Endkonzentrationen der Substanzen sind unter der Grafik angegeben. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die Konzentration an MCP-1 mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse konnten in mehr als Experimenten bestätigt werden.

Die starke Inhibition der MCP-1-Expression durch Dexamethason und Bay117085 weist auf eine Abhängigkeit der Expression von aktiven NF- $\kappa$ B-Mitgliedern hin.

Darüber hinaus wurden noch weitere Transkriptionsfaktoren untersucht. EMSA mit Consensussequenzen für *Octamer*(Oct)-Bindeproteine zeigten, daß die Behandlung von THP-1-Zellen mit U0126 und CsA einen gewissen Einfluß auf die Quantität und Zusammensetzung der nachgewiesenen Banden hat (s. Abb. 34). Interessanterweise wird diese Transkriptionsfaktorfamilie oft als Kontrolle zur Normalisierung der Kernextrakte eingesetzt, da Oct1 konstitutiv exprimiert wird<sup>220</sup>. Jedoch ist Oct2 als regulierter Transkriptionsfaktor für B-Lymphozyten<sup>221;222</sup> und andere lymphoide Zellen beschrieben worden. Die Ergebnisse deuten an, daß Oct2a als Normalisierungskontrolle für EMSA-Analysen in THP-1-Zellen nicht ohne weiteres geeignet ist. Es wurden noch weitere Transkriptionsfaktoren untersucht, die aufgrund experimenteller Daten und Literaturhinweisen für die MCP-1-Expression eine Rolle spielen könnten. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen über die Rolle der PKA wurde die Transkriptionsfaktorfamilie CREB/ATF untersucht. Da nach Literaturdaten ebenfalls die Transkriptionsfaktorfamilie Sp-1 für die Aktivität des MCP-1-Promotors eine Rolle spielt<sup>223 224</sup>, wurden auch für diese EMSAs durchgeführt. Die EMSA Experimente zur Detektion von C/EBP, CREB, Sp-1 und Ets-1 zeigten, daß diese Transkriptionsfaktoren schon ohne Stimulation im Kern vorhanden sind und durch die Behandlung der THP-1-Zellen mit LPS oder TG (s. Abb. 34) nicht reguliert werden.

Die Untersuchung von ausgewählten Transkriptionsfaktorfamilien mit Hilfe von EMSA und Western Blot-Analysen konnte das Verständnis über die LPS-induzierte und die TG-induzierte MCP-1-Expression vertiefen.

Die Experimente haben gezeigt, daß die völlige Inhibition der TG-induzierten MCP-1-Expression mit einer drastischen Reduktion von nukleärem NF-ATc3 einhergeht. Die Inaktivierung der MEK-1-/MEK-2 MAPK-Kinasen kann sich auf die Transkriptionsfaktorfamilie AP-1 auswirken, da diese bei stimulierten THP-1-Zellen im Zellkern vorhanden sind. EMSA-Analysen deuteten Effekte des MEK1-/MEK-2-Inhibitors

U0126 an. Die Stimulation der MCP-1-Expression durch LPS oder TG führt zu einer nukleären Translokation von NF- $\kappa$ Bp50 und NF- $\kappa$ Bp65, die zur MCP-1-Expression beitragen.

## 2.4. Bindung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 an distinkte Regionen des MCP-1-Promotors und Decoy-Experimente

Die vorangegangenen Experimente haben die Bedeutung von den 3 Transkriptionsfaktorfamilien NF- $\kappa$ B, AP-1 und NF-AT für die MCP-1-Expression nachgewiesen: die Stimulation mit LPS oder TG induzierte nukleäres NF- $\kappa$ B. Die Sensitivität gegen CsA und die Regulation von NF-ATc3 deuten auf eine wesentliche Rolle dieses Transkriptionsfaktors für die TG-induzierte MCP-1-Expression hin. Die Detektion von nukleärem AP-1, die angedeutete Senkung von durch U0126 und verschiedene Befunde<sup>92;225</sup> weisen auf die Transkriptionsfaktorfamilie AP-1 hin.

Möglicherweise kann die CREB/ATF-Transkriptionsfaktorfamilie die Bildung von MCP-1 negativ beeinflussen. Die Hemmung der Bildung von MCP-1 durch cAMP deutet eine negative Rolle von CREB/ATF-Mitgliedern an.

Es sollte im weiteren Verlauf untersucht werden, an welche Bindungsstellen des MCP-1-Promotors diese Transkriptionsfaktoren binden können. Da aufgrund höherer Sachzwänge keine Reporter-Gen-Analysen möglich waren, wurde deshalb zur Auswahl von promoterspezifischen Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B, NF-AT und AP-1 die publizierten Promotorsequenzen mittels der MatInspector-Programm<sup>226</sup> *in silico* analysiert und

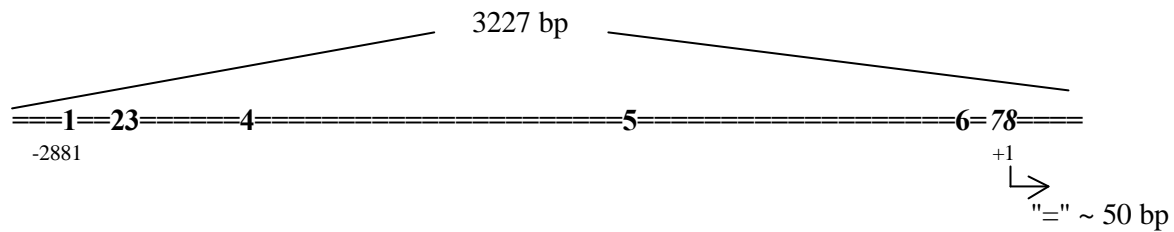
Literaturhinweise berücksichtigt. Anschließend wurden für sechs ausgewählte Promotorregionen EMSA bzw. Supershift-Analysen durchgeführt, um die Bindung der jeweiligen Transkriptionsfaktoren an die potentiellen Bindungsstellen zu beurteilen. Abschließend wurde der Versuch unternommen, einzelne Ergebnisse mit der Decoy-Technik zu bestätigen.

Von den sechs ausgewählten Promotorregionen (s. Abb. 37), zeichnen sich zwei Regionen sich durch eine Besonderheit aus.

Die proximale Region "hMCPAKA" (-160 bis -121) weist sowohl eine potentielle Bindungsstelle für NF- $\kappa$ B als auch eine für die Familie AP-1 auf.

Ebenso besitzt die distale Region hMCPATKd (-2881 bis -2856) mögliche Bindungsstellen für zwei Transkriptionsfaktorfamilien, die für die LPS- und TG-induzierte MCP-1-Expression eine Bedeutung haben, NF-AT und NF- $\kappa$ B.

Die EMSA- und Supershift-Analysen der distalen Region hMCPATKd, die bislang in der Literatur nicht erwähnt worden ist, zeigten eine Bindung von NF- $\kappa$ Bp50 und NF- $\kappa$ Bp65 bei der Stimulation der Zellen mit LPS oder TG (s. Abb. 38). Im Gegensatz zu den Erwartungen konnte keine Bindung von NF-AT Mitgliedern nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), dafür ergaben Supershift-Analysen überraschenderweise eine Bindung der AP-1 Mitglieder c-Jun, JunD und Fra-2 (s. Abb.38). Zur Eingrenzung der kritischen Sequenzbereiche für die Bindung von NF- $\kappa$ B-Mitgliedern wurden Punktmutationen durchgeführt, die tatsächlich kritische Positionen in diesem Bereich demonstrieren konnten (Daten nicht gezeigt).



## 1)

## hMCPATKd

5'- CCT CTG GGG GCC TTT CCC TTG TGT GT-3'

3'- GGA GAC CCC CGG AAA GGG AAC ACA CA-5'

Position: -2881 bis -2856

Literatur : k.A.

## Sequenzhomologien :

5'-GGGANNYYCC-3' : NF-κB consensus binding site (Kunsch, C., S. M. Ruben, and C. A. Rosen. 1992. *Mol. Cell Biol.* 12:4412-4421; Lin, R., D. Gewert, and J. Hiscott. 1995. *J. Biol. Chem.* 270:3123-3131.)5'-GGAAAA-3' : NF-AT binding site (Randak, C., T. Brabletz, M. Hergenrother, I. Sobotta, and E. Serfling. 1990. *EMBO J.* 9:2529-2536).

## 2)

## hMCPKOR

5'- TAC GGG ATC TGG GAA CTT CCA AAG CT-3'

3'- ATG CCC TAG ACC CTT GAA GGT TTC GA-5'

Position: -2711 bis -2686

Literatur : 256

## Sequenzhomologien :

5'-GGGANNYYCC-3' : NF-κB consensus binding site

## 3)

## hMCPKUeda

5'- TCA GAG TGG GAA TTT CCA CTC ACT TC-3'

3'- AGT CTC ACC CTT AAA GGT GAG TGA AG-5'

Position: -2679 bis -2654

Literatur : 251

## Sequenzhomologien :

5'-GGGANNYYCC-3' : NF-κB consensus binding site

## 4)

## hMCPAPEt

5'- AAG TGA GTC ATG CCA CAG GAT GTC TA-3'

3'- TTC ACT CAG TAC GGT GTC CTA CAG AT-5'

Position: -2339 bis -2314

Literatur : k.A.

## Sequenzhomologien :

5'-TGAGTCA-3' : AP-1 consensus binding site<sup>178</sup>5'-A/CGGAA-3' : Ets consensus binding site (Wasylyk, C., J. P. Kerckaert, and B. Wasylyk. 1992. *Genes Dev.* 6:965-974.)

## 5)

## hMCPCCSS

5'- GAA TGA AGT CAG GCT TTC CAA TTC CCG AAA TAC-3'

3'- CTT ACT TCA GTC CGA AAG GTT AAG GGC TTT ATG-5'

Position: -1173 bis -1141

Literatur : k.A.

## Sequenzhomologien :

5'- CCAAT -3' oder 5'-

TGTGG(A/T)(A/T)(A/TG) -3' : C/EBP consensus binding site (Wedel, A. and H. W. Ziegler-Heitbrock. 1995. *Immunobiology* 193:171-185.)5'-TGACGTCA-3' : ATF/CRE Element<sup>179</sup>5'-TTN<sub>2</sub>AA-3' : STAT consensus recognition site5'-TTCN<sub>2</sub>GAA-3' : STAT 1 STAT3 recognition site (Heinrich, P. C., I. Behrmann, G. Muller-Newen, F. Schaper, and L. Graeve. 1998. *Biochem. J.* 334:297-314.)

## 6)

## hMCPAKA

5'-TTA TCA CTC ATG GAA GAT CCC TCC TCC TGC TTG ACT

CCG C- 3'

3'-AAT AGT GAG TAC CTT CTA GGG AGG AGG ACG AAC TGA-

GGC G- 5'

Position: -160 bis -121

Literatur : 92

## Sequenzhomologien :

5'-GGGANNYYCC-3' : NF-κB consensus binding site

5'-TGACTCA-3' : AP1/TRE Element

## 7)

TATA Box

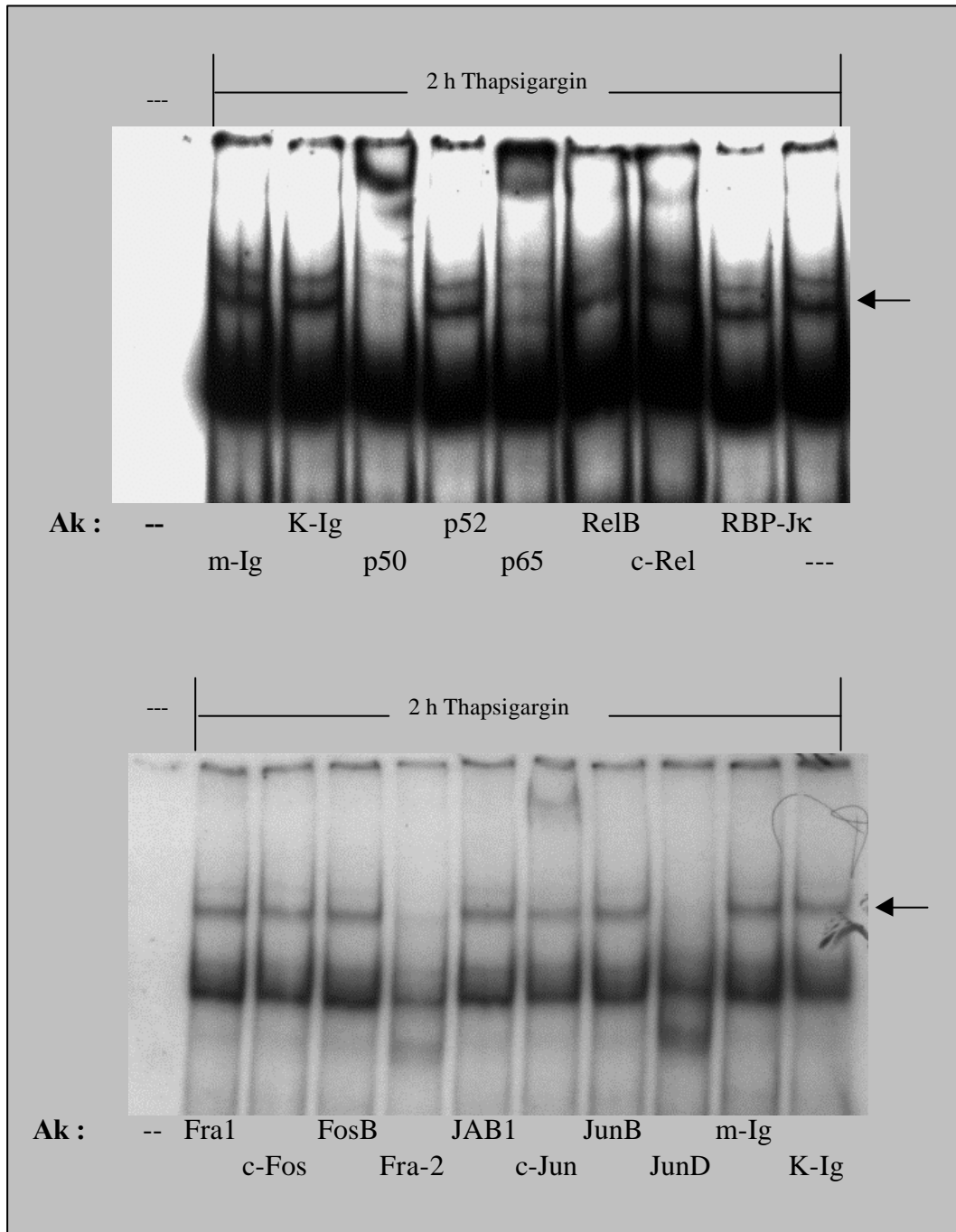
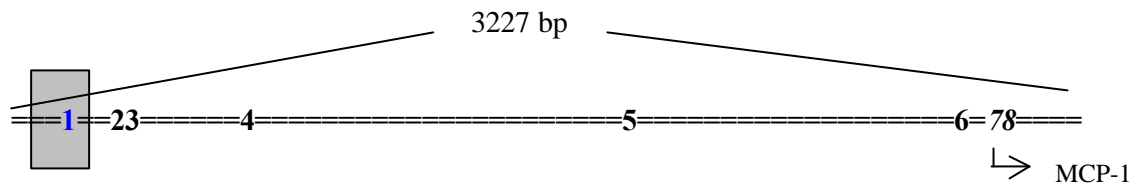
## 8)

Start Codon 1

## Abb. 37

Lokalisation potentieller Bindungsstellen im MCP-1-Promotors, die mit EMSA-Analysen untersucht wurden. Die Position der Bindungsstellen sind maßstabsgerecht in dem Schema des MCP-1-Promotors eingetragen. Die Bereiche mit Sequenzhomologien sind unterstrichen. Das Akronym hMCPAKA steht für "humaner *MCP-1-Promotor*, *AP-1/NF-κB/AP-1* Region. Entsprechend bedeutet hMCPATKd "humaner *MCP-1-Promotor*, *NF-AT/NF-κB*, *distale* Region. "k.A.": keine Literaturangaben vorhanden.

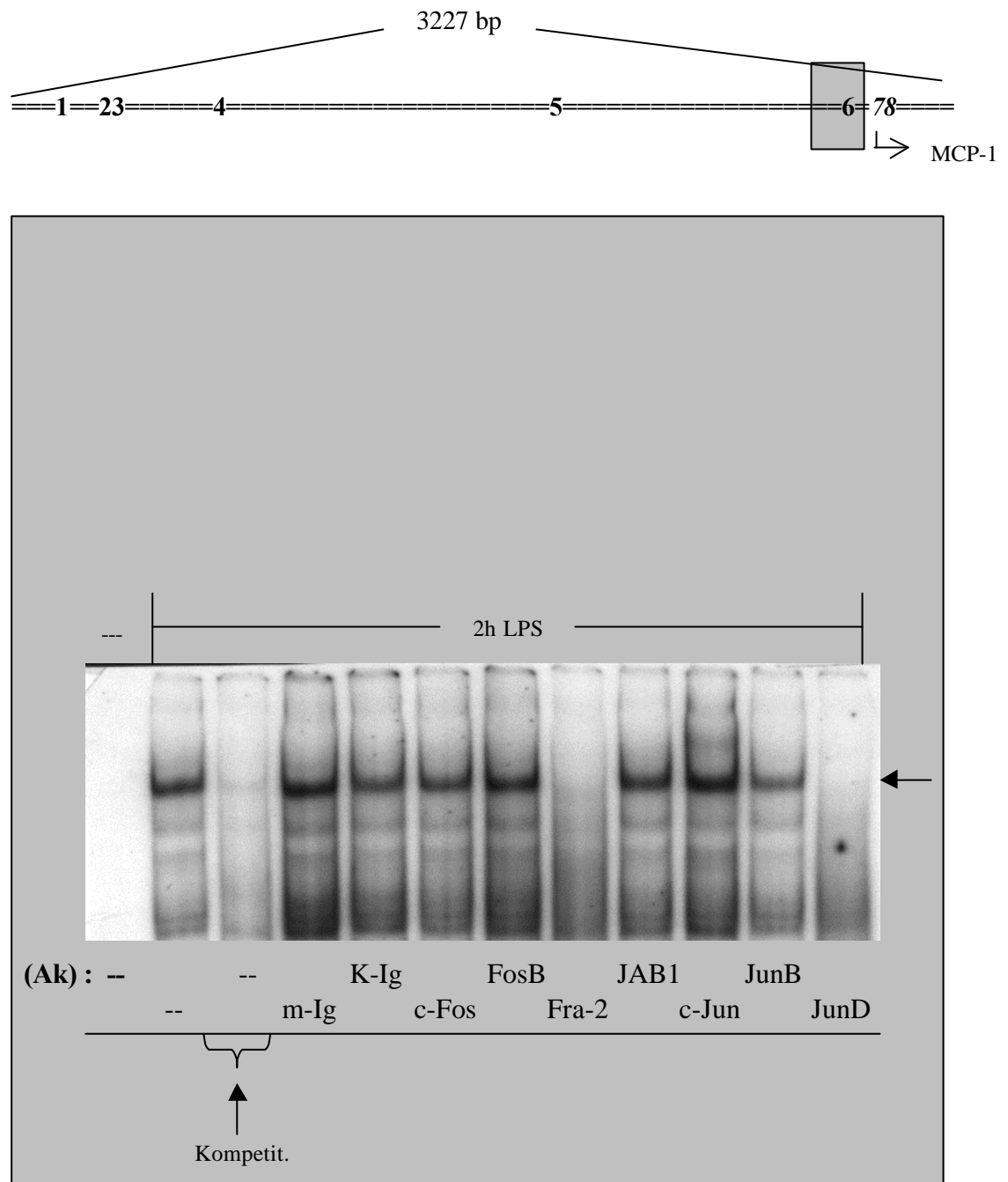
Verschiedene Promotorregionen besitzen eine potentielle Bindungsstelle für NF-κB, AP-1, NF-AT oder CREB/ATF. Die Promotorbereiche hMCPATKd und hMCPAKA weisen jeweils zwei potentielle Bindungsstellen auf.



**Abb. 38**

Bindung von NF- $\kappa$ B- und AP-1-Familienmitgliedern an eine distale Region des MCP-1-Promotors. Dargestellt sind die autoradiografische Aufnahmen der EMSA-Gelelektrophoresen mit der distalen Sonde aus dem MCP-1-Promotor hMCPATkd (s. Abb. 37). Die Spezifität der Antikörper (Ak) für die Supershift-Analysen sind unter den entsprechenden Gelspuren angegeben. Die Kernextrakte von den Stimulationen mit LPS und TG zeigten die gleichen detektierbaren Familienmitglieder. Als repräsentatives Beispiel sind die Ergebnisse nach einer 2-stündigen Stimulation mit TG präsentiert. Die Reduktion und Positionswechsel der Banden ("Supershift") durch die spezifischen Antikörper deuten eine Bindung von NF- $\kappa$ Bp50, NF- $\kappa$ Bp65, c-Jun, Fra-2 und JunD an die distale Region hMCPATkd an.

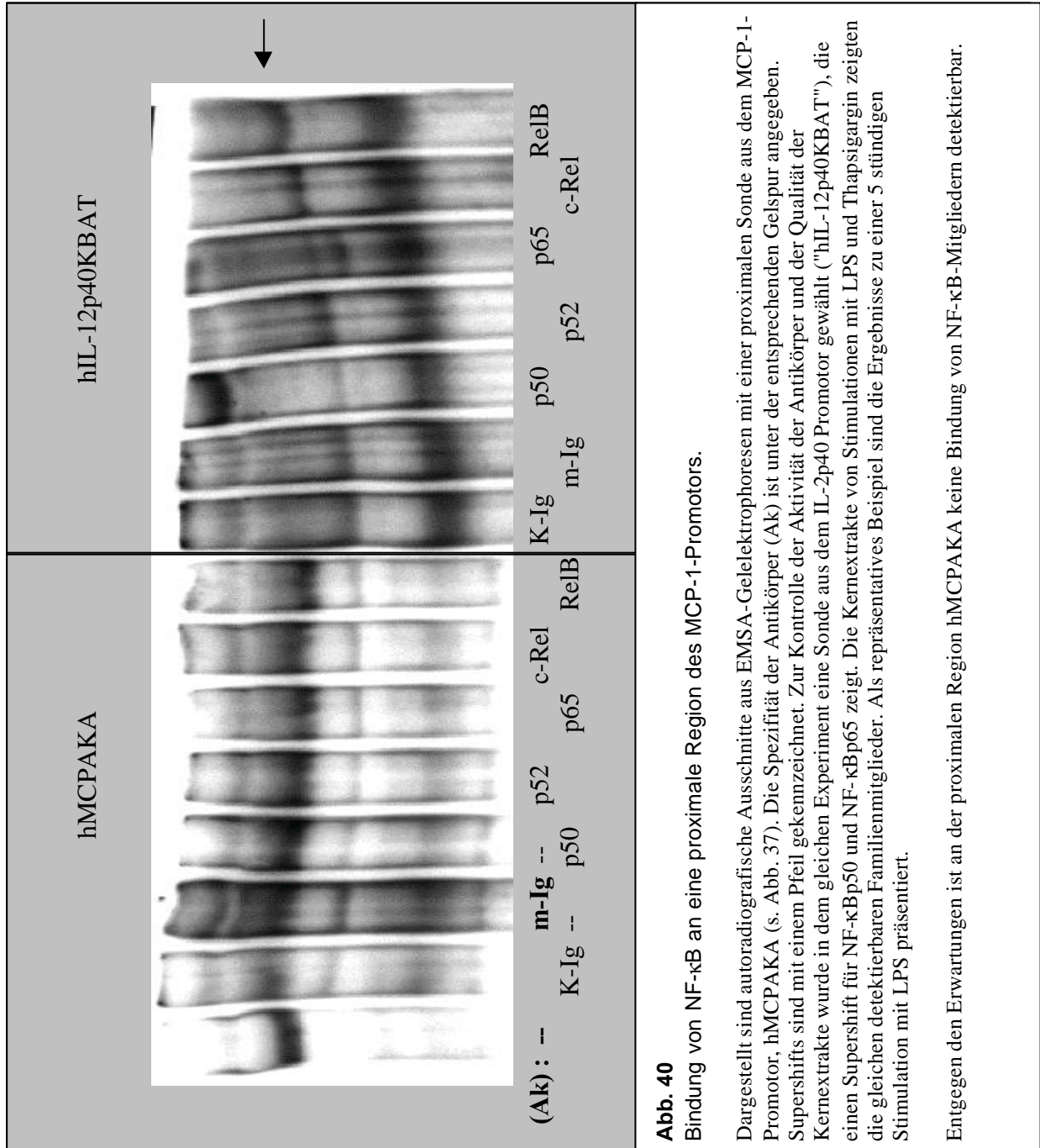


**Abb. 39**

Bindung von AP-1 Familienmitgliedern an eine proximale Region des MCP-1-Promotors

S. Abb. 38. Die Kernextrakte von Stimulation mit LPS und Thapsigargin zeigten die gleichen detektierbaren Familienmitglieder. Als repräsentatives Beispiel sind die Ergebnisse nach einer 2-stündigen Stimulation mit LPS präsentiert. Kompetit. bezeichnet den Nachweis spezifischer Banden durch Kompetition mit einem Überschuss an unmarkierter DNA-Sonde.

Der "Supershift" durch die spezifischen Antikörper deuten eine Bindung von c-Jun, Fra-2 und JunD an die proximale Region hMCPAKA an.



**Abb. 40**  
 Bindung von NF-κB an eine proximale Region des MCP-1-Promotors.

Dargestellt sind autoradiografische Ausschnitte aus EMSA-Gelelektrophoresen mit einer proximalen Sonde aus dem MCP-1-Promotor, hMCPAKA (s. Abb. 37). Die Spezifität der Antikörper (Ak) ist unter der entsprechenden Gelspur angegeben. Supershifts sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Zur Kontrolle der Aktivität der Antikörper und der Qualität der Kernextrakte wurde in dem gleichen Experiment eine Sonde aus dem IL-2p40 Promotor gewählt ("hIL-12p40KBAT"), die einen Supershift für NF-κBp50 und NF-κBp65 zeigt. Die Kernextrakte von Stimulationen mit LPS und Thapsigargin zeigten die gleichen detektierbaren Familienmitglieder. Als repräsentatives Beispiel sind die Ergebnisse zu einer 5 stündigen Stimulation mit LPS präsentiert.

Entgegen den Erwartungen ist an der proximalen Region hMCPAKA keine Bindung von NF-κB-Mitgliedern detektierbar.

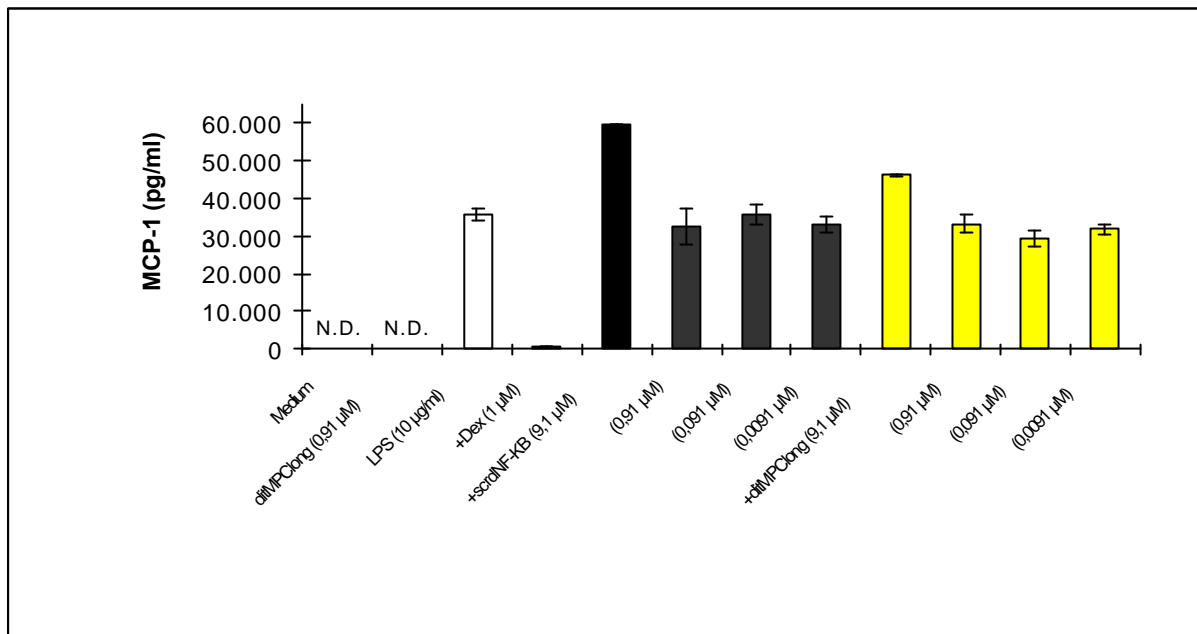
Die Untersuchung der proximalen Region hMCPAKA mittels EMSA und Supershift ergab eine Bindung der AP-1 Mitglieder c-Jun, JunD und Fra-2 (s. Abb.39). Im Gegensatz zu dem Hinweis aus der Literatur<sup>93</sup> konnte keine Bindung von NF- $\kappa$ B-Mitgliedern detektiert werden (s. Abb. 40). Dieses Ergebnis wurde durch Wiederholungsexperimente mehrfach bestätigt.

Als nächstes sollte untersucht werden, welche Auswirkung die distale Promotorregion hMCPATKd oder die proximalen Region hMCPAKA auf die LPS- oder TG-induzierte MCP-1 Expression hat. Dazu sollte die sogenannte Decoy-Technik eingesetzt werden<sup>227;228</sup>. Die Kontrollexperimente mit einem DNA-Decoy für die distale Promotorregion hMCPATKd und ohne ein Transfektionsreagenz hatten keinen sequenzspezifischen Einfluß auf die LPS-induzierte MCP-1 Expression (s. Abb. 41). Transfektionsexperimente mit dem DNA-Decoy und mit einem Transfektionsreagenz führten zu einer starken sequenzspezifischen Steigerung der LPS-induzierten MCP-1-Expression durch die Oligonukleotide (s. Abb. 42). Aufgrund der ausbleibenden sequenzspezifischen Effekte in den Kontrollexperimenten (s. Abb. 41 und Daten nicht gezeigt) und den sequenzspezifischen immunstimulatorischen Eigenschaften der Oligonukleotide in Experimenten mit einem Transfektionsreagenz konnte die „Decoy-Technik“ nicht zur Bewertung der Rolle der verschiedenen Regionen des MCP-Promotors verwendet werden.

Die Region hMCPAPEt (s. Abb. 37) konnte in EMSA bzw. Supershift Experimenten die erwähnten AP-1 Mitglieder binden. Für die Region hMCPCCSS gab es Hinweise auf einer Bindung von CREB-1, ATF-3 und C/EBP (Daten nicht gezeigt).

Die vorhergehenden Experimente haben auf Bedeutung der Transkriptionsfaktorfamilien NF- $\kappa$ B, NF-AT und AP-1 hingewiesen. Die Analyse des MCP-1-Promotors *in silico* und mit EMSA bzw. Supershift-Experimenten haben für die distale Region hMCPATKd die Bindung

von NF- $\kappa$ Bp50, NF- $\kappa$ Bp65, c-Jun, JunD und Fra-2 gezeigt. Im Vergleich dazu konnte für die proximale Region hMCPA<sub>KA</sub> nur eine Bindung der AP-1 Mitglieder c-Jun, JunD und Fra-2 nachgewiesen werden.

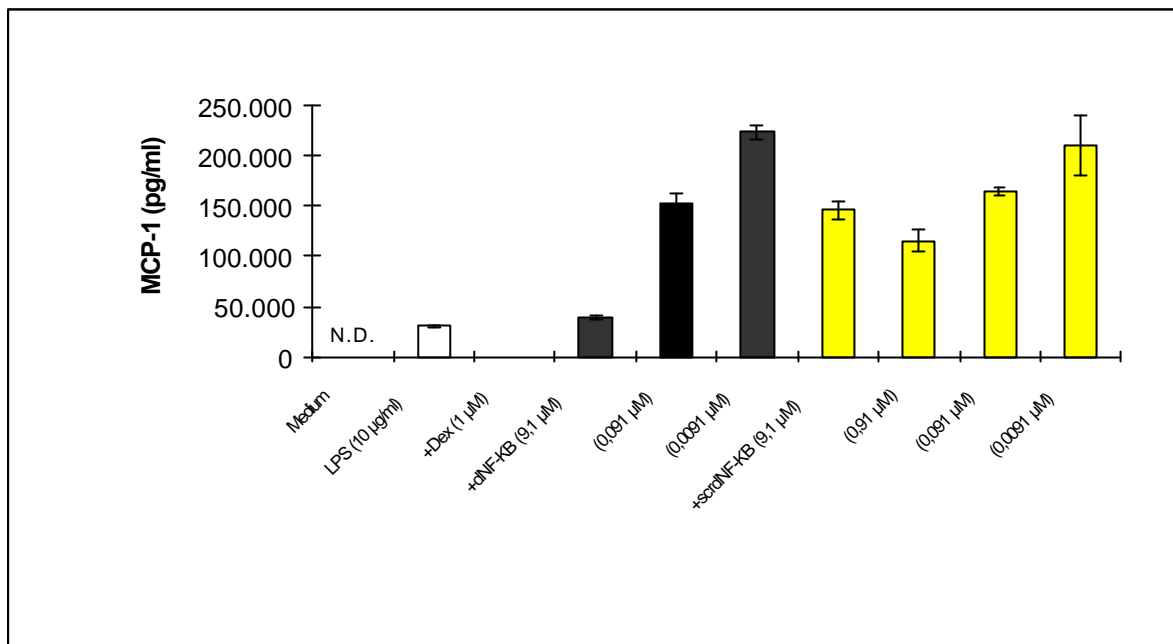


**Abb. 41**

Modulation der MCP-1-Expression durch den Einsatz der Decoy-Technik.

$3,5 \cdot 10^6$  THP-1-Zellen/Ansatz wurden mit LPS zur Expression von MCP-1 aktiviert. Als „Decoy“ für die distale Region des MCP-1-Promotors hMCPATK<sub>d</sub>, welche Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B besitzt, wurde das Oligonukleotid ditMCPlong eingesetzt. Zur Kontrolle der Inhibition von NF- $\kappa$ B-Mitgliedern wurde Dexamethason (Dex) verwendet. Sequenzunspezifische Einflüsse durch das Decoy-Oligonukleotid wurden durch das DNA-Fragment scrNF- $\kappa$ B kontrolliert. Nach 24 Stunden Inkubation wurde die Konzentration von MCP-1 mittels ELISA bestimmt. Die Endkonzentrationen der Substanzen sind in der Grafik angegeben. Die Ergebnisse wurden in 4 Teil-Experimenten bestätigt.

Die Verwendung des Decoy-Oligonukleotids ditMCPlong hat keinen sequenzspezifischen Einfluß auf die LPS-induzierte MCP-1-Expression.

**Abb. 42**

Modulation der MCP-1-Expression durch den Einsatz der Decoy-Technik und eines Transfektionsreagenz.

S. Abb. 41. Zur Erleichterung der Transfektion der Zellen mit den Oligonukleotiden wurde das Transfektionsreagenz Effectene der Fa. Qiagene verwendet. Als Decoy für die NF-κB-Mitglieder wurde das Oligonukleotid dNF-κB eingesetzt. Zur Kontrolle der Inhibition von NF-κB-Mitgliedern wurde Dexamethason (Dex) verwendet. Die sequenzunspezifischen Einflüsse durch das Decoy Oligonukleotid wurden durch das DNA-Fragment scrdNF-κB kontrolliert, welches den gleichen Gehalt an DNA-Basen aufweist und eine veränderte Sequenzabfolge besitzt.

Die Verwendung von Decoy-Oligonukleotiden mit einem Transfektionsreagenz führte zu einer starken sequenzunspezifischen Steigerung der LPS-induzierten MCP-1-Expression.

### 3. Induktion von MCP-1 bei frisch isolierten primären Monozyten

In den bisher durchgeführten Experimenten wurde die Regulation der MCP-1-Expression in monozytären Zellen anhand der Zelllinie THP-1 untersucht, da gezeigt worden ist, daß sich THP-1-Zellen und humane primären Monozyten aus PBMC sich bei einer Stimulation mit LPS hinsichtlich der Aktivierungsparameter MCP-1, IL-12, IL-6 und TNF-α entsprechen. Um einen Hinweis auf die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf primäre Monozyten zu erlangen,

wurde die Reproduzierbarkeit der Induktion von MCP-1 durch Stimulation mit dem Phorbolster PMA oder durch Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels durch das Calcium-Ionophor A23187 getestet. Die Stimulation von PBMC Monozyten mit PMA oder A23187 führte zu einer dosisabhängigen MCP-1-Expression (s. Abb. 43). Bei hohen Konzentrationen des Calcium-Ionophors A23187 traten zytotoxische Effekte auf, die die MCP-1-Expression stark beeinträchtigten.

Die Abhängigkeit der LPS-induzierten MCP-1-Expression von MEK-1/MEK-2, die bei der monozytären Linie THP-1 nachgewiesen worden war, konnte auch für primäre Monozyten gezeigt werden (s. Abb.44 ).

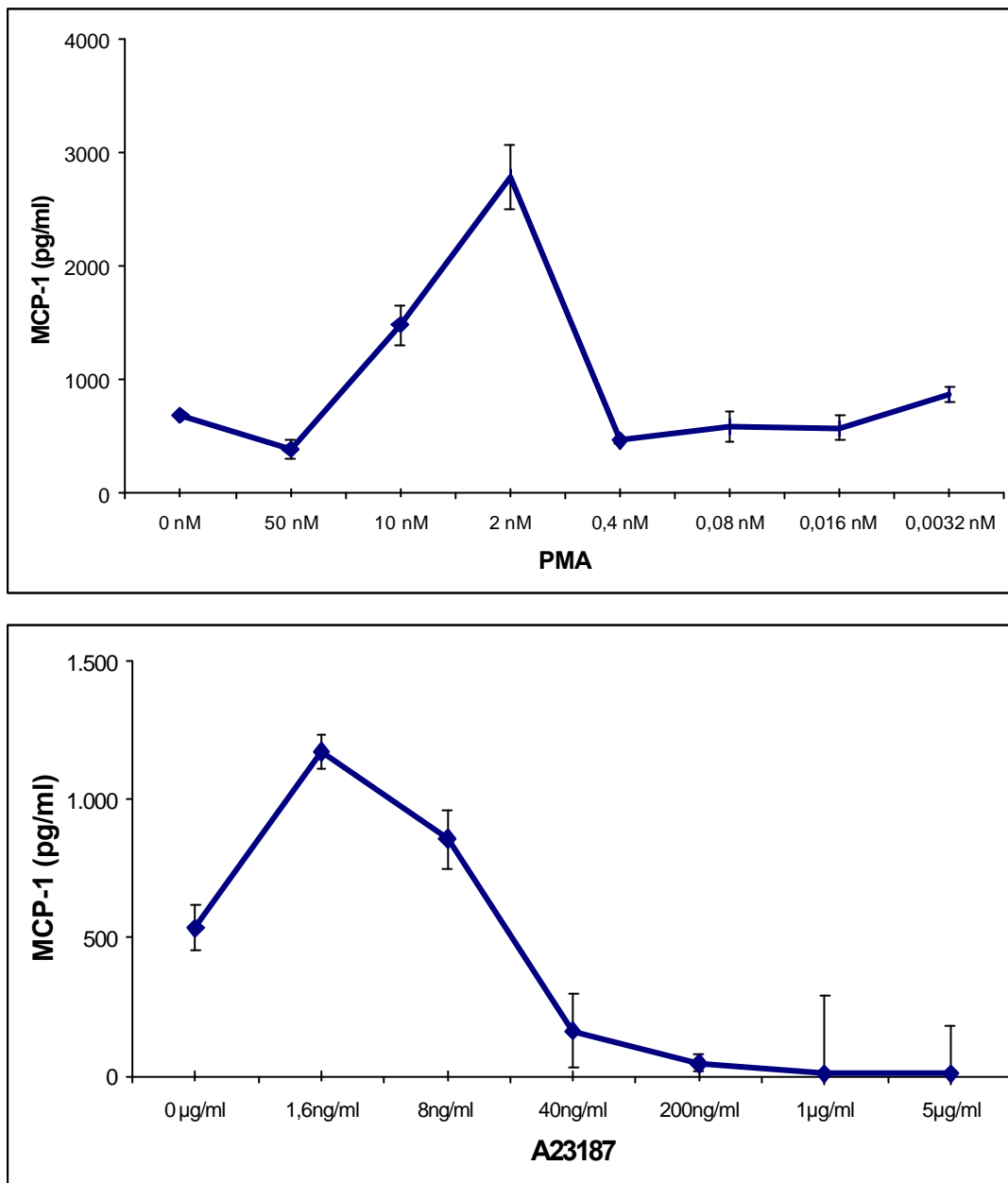
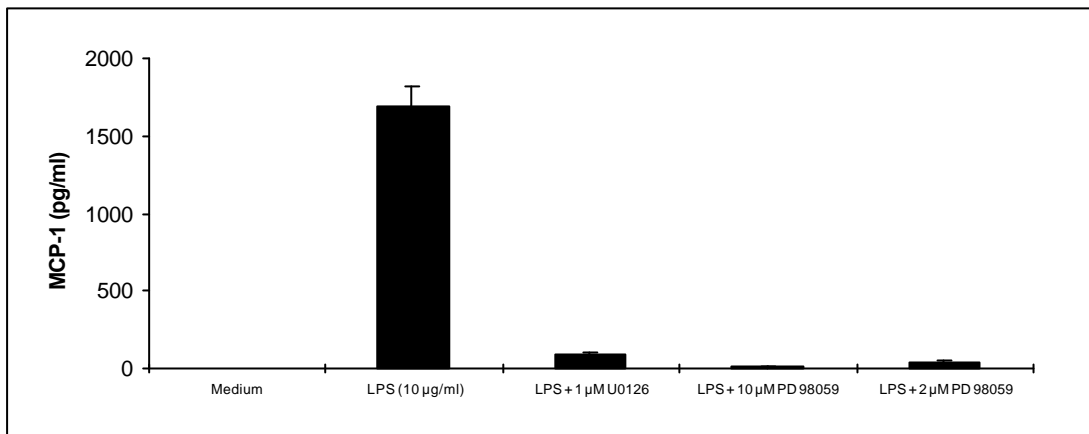


Abb. 43

Stimulation der MCP-1-Expression in primären PBMC Monozyten durch Phorbol Ester und Calciuminfux.

Humane primäre Monozyten wurden *ex vivo* aus dem venösen Blut gesunder Spender isoliert.  $3,5 \cdot 10^6$  - Zellen/Ansatz wurden mit dem Phorbol Ester PMA oder dem Calcium-Ionophor A23187 zur Expression von MCP-1 aktiviert. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurde die Konzentration von MCP-1 mittels ELISA bestimmt. Die Endkonzentrationen der Substanzen sind in der Grafik angegeben. Die höheren Konzentrationen von A23187 (200 ng/ml bis 5 µg/ml) hatten zytotoxische Effekte auf die Zellen. Die Ergebnisse wurden in weiteren Experimenten bestätigt.

Phorbol Ester und intracelluläre Calciumerhöhungen induzieren in primären humanen PBMC-Monozyten dosisabhängig MCP-1.

**Abb. 44****Modulation der LPS-induzierten MCP-1-Expression durch MEK-1/MEK-2-Inhibitoren**

$3,5 \cdot 10^6$  *ex vivo* isolierte Monozyten wurden für 24 Stunden kultiviert. Zur Induktion von MCP-1 wurde LPS verwendet. U0126 und PD 98059 sind MEK-1-/MEK-2- Inhibitoren.

Die Expression von MCP-1 durch Stimulation mit LPS ist in primären Monozyten von MEK-1/-2 abhängig.

#### 4. Induktion von IL-12p40 im Vergleich zu MCP-1

Die bisherigen Experimente haben die Mechanismen der Induktion und Modulation der MCP-1-Expression untersucht. Zur weiteren Charakterisierung der Bildung von MCP-1 interessierte die Frage, inwieweit es sich um selektive Mechanismen für MCP-1 handelt. Dazu wurde die Expression von IL-12p40 analysiert.

Thapsigargin ist, im Gegensatz zu MCP-1, nicht in der Lage die IL-12p40-Expression bei THP-1-Zellen oder frisch isolierten Monozyten zu aktivieren (s. Abb.45).

Ebenso konnte mit dem Phorbolster PMA keine signifikante IL-12p40 Expression induziert werden (s. Abb.46).



Die LPS- oder TG-induzierte MCP-1-Expression wurde durch eine Inaktivierung der ERK-1/ERK-2 MAPK über den MEK-1/MEK-2-Inhibitor U0126 nahezu völlig aufgehoben. Die Inhibition der p38 MAPK hatte keine entscheidenden Einfluß auf die MCP-Expression. Die Verwendung des MEK-1/MEK-2-Inhibitors konnte auch die LPS-induzierte IL-12p40 Expression reduzieren, obgleich die Effekte moderater waren (s. Abb. 47). Dies deutet auf eine Beteiligung von MEK-1/MEK-2 an der IL-12p40 Expression hin. Vergleichbar zur MCP-1-Expression hat die Inhibition der p38 MAPK durch SB203580 keinen großen Einfluß auf die IL-12p40 Expression (s. Abb. 47).

Die TG-induzierte MCP-1-Expression wurde durch die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und FK506 völlig blockiert, was auf eine absolute Abhängigkeit von Calcineurin hinweist. Im Vergleich dazu wird die LPS-induzierte IL-12p40 Expression durch Calcineurin-Inhibitoren nur um 30-50 % gehemmt (s. Abb. 48).

Ähnlich wie bei der MCP-1-Expression führt die Behandlung von THP-1-Zellen mit Gö 6976 zu einer Reduktion der IL-12p40-Expression, was auf eine Beteiligung der PKC $\alpha$ , PKC $\beta$  und/oder PKC $\mu$  hinweist (s. Abb 49).

Ebenfalls wie bei der MCP-1-Expression hatte der PKA-Inhibitor H89 einen geringen Einfluß auf die IL-12p40 Expression (Daten nicht gezeigt).

Vergleichbar zur MCP-1-Expression konnte die IL-12p40-Expression durch Dexamethason stark reduziert werden (Daten nicht gezeigt), was auf eine Beteiligung der Transkriptionsfaktorfamilie NF- $\kappa$ B hinweist. EMSA- und Supershift-Analysen konnten eine Bindung von NF- $\kappa$ Bp50 und NF- $\kappa$ Bp65 an eine proximale Region des IL-12p40 Promotors

---

<sup>193</sup> nachweisen (s. Abb. 40). Ebenso konnte die Bindung der AP-1-Mitglieder detektiert werden, die auch an die untersuchten Regionen des MCP-1-Promotors gebunden hatten (Daten nicht gezeigt).

Die Untersuchung der IL-12p40-Expression im Vergleich zur MCP-1-Expression hat ergeben, daß die Induktion von MCP-1 durch intrazelluläre Calciuserhöhungen oder Phorbol ester selektive Mechanismen für dieses Chemokin sind. Mit diesen Stimuli konnte kein IL-12p40 induziert werden. Auch konnte eine kritische Rolle von Calcineurin nur für die TG-induzierte MCP-1-Expression gefunden werden.

Neben diesen Unterschieden konnten Gemeinsamkeiten gezeigt werden. Bei IL-12p40 und MCP-1 tragen die MEK-1/MEK-2 und einige PKC-Mitglieder zur Genexpression bei. Darüber hinaus sind die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 an der Expression beteiligt.

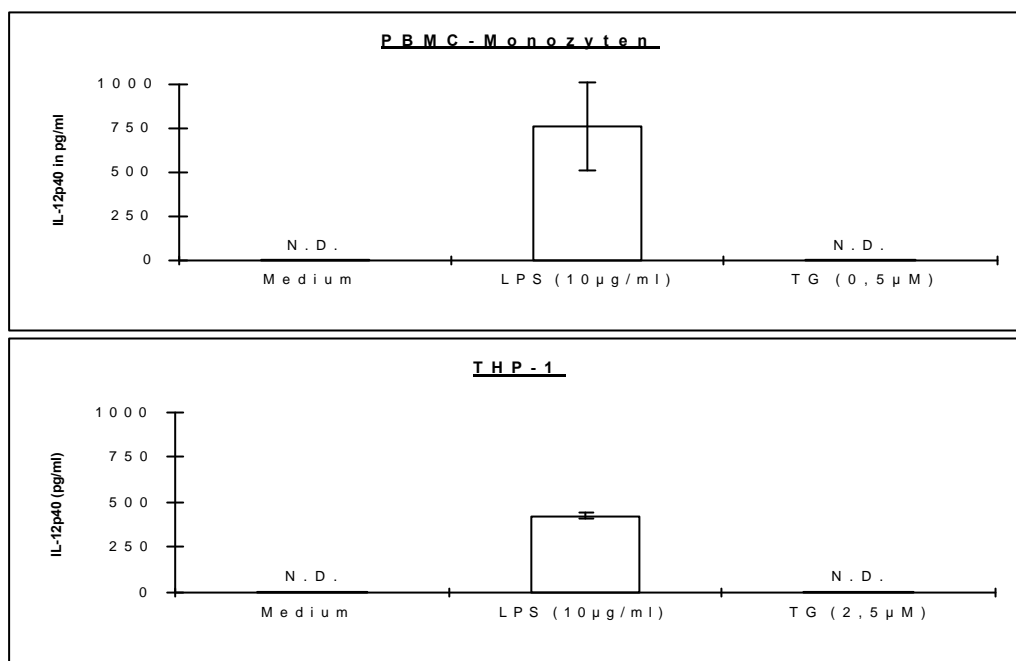


Abb. 45

Induktion von IL-12p40 bei THP-1-Zellen und PBMC-Monozyten nach Stimulation mit LPS und TG für 24 h.

Die Zellen wurden für 1 Tag wie beschrieben kultiviert. Anschließend wurde IL-12p40 mit einem ELISA bestimmt. Eine Induktion der IL-12p40 Expression konnte mit TG nicht detektiert werden.

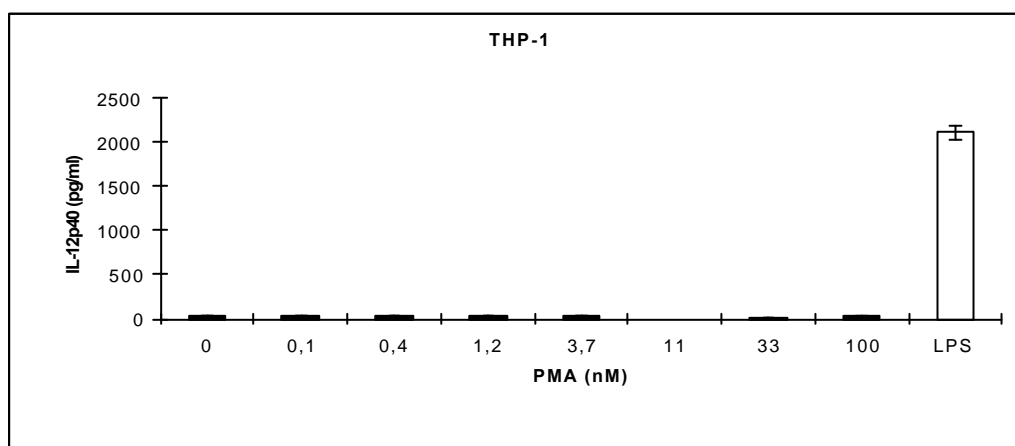
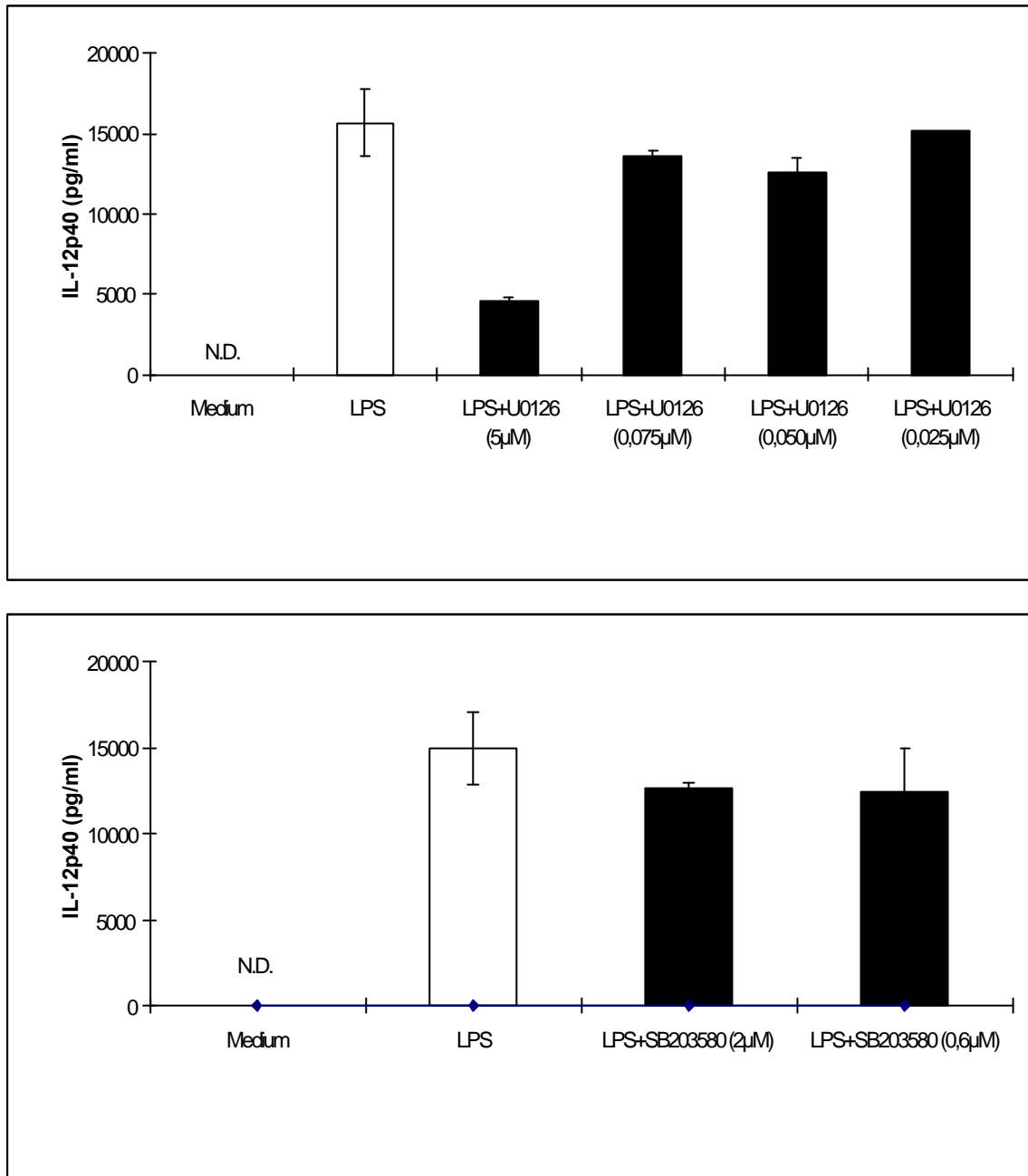


Abb. 46

Einfluß von PMA auf die Expression von IL-12p40 bei THP-1-Zellen.

$3 \cdot 10^5$  THP-1-Zellen/ Kavität für 24h kultiviert. Die Endkonzentration für LPS betrug 10µg/ml. IL-12p40 wurde mittels ELISA bestimmt.

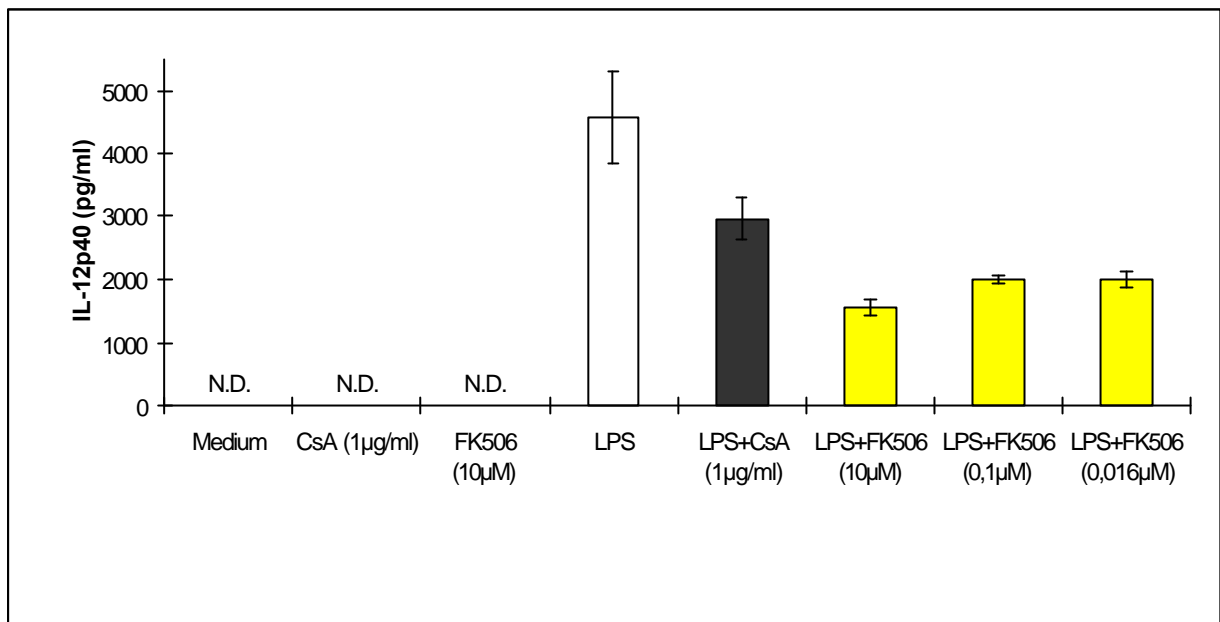
Eine Induktion der IL-12p40-Expression konnte mit dem Phorbolster PMA nicht detektiert werden.

**Abb. 47**

#### Rolle der MAPK bei der IL-12p40 Expression in THP-1-Zellen

$3 \cdot 10^5$  THP-1-Zellen wurden für 24h kultiviert. Die Endkonzentration für LPS betrug  $10 \mu\text{g/ml}$ . Als MEK-1/MEK-2 Inhibitor wurde die Substanz U0126 verwendet. Zur Inhibition der p38 MAPK wurde SB203580 eingesetzt. Der Zytokingehalt wurde mittels ELISA bestimmt.

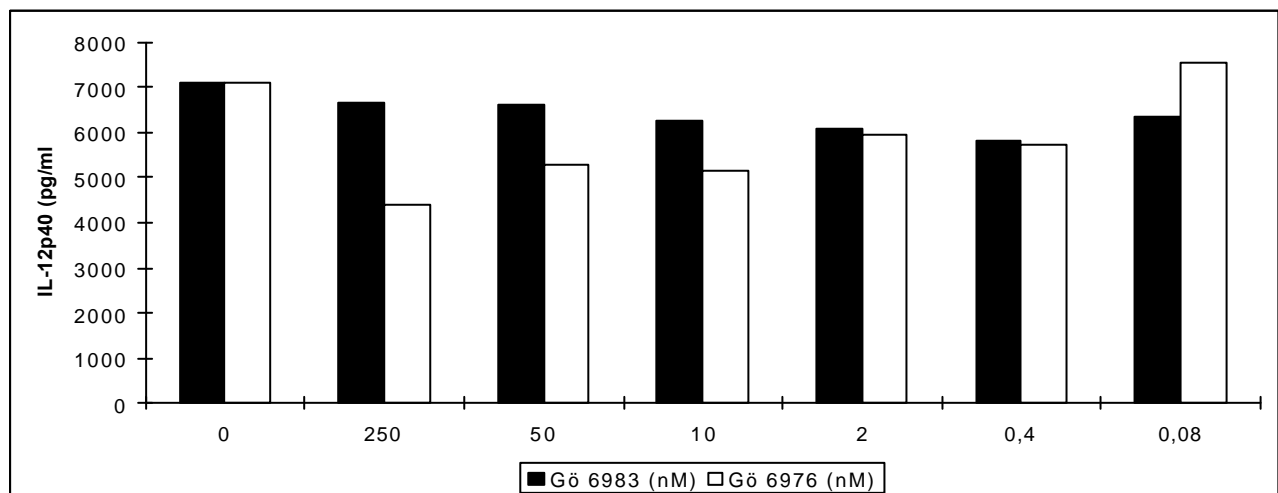
Die Inhibition der MEK-1/MEK-2 MAPKK reduziert die IL-12p40-Expression, was auf eine Beteiligung der ERK-1/ERK-2 MAPK hinweist. Die p38 MAPK scheinen bei der LPS-induzierten IL-p40-Expression keine bedeutende Rolle zu spielen.

**Abb. 48**

Beteiligung von Calcineurin an der IL-12p40-Expression in THP-1-Zellen

$3 \cdot 10^5$  THP-1-Zellen wurden für 24h kultiviert. Die Endkonzentration für LPS betrug  $10 \mu\text{g/ml}$ . Als Calcineurin-Inhibitoren wurden Cyclosporin A (CsA) und FK506 verwendet. IL-12p40 wurde mittels ELISA bestimmt.

Die Calcineurin-Inhibitoren CsA und FK506 führen zu einer mäßigen Reduktion der IL-12p40-Expression um 30 – 50 % .

**Abb. 49**

Rolle der PKC bei der IL-12p40 Expression in THP-1-Zellen.

$3 \cdot 10^5$  THP-1-Zellen wurden für 24h kultiviert. Die Endkonzentration für LPS betrug  $10 \mu\text{g/ml}$ . Als PKC-Inhibitoren unterschiedlicher Selektivität wurden die Substanzen Gö 6983 und Gö 6976 verwendet. IL-12p40 wurde mittels ELISA bestimmt.

Gö 6976, ein Inhibitor der PKC $\alpha$ , PKC $\beta$  und PKC $\mu$ , reduziert LPS-induziertes IL-12p40.

## IV. Diskussion

Monozyten und Makrophagen sind wichtige Effektorzellen der angeborenen Immunabwehr. Sie können eine Vielzahl von Krankheitserregern über PRRs erkennen und durch Phagozytose oder die Freisetzung toxischer chemischer Substanzen eliminieren<sup>6;8;26</sup>. Desweiteren können Monozyten/Makrophagen durch die Sekretion von Zytokinen wie IL-6 und IL-1 sowie Chemokinen wie MCP-1 inflammatorische Antworten induzieren. Das Krankheitsbild der "klinischen Immunparalyse" zeigt, daß eine Deaktivierung der Effektorfunktionen von Makrophagen zu lebensbedrohlichen Zuständen führt<sup>27</sup>. MCP-1 vermittelt Abwehrmechanismen des Immunsystems, indem es unter anderem Monozyten an den Ort der Infektion rekrutiert<sup>229;230</sup> und die Differenzierung von T-Lymphozyten reguliert<sup>49;61</sup>. Infolgedessen beeinflusst MCP-1 beispielweise den Verlauf von Infektionen mit *Leishmania major* oder *Schistosoma mansoni*<sup>49;59-61</sup>. Darüber hinaus wurde MCP-1 mit der Pathogenese chronisch-entzündlicher und allergischer Erkrankungen in Zusammenhang gebracht<sup>35;62-69</sup>. Obwohl auf der einen Seite MCP-1 entscheidende Funktionen in der Immunabwehr ausübt und auf der anderen Seite Monozyten/Makrophagen bedeutende immunologische Effektorzellen sind, wurde in der Vergangenheit die molekulare Regulation von MCP-1 in Monozyten/Makrophagen nicht umfassend untersucht.

Verschiedene experimentelle Arbeiten konnten zeigen, daß Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder IL-6, Phorbolster und LPS das Chemokin MCP-1 in anderen Zelltypen wie Fibroblasten und Endothelzellen induzieren können<sup>24</sup>. Darüber hinaus führt eine Überexpression von c-Jun und c-Fos in humanen Endothelzellen zur Bildung von MCP-1<sup>231</sup>. Analysen des MCP-1-

Promotors in Endothelzellen ergaben eine Kooperation zwischen NF- $\kappa$ B und AP-1, die an eine Region proximal zum Transkriptionsstart binden<sup>93</sup>.

Aufgrund der Bedeutung von MCP-1 und von Monozyten/Makrophagen für die angeborene Immunabwehr, stellte sich die Frage, welche Stimuli MCP-1 in Monozyten/Makrophagen induzieren, welche Signaltransduktionskaskaden und Transkriptionsfaktoren daran beteiligt sind, und an welche Promotorregionen diese Transkriptionsfaktoren binden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation von humanem MCP-1 in Monozyten/Makrophagen aus zwei Gründen in der myelomonozytären Zelllinie THP-1 als Modellsystem untersucht<sup>187;188</sup>. Erstens besitzt diese Zelllinie nicht den Nachteil der myelomonozytären Linien HL-60, ML-2, MONO-MAC6 und MUTZ-3, grössere Mengen an MCP-1 konstitutiv zu exprimieren<sup>34</sup>. Zweitens führte, vergleichbar mit der Expression in frisch isolierten Monozyten, eine Stimulation von THP-1-Zellen mit LPS zur Bildung von IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12 und MCP-1.

Zunächst wurde untersucht, welche Stimuli Monozyten/Makrophagen zur Bildung von MCP-1 aktivieren können. Dabei erwiesen sich LPS, Pansorbin, Sansorbin, PMA, A23187 und Thapsigargin als Substanzen, die dosisabhängig die Bildung des Chemokins induzieren.

Die Wirksamkeit von LPS wurde bereits 1989 beschrieben, als die Linie THP-1 zur Aufreinigung und Charakterisierung von MCP-1 eingesetzt wurde<sup>43</sup>. Die Eigenschaft von Monozyten/Makrophagen auf LPS mit der Bildung eines Chemokins zu reagieren, das für Monozyten/Makrophagen selbst chemotaktisch ist, ermöglicht den raschen Aufbau einer Abwehrreaktion der angeborenen Immunität.

Es ist bekannt, dass Gram-positive Bakterien und deren Bestandteile Monozyten/Makrophagen ebenfalls aktivieren. So können Staphylokokken die Bildung von

TNF- $\alpha$  in humanen Monozyten induzieren<sup>232</sup>. Desweiteren führt die Behandlung von Monozyten mit bestimmten Polysacchariden von *Staphylococcus aureus* zur Expression des CXC-Chemokins IL-8<sup>233</sup>. Auch THP-1-Zellen produzieren IL-8, wenn sie mit Exotoxinen von Staphylokokken stimuliert werden<sup>234</sup>. Jedoch ist eine Induktion von MCP-1 durch Bestandteile Gam-positiver Bakterien (Pansorbin und Sansorbin) bislang für Monozyten/Makrophagen nicht beschrieben worden (s. Kap. III.2.1).

Phorbolester wie TPA bzw. PMA sind geeignete Substanzen zur Induktion von MCP-1 in Zelltypen wie Glioblastomzellen und Endothelzellen<sup>92;225</sup>. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch in monozytären Zellen wie der Linie THP-1 eine dosisabhängige Induktion durch Phorbolester möglich ist. Demgegenüber wurde vor kurzem berichtet, dass eine Behandlung von THP-1-Zellen mit 10 nM PMA nur eine schwache Produktion von MCP-1 verursacht<sup>34</sup>. Diese Befunde widersprechen sich jedoch nicht, sondern bestätigen die eigenen Befunde, da eine Konzentration von 10 nM PMA im suboptimalen Dosisbereich für die MCP-1-Induktion liegt (s. Kap. III.2.1).

Einen bislang unerkannten bzw. neuen Weg zur Stimulation der MCP-1-Expression stellt die Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels dar (s. Kap. 2.1 und Kap. 3). Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration muss nicht zwangsläufig einen positiven Effekt auf die Zytokinexpression haben, wie an der Inhibition der Bildung von IL-12 deutlich wird. So können die Calcium-Ionophore Ionomycin und A23187 die LPS-induzierte Bildung von IL-12 in Knochenmarksmakrophagen hemmen<sup>235</sup>. Jedoch deutete der Befund, daß bei der Stimulation der MCP-1-Expression durch IL-6 in Fibroblasten ein Anstieg des intrazellulären Calciums beobachtet werden konnte, dessen positive Rolle für die MCP-1-Produktion an<sup>236</sup>. Tatsächlich konnten dosisabhängig sowohl A23187 als auch Thapsigargin die Bildung von MCP-1 in THP-1-Zellen induzieren (s. Kap.III.2.1).



Die Untersuchung stimulusspezifischer Kinasen und Phosphatasen, die bei der MCP-1-Expression eine Rolle spielen, hat ergeben, daß an einer Induktion durch LPS die Kinasen MEK1/2, PKCs, IKK $\alpha$ , CaMKs und die Phosphatase CaN beteiligt sind (s. Kap.IV., Abb.1).

Es war bekannt, daß die Stimulation mit LPS zur Aktivierung von ERK1/2, JNKs, p38 MAPKs, PKCs und IKKs in Monozyten/Makrophagen führt <sup>11;237;237-240</sup>. Da mehrere Berichte eine Genexpression von MCP-1 unter Mitwirkung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 nachweisen konnten, ist eine Beteiligung der MAPKs, PKCs und IKK $\alpha$  an der LPS-induzierten Bildung von MCP-1 kein unerwartetes Ergebnis <sup>93 231</sup>. Die starke Inhibition der MCP-1-Expression durch den Inhibitor von MEK-1/2 und die schwachen Effekte des p38 MAPK $\alpha/\beta$ -Inhibitors SB203580 weisen darauf hin, daß ERK1 bzw. ERK-2 für die Bildung von MCP-1 erforderlich sind. Dem steht der Befund entgegen, daß die TNF- $\alpha$ -induzierte MCP-1-Expression in Endothelzellen von der MKK6/p38 MAPK-Kaskade abhängig ist <sup>241</sup>. Dabei ist allerdings zu bedenken, daß bei diesen Experimenten die verwendeten p38 MAPK-Inhibitoren (SB203580, SB202190) in einer Konzentration (20  $\mu$ M) eingesetzt worden sind, bei denen sie zusätzlich weitere Kinasen hemmen. Es ist auch zu berücksichtigen, daß TNF- $\alpha$  als Stimulus andere Signaltransduktionskaskaden aktiviert als LPS. So wurde ein Modell vorgeschlagen, in welchem TNF- $\alpha$  TRAF2 oder TRAF5 aktiviert, die über ASK (s. Abb.2 der Einleitung) p38 MAPKs und JNKs aktivieren kann <sup>242</sup>. LPS kann nach diesem Modell TRAF6 über TLR4 aktivieren, was über ECSIT und MEKK1 eine Aktivierung der ERKs und JNKs ermöglicht (s. Abb.1 und Abb.2 der Einleitung). Es ist somit vorstellbar, daß die Signaltransduktion von TNF- $\alpha$  auf die p38 MAPKs hinausläuft, wohingegen sie bei einer LPS-Stimulation auch über die ERKs verlaufen kann. Daneben muß berücksichtigt werden, daß der Zelltyp Einfluß auf die Signaltransduktionsabläufe hat.

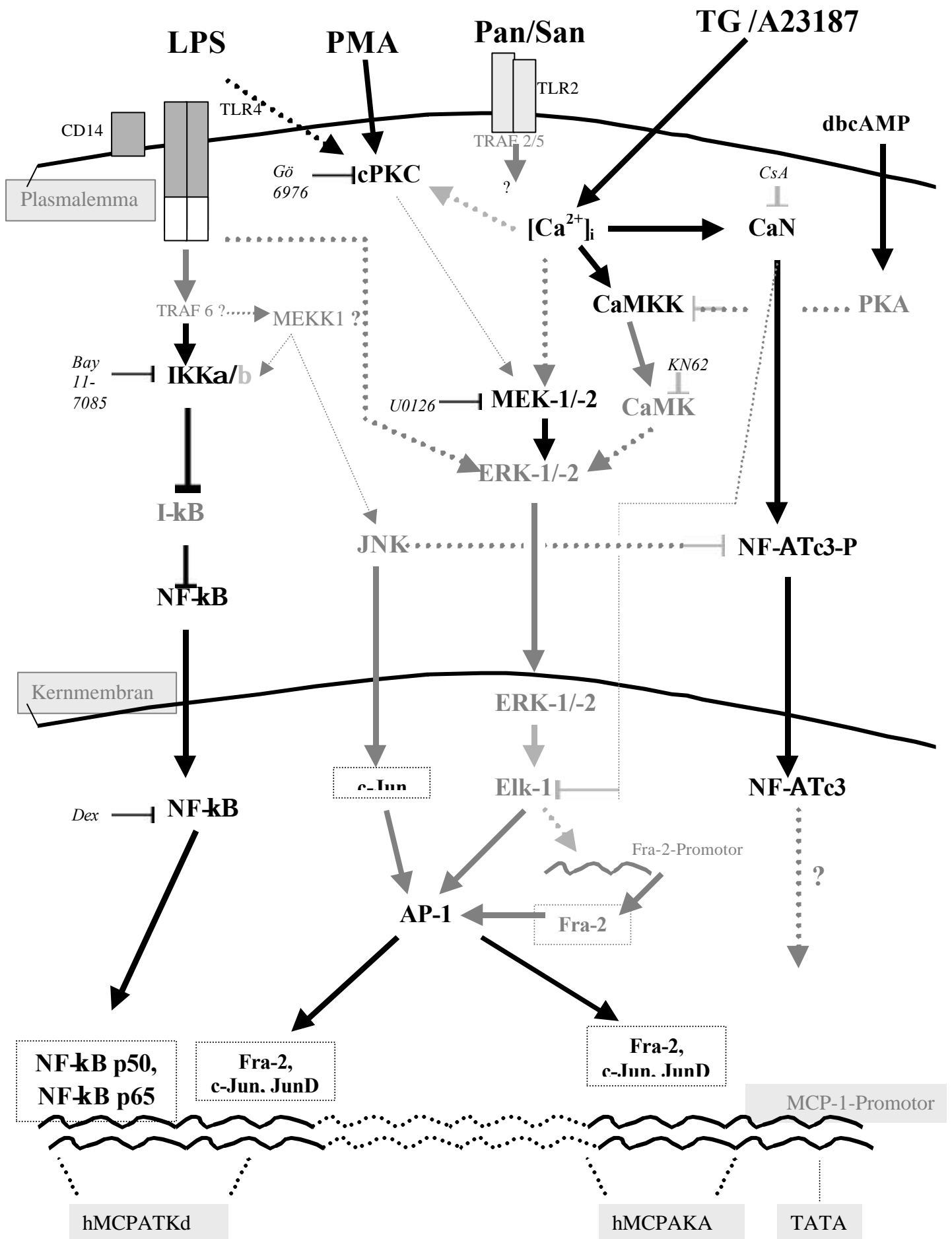


Abb. 1

## Abb.1

## Modell der MCP-1-Expression in THP-1-Zellen.

Dargestellt sind alle wirksamen Stimuli und die Signaltransduktionskaskaden für LPS und TG. Nachgewiesene Teile der Signaltransduktion bei der MCP-1-Expression sind schwarz dargestellt. Zusätzlich sind diskutierte Möglichkeiten mit grauer Farbgebung gekennzeichnet. Erläuterungen siehe Text.

---

CaMKs und CaN benötigen Calcium bzw. Calcium-Calmodulin-Komplexe für ihre Aktivierung. Die Behandlung von THP-1-Zellen mit LPS führte zu keiner unmittelbare detektierbaren intrazellulären Calciumerhöhung. Dieses Ergebnis für LPS-stimulierte THP-1-Zellen wird durch Befunde anderer Arbeitsgruppen unterstützt <sup>243</sup>. Da LPS in THP-1-Zellen IL-6 induziert (s. Kap. 1.1), welches über den IL-6R einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration bewirken kann <sup>236</sup>, ist die Aktivierung der CaMK und von CaN möglicherweise die Folge der autokrinen Wirkung von gebildetem IL-6. Für CaMKs sind verschiedene Substrate beschrieben worden. Da ERKs an der MCP-1-Expression beteiligt sind, tragen CaMKs möglicherweise über die für CaMKIV beschriebene Phosphorylierung von Rap-1b <sup>158</sup> zur ERK-Aktivierung bei, die eine kritische Rolle für die Bildung von MCP-1 spielt. Es wurde spekuliert, daß nach dieser Phosphorylierung von Rap-1b die ERKs über eine Interaktion von Rap-1b mit B-Raf aktiviert werden <sup>244</sup>. Tatsächlich gibt es Hinweise darauf, daß in Monozyten CaMKII und IV ERK MAPKs aktivieren können <sup>245</sup>.

Ein Substrat für Calcineurin ist NF-AT. Eine Beteiligung von NF-AT an der MCP-1-Bildung ist bislang nicht beschrieben worden. Neben NF-AT ist Elk-1 ein weiteres Substrat von Calcineurin <sup>147</sup>. Die AP-1-Mitglieder c-Fos und Fra-2 enthalten SREs in ihrem Promotor, an die Elk-1 zusammen mit SRFs bindet <sup>211;246</sup> und somit zur Transkription dieser AP-1-Gene beitragen kann. Eine Dephosphorylierung von Elk-1 durch Calcineurin verhindert diese Art der Induktion von AP-1-Mitgliedern, was sich auf die AP-1-abhängige MCP-1-Expression negativ auswirken würde. Da eine Inhibition von Calcineurin durch CsA zu keinem

detektierbaren Anstieg von AP-1 in Kernextrakten führte (s. Kap. 2.3, Abb. 34), scheint die Dephosphorylierung von Elk-1 durch Calcineurin keine entscheidende Rolle bei der LPS-induzierten MCP-1-Expression zu spielen.

Inhibitoren für CaMKs und CaN hemmen die LPS-induzierte MCP-1-Bildung nicht in dem Maße wie die Thapsigargin-induzierte Chemokinproduktion, was darauf hindeutet, daß diese Enzyme für die Induktion durch LPS von geringerer Bedeutung sind.

Als stimulusspezifische Kinasen und Phosphatasen, die an der Bildung von MCP-1 bei einer Behandlung mit Thapsigargin beteiligt sind, konnten die gleichen Enzyme identifiziert werden, die bei der LPS-induzierten MCP-1-Expression eine Rolle spielen. Jedoch führt die Stimulation mit Thapsigargin primär zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels, wohingegen LPS bestenfalls eine sekundäre Calciumerhöhung über autokrine Mechanismen induzieren kann. Daß durch eine Behandlung mit Thapsigargin hauptsächlich calcium-abhängige Enzyme wie CaN, CaMKs und cPKCs aktiviert werden und zur MCP-1-Bildung beitragen, wird an den drastischeren Effekten entsprechender Inhibitoren (CsA, KN62, Gö 6976) deutlich. Darüber hinaus weist die Inhibition der MCP-1-Expression durch U0126 darauf hin, daß MEK1/2 und ERK1/2 für die MCP-1-Chemokinproduktion benötigt werden. Da CaMKs über "Cross-Talk" den ERK-Pfad der MAPKs aktivieren können<sup>158;244;245</sup>, ist eine ERK-Aktivität bei einer Stimulation mit TG nicht unerwartet.

Die MCP-1-induzierende Signaltransduktion nach Stimulation mit PMA wurde weniger intensiv untersucht. Die Chemokin-Expression war von PKCs, ERK1/2 und IKKs bzw. NF- $\kappa$ B abhängig. Die Aktivierung dieser Enzyme kann durch mehrere Befunde erklärt werden. Erstens aktivieren Phorbolster wie PMA PKCs<sup>247</sup>. Zweitens können PKCs die MEK-ERK-Kaskade aktivieren<sup>122</sup>. Da außerdem eine Aktivierung von IKK $\alpha/\beta$  durch cPKCs und aPKCs

---

bekannt ist <sup>120;121</sup>, sind diese Signaltransduktionswege für die PMA-induzierte MCP-1-Expression nicht ausgeschlossen werden.

Die Untersuchung von Transkriptionsfaktoren, die im Zusammenhang mit der MCP-1-Bildung beschrieben worden sind, hat ergeben, daß NF- $\kappa$ B und AP-1, die zur MCP-1-Expression in Fibroblasten und Glioblastomzellen beitragen, auch bei Monozyten und für die drei eingesetzten Stimuli (LPS, TG, PMA) eine Rolle spielen. Zwar vermitteln IKKs, PKCs und ERKs die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren bei allen drei Stimuli, jedoch gibt es Hinweise, daß dabei unterschiedliche Signaltransduktionswege und "Cross-Talk" zwischen diesen genutzt werden (s.o.). Ein neues Licht auf die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren werfen neuere Berichte. Es konnte für zwei verschiedene Zelltypen, B-Lymphozyten und T-Zellen, eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B und NF-AT in Abhängigkeit der Stärke und Frequenz der intrazellulären Calciuserhöhung <sup>170;171</sup>. Dabei wurde in einem Teil der Experimente TG verwendet. Diese Resultate unterstützen die eigenen EMSA- und Supershift-Analysen, die eine nukleäre Translokation von NF- $\kappa$ B p50, NF- $\kappa$ B p65 und NF-ATc3 bei Stimulation mit Thapsigargin nachwies. Zusätzlich zeigen diese Ergebnisse, daß diese Aktivierung von NF- $\kappa$ B und NF-AT durch Calcium auch in dem Zelltyp des Monozyten/Makrophagen möglich ist. Interessant ist ebenfalls, daß eine Erhöhung des intrazellulären Calciums in B-Lymphozyten JNK und seine Substrate aktiviert <sup>170</sup>. Substrate für JNK sind unter anderem c-Jun und ATF2. Tatsächlich haben die EMSA- und Supershift-Analysen in Kernextrakten c-Jun nachgewiesen. Zusammengenommen lassen diese Berichte und die Befunde den Schluß zu, daß die Stimulation von THP-1-Zellen mit TG zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B, NF-ATc3 und AP-1 führt, die bei einer Induktion der MCP-1-Expression nachgewiesen wurde.

In Bezug auf die nachgewiesenen einzelnen Mitglieder von NF- $\kappa$ B und AP-1 überrascht die fehlende Detektion von c-Rel. Da bei Stimulation mit LPS sowohl p50/p65- als auch c-

Rel/p65-Dimere in THP-1-Zellen gebildet werden <sup>214</sup> und eigene RT-PCR Experimente c-Rel (Daten nicht gezeigt) nachweisen konnten, deutet dies entweder auf ein Detektionsproblem oder eine geringe Expression von c-Rel hin. Als AP-1-Mitglieder wurden c-Jun, JunD und Fra-2 nachgewiesen. Heterodimere aus Fra-2/JunD und aus Fra-2/c-Jun sind transkriptionell aktiv, jedoch wirken c-Jun-Homodimere stärker transaktivierend <sup>246;248</sup>. EMSAs haben gezeigt, daß AP-1 schon bei einer Kultivierung von THP-1-Zellen in Kulturmedium in großen Mengen in Kernextrakten nachweisbar ist (s. Kap. 2.3, Abb.34, "Medium"). Dieser Befund könnte auf Effekte durch das Serum zurückzuführen sein. Dafür spricht das SRE im Promotor von Fra-2 und die vergleichsweise geringeren AP-1-Mengen in Parallel-Ansätzen ohne frisches Serum (s. Kap. III.2.3, Abb.34, "starved"). Darüber hinaus wurde für das Gen von JunD eine hohe basale Aktivität aufgrund der Bindung von Octamer-Binde-Proteinen wie Oct1 und Oct2 an den Promotor nachgewiesen <sup>249</sup>. Sowohl in unstimulierten als auch in behandelten THP-1-Zellen konnten diese Transkriptionsfaktoren in deutlichen Mengen detektiert werden, was die JunD-Expression in unbehandelten THP-1-Zellen erklären könnte. Bei der TG-induzierten MCP-1-Expression gibt es Hinweise, daß ein weiterer Transkriptionsfaktor eine Rolle spielt. So führte die Stimulation mit Thapsigargin zu einem deutlichen Anstieg von nukleärem NF-ATc3, welches bei zusätzlicher Behandlung mit dem Calcineurin-Inhibitor CsA drastisch reduziert wurde. Dies deutet an, daß für die MCP-1-Expression durch Thapsigargin NF-ATc3 benötigt wird. In Übereinstimmung mit anderen experimentellen Arbeiten wird NF-ATc3 in Monozyten/Makrophagen exprimiert <sup>250</sup>. Darüber hinaus wurde - wie bei den eigenen Experimenten - ebenfalls eine basale bzw. konstitutive nukleäre Lokalisation von NF-ATc3 für diesen Zelltyp beobachtet. Bislang wurde eine Beteiligung von NF-ATc3 an der MCP-1-Expression in Monozyten/Makrophagen nicht beschrieben. Die kritische Rolle von NF-ATc3 bei einer TG-induzierten MCP-1-Expression beruht möglicherweise darauf, daß im Gegensatz zur LPS-Stimulation nur ungenügende Mengen an aktiven nukleären AP-1- und NF- $\kappa$ B-Mitgliedern verfügbar sind. Diese

Spekulation wird durch die Befunde unterstützt, daß die Kernextrakte TG-behandelter THP-1-Zellen geringere Mengen an AP-1 und NF- $\kappa$ B aufweisen. Infolgedessen würde NF-ATc3 für synergistische und kooperative Interaktionen mit AP-1<sup>137;142</sup> benötigt, um dieses Defizit auszugleichen. Erwähnenswert in Bezug auf NF-ATc3 ist die Beobachtung, daß die zusätzliche Gabe von LPS zu TG die NF-ATc3-Mengen in Kernextrakten reduziert (Daten nicht gezeigt). Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß MEKK1 und JNK den Transkriptionsfaktor NF-ATc3 phosphorylieren, was zum nukleären Export und zur cytoplasmatischen Retention führt<sup>143;144</sup>. Da LPS diese Enzyme aktivieren kann, ist dieser Mechanismus vorstellbar und unterstreicht die untergeordnete Rolle von NF-ATc3 bei der LPS-induzierten MCP-1-Expression.

Eine weitere Klasse von Transkriptionsfaktoren, die an der MCP-1-Bildung beteiligt sind, repräsentiert die SP-1-Familie<sup>224;251</sup>. In Übereinstimmung mit dem Befund, daß Sp-1 für die MCP-1-Expression erforderlich ist und mit NF- $\kappa$ B kooperiert, wurden auch bei THP-1-Zellen konstitutiv exprimierte Sp-1 Mitglieder detektiert werden.

Bei der Untersuchung der an der MCP-1-Expression beteiligten Signaltransduktionswege und Transkriptionsfaktoren wurde ein negativer Einfluß von cAMP auf die MCP-1-Expression detektiert. Es ist nicht klar, welche der beschriebenen Möglichkeiten des negativen "Cross-Talk" zutreffen. Beispielsweise kann cAMP eine inhibitorische Phosphorylierung von NF-AT induzieren<sup>146</sup> und über CBP die NF-AT-abhängige Transkription hemmen<sup>145</sup>. Diese Mechanismen würden jedoch nur für die TG-induzierte MCP-1-Bildung in Frage kommen, da nur bei dieser Induktion ein NF-AT-Mitglied eine kritische Rolle spielt. Darüber hinaus kann die cAMP-abhängige PKA die CaMKs inhibieren<sup>160;161</sup>. Auch dieser "Cross-Talk" würde eher bei der TG-induzierten MCP-1-Expression eine Rolle spielen, da hier die CaMK von größerer Bedeutung sind. Interessanterweise kann cAMP auch die Genexpression von IL-12p40 inhibieren (s. Kap. 4 und<sup>252;253</sup>).

Nachdem die Beteiligung von Stimulus-spezifischen Signaltransduktionskaskaden und die Rolle der Transkriptionsfaktoren untersucht worden war, interessierte, an welche involvierte Regionen des MCP-1-Promotors diese Transkriptionsfaktoren binden. Da NF-AT, AP-1 und NF- $\kappa$ B eine entscheidende Rolle spielen, wurden von den verschiedenen ausgewählten Promotorbereichen zwei Regionen intensiver untersucht, die die entsprechenden potentiellen Bindungsstellen besaßen.

Die distale Region hMCPATKd weist eine potentielle Bindungsstelle für NF- $\kappa$ B und NF-AT auf. Jedoch konnte *in vitro* keine Bindung von NF-AT an diese Region nachgewiesen werden, dafür aber Komplexe mit AP-1 und NF- $\kappa$ B. Diese Region ist bislang nicht auf eine Funktion bei der humanen MCP-1-Expression untersucht worden. Interessanterweise gibt es eine homologe Region im murinen MCP-1-Promotor, das sog "Element I" <sup>254</sup>. Die NF- $\kappa$ B-Binderegion von 10 Nukleotiden ist dabei identisch zur humanen Promotorregion, jedoch treten in den flankierenden Bereichen und insbesondere in den Bereichen für die AP-1-Bindung Mutationen auf. Punktmutations-Experimente für die humane Promotorregion konnten tatsächlich die Bindung von AP-1 beeinflussen. Das murine "Element I" konnte wie die homologe humane hMCPATKd-Region NF- $\kappa$ B p50 und NF- $\kappa$ B p65 binden. Das "Element I" trägt zur PDGF-induzierten MCP-1-Bildung bei <sup>254;255</sup>. Da hMCPATKd neben NF- $\kappa$ B auch AP-1 binden kann, ergibt sich die Möglichkeit synergistischer Beeinflussungen der MCP-1-Transkription. Es stellt sich die Frage, ob dadurch dieser bislang unerkannten Region eine zusätzliche funktionelle Bedeutung bei der humanen MCP-1-Expression zukommt. Der dramatische Abfall der Reportergen-Aktivität bei Verkürzung des 3,8 kb langen Promotorkonstrukts auf die proximalen 900 bp beweist die entscheidende Rolle distaler Regionen bei der MCP-1-Bildung <sup>251</sup>. Diese Arbeitsgruppe hat distale Regionen ("A2" und "A1") ausgewählt und analysiert, die ca. 150 Basenpaare von der Region



hMCPATKd entfernt sind. Beide Regionen konnten NF- $\kappa$ B-Mitglieder binden und wirkten kooperativ zusammen<sup>251;256</sup>. Leider enthielten die Reporterengenkonstrukte nicht den Promotorbereich hMCPATKd, der AP-1 und NF- $\kappa$ B binden konnte. Es ist jedoch vorstellbar, daß diese Region wie die benachbarten Regionen "A1" und "A2" kooperativ an der MCP-1-Expression mitwirkt.

Ein weiterer Promotorbereich (hMCPAKA), der auch eingehender untersucht wurde, befindet sich nahe am Transkriptionsstart und besitzt potentielle Bindungsstellen für AP-1 und NF- $\kappa$ B. Es konnten *in vitro* jedoch keine NF- $\kappa$ B-Komplexe detektiert werden; jedoch war AP-1 nachweisbar. Für diese Promotorregion gibt es unterschiedliche teilweise widersprüchliche, Ergebnisse hinsichtlich der Bedeutung für die Expression und der Bindung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- $\kappa$ B<sup>92;93;251</sup>. Dabei ist zu beachten, daß unterschiedliche Zelltypen, Stimulationsbedingungen und Reporterkonstrukte verwendet wurden. Im Detail konnte für die MCP-1-Bildung in Glioblastomzellen keine Bedeutung der Bindungsregion von NF- $\kappa$ B nachgewiesen werden<sup>92</sup>. Dies wurde durch entsprechende Punktmutationen der Reporterengenkonstrukte und Stimulation mit LPS und PMA untersucht. Es ist jedoch kritisch zu erwähnen, daß bei diesen Zellen mit LPS prinzipiell kein MCP-1 induziert werden kann. Es ist weder gezeigt worden, daß LPS zwar NF- $\kappa$ B-Mitglieder aktivieren kann, diese aber nicht an die proximale Region binden, noch ist ausgeschlossen worden, daß LPS diese Transkriptionsfaktoren (aufgrund von mangelnder TLR4-Expression oder Signaltransduktionsdefekte) bei diesem Zelltyp grundsätzlich nicht aktivieren kann. Darüber hinaus ist die Verwendung von Phorbolestern zur Evaluierung der proximalen NF- $\kappa$ B-Bindungsstellen eher ungeeignet, da hierdurch primär AP-1-Mitglieder aktiviert werden und der Effekt auf NF- $\kappa$ B eher zweitrangig ist. In einer anderen Arbeit wurden Endothelzellen mit IL-1 stimuliert<sup>93</sup>. Reporterengen-Studien konnten zeigen, daß diese proximale Promotorregion

sowohl für die AP-1- als auch für die NF- $\kappa$ B-abhängige MCP-1-Expression entscheidend ist. Andere experimentelle Befunde lassen die Bedeutung jener proximalen Bindungsstelle für eine Transaktivierung durch NF- $\kappa$ B in einem anderen Licht erscheinen<sup>251</sup>. Die Verwendung von Reporter-gen-Konstrukten ergab, daß distale MCP-1-Promotorregionen, die Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B aufweisen, die Expression um ein Vielfaches über das Niveau von Reporter-gen-Konstrukten steigern konnten, die nur die proximale Promotorregion enthalten. Angesichts dieser experimentellen Daten kann nicht klar entschieden werden, welche Bedeutung die proximale Promotorregion hMCPAKA für die NF- $\kappa$ B-abhängige MCP-1-Expression in monozytären THP-1-Zellen hat.

Mit "Decoy"-Experimenten wurde versucht, die Bedeutung der distalen hMCPATKd- und der proximalen hMCPAKA-Region zu analysieren. Bei dieser Methode werden die Zellen mit Oligonukleotiden behandelt. Leider zeigten sowohl einige der Kontrolloligonukleotide als auch einige Oligonukleotide für die entsprechenden Promotorregion hMCPATKd zum Teil sehr dramatische immunstimulatorische Effekte (s. III. Kap. 2.4, Abb. 41 und Abb. 42). Deshalb konnte dieser experimentelle Ansatz nicht weiter verfolgt werden. Vielleicht kann dieses unerwartete Ergebnis ein neues Licht auf die MCP-1-Expression werfen. So aktivieren immunstimulatorische Oligonukleotide die MKK4, JNKs und c-Jun<sup>257</sup>. Möglicherweise kann nicht nur über eine Aktivierung von MEK1/2, sondern auch über MKK4 die Bildung von MCP-1 gesteigert werden.

Die Erkenntnisse der Signaltransduktion zur Induktion von MCP-1 wurde abschließend mit der molekularen Regulation der p40-Kette von IL-12 verglichen (s. Kap. III.4). Anhand verschiedener Befunde wird deutlich, daß die MCP-1-Expression über Mechanismen reguliert wird, die sich gegen die IL-12p40 Bildung abgrenzen lassen :

Erhöhungen der intrazellulären Calciumkonzentration induzieren MCP-1, aber nicht IL-12p40. Zusätzlich sind für die MCP-1-Expression Synergismen bei einer Kombination von

LPS und TG erkennbar. Im Gegensatz dazu inhibieren Calcium-Ionophore oder TG die IL-12p40-Produktion (Daten nicht gezeigt).

Phorbolster können zwar MCP-1, aber kein IL-12p40 induzieren. Anders als bei der MCP-1-Expression kann die Bildung von IL-12p40 durch MEK1/2-Inhibitoren nur beeinflusst, aber nicht völlig blockiert werden.

Dem Chemokin MCP-1 und dem Zytokin IL-12p40 ist jedoch gemeinsam, daß beide durch NF- $\kappa$ B-Inhibitoren wie Dexamethason gehemmt werden können und an die Promotoren beider Gene NF- $\kappa$ B binden kann (s., Kap. III.2.4, Abb. 40).

Das Chemokin MCP-1 kann in Monozyten/Makrophagen durch verschiedenste Stimuli induziert werden, die unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden aktivieren. Als neuartig beschriebener Weg zur Induktion von MCP-1 können Substanzen eingesetzt werden, die die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöhen. Dabei spielt NF-ATc3 eine bedeutende Rolle, was bislang für die MCP-1-Expression, insbesondere bei Monozyten/Makrophagen, noch nicht beschrieben worden ist. Eine bislang nicht berücksichtigte distale Promotorregion (hMCPATKd) kann NF- $\kappa$ B und AP-1 binden. Der murine MCP-1-Promotor enthält eine teilweise homologe Region, die bereits beschrieben wurde<sup>254</sup>. Im Gegensatz zu Endothelzellen bindet in THP-1-Zellen kein NF- $\kappa$ B an die proximale Promotorregion (hMCPAKA).

Die vorliegende Arbeit macht deutlich, daß die MCP-1-Expression in Monozyten/Makrophagen zum Teil durch Mechanismen reguliert wird, die auch für andere Zelltypen beschrieben wurden. Darüber hinaus konnten neue Mechanismen entdeckt werden.

## V. Zusammenfassung

Fibroblasten und andere Zelltypen können das CC-Chemokin "Monocyte Chemoattractant Protein-1" (MCP-1) bilden, das bei der Pathogenese inflammatorischer Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Makrophagen und ihre Vorläuferzellen Monozyten sind zentrale Effektorzellen der angeborenen Immunabwehr und zur Expression von MCP-1 fähig. In der vorliegenden Arbeit sollte die Induktion und die Signaltransduktion, die zur Bildung von MCP-1 führt, für den monozytären Zelltyp untersucht werden.

Zunächst wurde überprüft, ob die myelomonozytäre Zelllinie THP-1 hinsichtlich der Bildung von TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p40 und MCP-1 als Aktivierungsparameter mit *ex vivo* isolierten Monozyten vergleichbar ist. Tatsächlich konnte LPS die Bildung dieser Zytokine und des Chemokins in THP-1-Zellen und Monozyten aus PBMC in ähnlicher Weise induzieren.

Anschließend interessierte, welche Stimuli MCP-1 in Monozyten/Makrophagen induzieren können. Die Behandlung von THP-1-Zellen mit Bestandteilen Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien sowie mit dem Phorbol-ester PMA führte zur dosisabhängigen Bildung von MCP-1. Ein überraschender, neuartiger Befund bestand darin, daß Substanzen wie der Ca<sup>2+</sup>-ATPase-Inhibitor Thapsigargin (TG) und das Calcium-Ionophor A23187, die die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöhen, MCP-1 induzieren können. Im Vergleich zur eingeschränkten Induzierbarkeit der MCP-1-Expression beispielsweise bei Glioblastomzellen, die nach einer Stimulation mit LPS kein MCP-1 bilden, können Monozyten und Makrophagen durch viele Stimuli zur Expression von MCP-1 aktiviert werden.

Nachdem wirksame MCP-1-Induktoren gefunden worden waren, wurde im weiteren Verlauf untersucht, welche Kinasen und Phosphatasen an den Signaltransduktionsprozessen beteiligt

sind, die zur MCP-1-Expression in Monozyten und Makrophagen führen. Die Induktion von MCP-1 durch LPS, PMA und TG konnte durch den MEK-1/MEK-2-Inhibitor U0126 blockiert werden, was auf eine bedeutende Rolle von MEK-1/MEK-2 und ERK-1/ERK-2 bei der Expression von MCP-1 hinweist. Im Vergleich dazu hatte die Hemmung der p38 MAPK durch die Substanz SB203580 keinen entscheidenden Einfluß auf die Produktion von MCP-1. Die Inhibition der „conventional“(c) PKCs durch die Substanz Gö 6976 reduzierte im moderaten Umfang die Bildung von MCP-1, was auf eine Beteiligung der cPKCs an der Induktion von MCP-1 durch LPS, PMA und TG hinweist. Eine Hemmung der calcium-abhängigen Phosphatase Calcineurin und der calciumabhängigen CaMKKs durch pharmakologische Inhibitoren reduzierte die TG-induzierte MCP-1-Expression viel stärker als die durch LPS oder die PMA induzierte MCP-1-Bildung.

Die Identifizierung wirksamer Stimuli zur Induktion von MCP-1 und der daran beteiligten Phosphatase und Kinasen wies auf Transkriptionsfaktoren hin, die eine Rolle bei der MCP-1-Expression spielen könnten. Tatsächlich induzierten LPS und TG die nukleäre Translokation der NF- $\kappa$ B-Mitglieder p50 und p65. Die Hemmung der Bildung von MCP-1 bei einer Stimulation mit LPS oder TG durch einen Inhibitor für die IKK $\alpha$  (Bay117085) und den NF- $\kappa$ B-Inhibitor Dexamethason weist auf die Bedeutung dieser Transkriptionsfaktoren hin. Die AP-1-Mitglieder Fra-2, c-Jun und JunD waren ohne Stimulation mit LPS oder TG in beträchtlichen Mengen in Kernextrakten lokalisiert. Die nukleäre Translokation von NF-ATc3 konnte bei der Stimulation mit TG induziert und durch zusätzliche Behandlung mit CsA inhibiert werden. Darüber hinaus blockierte CsA nur die TG-induzierte MCP-1-Bildung nahezu vollkommen. Insgesamt sprechen diese Befunde für eine entscheidende Beteiligung von NF-ATc3 an der TG-induzierten MCP-1-Expression.

Nachdem für die MCP-1-Expression in Monozyten und Makrophagen sowohl wirksame Stimuli, als auch die dazugehörigen Signaltransduktionskaskaden einschließlich der beteiligten Transkriptionsfaktoren charakterisiert worden waren, stellte sich die Frage, an

welche Bereiche des MCP-1-Promotors diese Transkriptionsfaktoren möglicherweise binden können. Hierzu wurden Promotorregionen ausgewählt, die potentielle Bindungsstellen für die als relevant erkannten Transkriptionsfaktoren aufwiesen. Dabei wurden eine distale und eine proximale Region eingehender untersucht. An den distalen Bereich konnten keine detektierbaren Mitglieder von NF-AT trotz einer potentiellen NF-AT-Bindungsstelle binden. Jedoch konnte eine Bindung der vorher beschriebenen NF- $\kappa$ B- und AP-1-Mitglieder an diese Region gezeigt werden. Eine Bedeutung dieser Region für die MCP-1-Expression ist bislang nicht erkannt worden, jedoch wurde eine homologe Region ("Element 1") im MCP-1-Promotor der Maus beschrieben. Die proximale Promotorregion weist zwar potentielle Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B und AP-1 auf, es konnten für diese Region jedoch nur AP-1-Mitglieder nachgewiesen werden.

Im Vergleich der Expressionen von MCP-1 und IL-12p40 in THP-1 ergab sich, daß diese durch teilweise unterschiedliche Mechanismen reguliert werden : 1.) Eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration induziert MCP-1, jedoch kein IL-12p40. 2.) Phorbolster können zwar MCP-1, aber kein IL-12p40 induzieren. 3.) Anders als bei der MCP-1-Expression kann die Bildung von IL-12p40 durch MEK1/2-Inhibitoren nur negativ beeinflußt, aber nicht völlig blockiert werden. Die wesentlichen Ergebnisse für MCP-1 konnten mit *ex vivo* isolierten PBMC-Monozyten reproduziert werden. LPS, PMA und Calcium-Ionophor induzieren MCP-1, was durch MEK-1/-2-Inhibitoren gehemmt wird.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, daß MCP-1 in Monozyten/Makrophagen anders als bei manchen Zelltypen durch eine Vielfalt von Stimuli induziert wird, wobei in Abhängigkeit vom Stimulus zum Teil gemeinsame, aber auch unterschiedliche Signaltransduktionspfade beteiligt sind. Entsprechende Promotorregionen für NF- $\kappa$ B, NF-AT und AP-1 wurden untersucht.

# VI. Literaturverzeichnis

1. Otvos, L., Jr. 2000. Antibacterial peptides isolated from insects. *J.Pept.Sci.* 6:497-511.
2. Kimbrell, D. A. and B. Beutler. 2001. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat.Rev.Genet.* 2:256-267.
3. Cohn, J., G. Sessa, and G. B. Martin. 2001. Innate immunity in plants. *Curr.Opin.Immunol.* 13:55-62.
4. Janeway, C. A. and P. Travers. *Immunobiology: the immune system in health and disease.* Garland Publishing Inc., New York.
5. Fearon, D. T. and R. M. Locksley. 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272:50-53.
6. Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. 1998. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin.Immunol.* 10:351-353.
7. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
8. Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr.Opin.Immunol.* 9:4-9.
9. Fearon, D. T. 2000. Innate immunity--beginning to fulfill its promise? *Nat.Immunol.* 1:102-103.
10. Abbas, A. B., A. H. Lichtman, and J. S. Pober. *Cellular And Molecular Immunology.* W.B.Saunders Company, Philadelphia.
11. Zhang, G. and S. Ghosh. 2001. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J.Clin.Invest* 107:13-19.
12. Lipford, G. B., T. Sparwasser, M. Bauer, S. Zimmermann, E. S. Koch, K. Heeg, and H. Wagner. 1997. Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. *Eur.J.Immunol.* 27:3420-3426.
13. Yi, A. K., D. M. Klinman, T. L. Martin, S. Matson, and A. M. Krieg. 1996. Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. Systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant-sensitive pathway. *J.Immunol.* 157:5394-5402.
14. Suzuki, N., K. Yamamoto, S. Toyoshima, T. Osawa, and T. Irimura. 1996. Molecular cloning and expression of cDNA encoding human macrophage C-type lectin. Its unique carbohydrate binding specificity for Tn antigen. *J.Immunol.* 156:128-135.
15. Jiang, W., W. J. Swiggard, C. Heufler, M. Peng, A. Mirza, R. M. Steinman, and M. C. Nussenzweig. 1995. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375:151-155.
16. Yokoyama, W. M. 1995. Natural killer cell receptors. *Curr.Opin.Immunol.* 7:110-120.
17. Stahl, P. D. 1992. The mannose receptor and other macrophage lectins. *Curr.Opin.Immunol.* 4:49-52.
18. Miyake, K., Y. Yamashita, M. Ogata, T. Sudo, and M. Kimoto. 1995. RP105, a novel B cell surface molecule implicated in B cell activation, is a member of the leucine-rich repeat protein family. *J.Immunol.* 154:3333-3340.

19. Wright, S. D., R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch, and J. C. Mathison. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249:1431-1433.
20. Ulevitch, R. J. and P. S. Tobias. 1995. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu.Rev.Immunol.* 13:437-457.
21. Elomaa, O., M. Kangas, C. Sahlberg, J. Tuukkanen, R. Sormunen, A. Liakka, I. Thesleff, G. Kraal, and K. Tryggvason. 1995. Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. *Cell* 80:603-609.
22. Walker, I. D., M. D. Glew, M. A. O'Keefe, S. A. Metcalfe, H. C. Clevers, P. L. Wijngaard, T. E. Adams, and W. R. Hein. 1994. A novel multi-gene family of sheep gamma delta T cells. *Immunology* 83:517-523.
23. Krieger, M. and J. Herz. 1994. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu.Rev.Biochem.* 63:601-637.
24. Proost, P., A. Wuyts, and J. Van Damme. 1996. Human monocyte chemotactic proteins-2 and -3: structural and functional comparison with MCP-1. *J.Leukoc.Biol.* 59:67-74.
25. Pike, M. C. and R. Snyderman. 1976. Depression of macrophage function by a factor produced by neoplasms: a mechanism for abrogation of immune surveillance. *J.Immunol.* 117:1243-1249.
26. Schutt, C. 1999. Fighting infection: the role of lipopolysaccharide binding proteins CD14 and LBP. *Pathobiology* 67:227-229.
27. Wolk, K., W. Docke, B. von, V. H. Volk, and R. Sabat. 1999. Comparison of monocyte functions after LPS- or IL-10-induced reorientation: importance in clinical immunoparalysis. *Pathobiology* 67:253-256.
28. Tabel, H., R. S. Kaushik, and J. Uzonna. 1999. Experimental African trypanosomiasis: differences in cytokine and nitric oxide production by macrophages from resistant and susceptible mice. *Pathobiology* 67:273-276.
29. Stein, M., S. Keshav, N. Harris, and S. Gordon. 1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J.Exp.Med.* 176:287-292.
30. Goerdts, S., O. Politz, K. Schledzewski, R. Birk, A. Gratchev, P. Guillot, N. Hakiy, C. D. Klemke, E. Dippel, V. Kodolja, and C. E. Orfanos. 1999. Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology* 67:222-226.
31. Mukaida, N., A. Harada, and K. Matsushima. 1998. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9:9-23.
32. Smith, R. E., C. M. Hogaboam, R. M. Strieter, N. W. Lukacs, and S. L. Kunkel. 1997. Cell-to-cell and cell-to-matrix interactions mediate chemokine expression: an important component of the inflammatory lesion. *J.Leukoc.Biol.* 62:612-619.
33. Sozzani, S., M. Locati, P. Allavena, J. Van Damme, and A. Mantovani. 1996. Chemokines: a superfamily of chemotactic cytokines. *Int.J.Clin.Lab Res.* 26:69-82.
34. Steube, K. G., C. Meyer, and H. G. Drexler. 1999. Constitutive protein expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by myelomonocytic cell lines and regulation of the secretion by. *Leuk.Res.* 23:843-849.
35. Gerard, C. and B. J. Rollins. 2001. Chemokines and disease. *Nat.Immunol.* 2:108-115.
36. MacDermott, R. P., I. R. Sanderson, and H. C. Reinecker. 1998. The central role of chemokines (chemotactic cytokines) in the immunopathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm.Bowel.Dis.* 4:54-67.



37. Sozzani, S., P. Allavena, P. Proost, J. Van Damme, and A. Mantovani. 1996. Chemokines as targets for pharmacological intervention. *Prog. Drug Res.* 47:53-80.
38. Cochran, B. H., A. C. Reffel, and C. D. Stiles. 1983. Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. *Cell* 33:939-947.
39. Rollins, B. J., E. D. Morrison, and C. D. Stiles. 1988. Cloning and expression of JE, a gene inducible by platelet-derived growth factor and whose product has cytokine-like properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:3738-3742.
40. Rollins, B. J., P. Stier, T. Ernst, and G. G. Wong. 1989. The human homolog of the JE gene encodes a monocyte secretory protein. *Mol. Cell Biol.* 9:4687-4695.
41. Yoshimura, T., E. A. Robinson, S. Tanaka, E. Appella, J. Kuratsu, and E. J. Leonard. 1989. Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. *J. Exp. Med.* 169:1449-1459.
42. Yoshimura, T., N. Yuhki, S. K. Moore, E. Appella, M. I. Lerman, and E. J. Leonard. 1989. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Lett.* 244:487-493.
43. Matsushima, K., C. G. Larsen, G. C. DuBois, and J. J. Oppenheim. 1989. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J. Exp. Med.* 169:1485-1490.
44. Furutani, Y., H. Nomura, M. Notake, Y. Oyamada, T. Fukui, M. Yamada, C. G. Larsen, J. J. Oppenheim, and K. Matsushima. 1989. Cloning and sequencing of the cDNA for human monocyte chemotactic and activating factor (MCAF). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159:249-255.
45. Bottazzi, B., F. Colotta, A. Sica, N. Nobili, and A. Mantovani. 1990. A chemoattractant expressed in human sarcoma cells (tumor-derived chemotactic factor, TDCF) is identical to monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemotactic and activating factor (MCP-1/MCAF). *Int. J. Cancer* 45:795-797.
46. Bottazzi, B., N. Polentarutti, R. Acero, A. Balsari, D. Boraschi, P. Ghezzi, M. Salmona, and A. Mantovani. 1983. Regulation of the macrophage content of neoplasms by chemoattractants. *Science* 220:210-212.
47. Graves, D. T., Y. L. Jiang, M. J. Williamson, and A. J. Valente. 1989. Identification of monocyte chemotactic activity produced by malignant cells. *Science* 245:1490-1493.
48. Valente, A. J., D. T. Graves, C. E. Vialle-Valentin, R. Delgado, and C. J. Schwartz. 1988. Purification of a monocyte chemotactic factor secreted by nonhuman primate vascular cells in culture. *Biochemistry* 27:4162-4168.
49. Luther, S. A. and J. G. Cyster. 2001. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat. Immunol.* 2:102-107.
50. Li, Y. S., Y. J. Shyy, J. G. Wright, A. J. Valente, J. F. Cornhill, and P. E. Kolattukudy. 1993. The expression of monocyte chemotactic protein (MCP-1) in human vascular endothelium in vitro and in vivo. *Mol. Cell Biochem.* 126:61-68.
51. Hall, D. J., C. Brownlee, and C. D. Stiles. 1989. Interleukin-1 is a potent regulator of JE and KC gene expression in quiescent BALB/c fibroblasts. *J. Cell Physiol* 141:154-159.
52. Strieter, R. M., R. Wiggins, S. H. Phan, B. L. Wharram, H. J. Showell, D. G. Remick, S. W. Chensue, and S. L. Kunkel. 1989. Monocyte chemotactic protein gene expression by cytokine-treated human fibroblasts and endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162:694-700.
53. Navab, M., S. S. Imes, S. Y. Hama, G. P. Hough, L. A. Ross, R. W. Bork, A. J. Valente, J. A. Berliner, D. C. Drinkwater, H. Laks, and . 1991. Monocyte transmigration induced by modification of low density

- lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J.Clin.Invest* 88:2039-2046.
54. Rollins, B. J., T. Yoshimura, E. J. Leonard, and J. S. Pober. 1990. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am.J.Pathol.* 136:1229-1233.
  55. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser. 1997. Human chemokines: an update. *Annu.Rev.Immunol.* 15:675-705.
  56. Howard, O. M., A. Ben Baruch, and J. J. Oppenheim. 1996. Chemokines: progress toward identifying molecular targets for therapeutic agents. *Trends Biotechnol.* 14:46-51.
  57. Ransohoff, R. M., A. Glabinski, and M. Tani. 1996. Chemokines in immune-mediated inflammation of the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7:35-46.
  58. Ritter, U. and H. Moll. 2000. Monocyte chemotactic protein-1 stimulates the killing of leishmania major by human monocytes, acts synergistically with IFN-gamma and is antagonized by IL-4. *Eur.J.Immunol.* 30:3111-3120.
  59. Chensue, S. W., K. S. Warmington, J. H. Ruth, P. S. Sanghi, P. Lincoln, and S. L. Kunkel. 1996. Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Th1 (mycobacterial) and Th2 (schistosomal) antigen-induced granuloma formation: relationship to local inflammation, Th cell expression, and IL-12 production. *J.Immunol.* 157:4602-4608.
  60. Lu, B., B. J. Rutledge, L. Gu, J. Fiorillo, N. W. Lukacs, S. L. Kunkel, R. North, C. Gerard, and B. J. Rollins. 1998. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J.Exp.Med.* 187:601-608.
  61. Gu, L., S. Tseng, R. M. Horner, C. Tam, M. Loda, and B. J. Rollins. 2000. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* 404:407-411.
  62. Brown, Z., R. L. Robson, and J. Westwick. 1996. Regulation and expression of chemokines: potential role in glomerulonephritis. *J.Leukoc.Biol.* 59:75-80.
  63. Stahl, R. A., F. Thaiss, M. Disser, U. Helmchen, K. Hora, and D. Schlondorff. 1993. Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis. *Kidney Int.* 44:1036-1047.
  64. Jones, M. L., M. S. Mulligan, C. M. Flory, P. A. Ward, and J. S. Warren. 1992. Potential role of monocyte chemoattractant protein 1/JE in monocyte/macrophage-dependent IgA immune complex alveolitis in the rat. *J.Immunol.* 149:2147-2154.
  65. Antoniadis, H. N., J. Neville-Golden, T. Galanopoulos, R. L. Kradin, A. J. Valente, and D. T. Graves. 1992. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 mRNA in human idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:5371-5375.
  66. Sousa, A. R., S. J. Lane, J. A. Nakhosteen, T. Yoshimura, T. H. Lee, and R. N. Poston. 1994. Increased expression of the monocyte chemoattractant protein-1 in bronchial tissue from asthmatic subjects. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 10:142-147.
  67. Baggiolini, M. and C. A. Dahinden. 1994. CC chemokines in allergic inflammation. *Immunol.Today* 15:127-133.
  68. Luster, A. D. and M. E. Rothenberg. 1997. Role of the monocyte chemo attractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *J.Leukoc.Biol.* 62:620-633.
  69. Lloyd, C. M., M. E. Dorf, A. Proudfoot, D. J. Salant, and J. C. Gutierrez-Ramos. 1997. Role of MCP-1 and RANTES in inflammation and progression to fibrosis during murine crescentic nephritis. *J.Leukoc.Biol.* 62:676-680.

70. Weiss, L., A. Si-Mohamed, P. Giral, P. Castiel, A. Ledur, C. Blondin, M. D. Kazatchkine, and N. Haeffner-Cavaillon. 1997. Plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 but not those of macrophage inhibitory protein-1alpha and RANTES correlate with virus load in human immunodeficiency virus infection. *J.Infect.Dis.* 176:1621-1624.
71. Sozzani, S., M. Introna, S. Bernasconi, N. Polentarutti, P. Cinque, G. Poli, A. Sica, and A. Mantovani. 1997. MCP-1 and CCR2 in HIV infection: regulation of agonist and receptor expression. *J.Leukoc.Biol.* 62:30-33.
72. Schwartz, C. J., A. J. Valente, E. A. Sprague, J. L. Kelley, and R. M. Nerem. 1991. The pathogenesis of atherosclerosis: an overview. *Clin.Cardiol.* 14:11-16.
73. Mateo, L., M. La Linn, S. R. McColl, S. Cross, J. Gardner, and A. Suhrbier. 2000. An arthrogenic alphavirus induces monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8. *Intervirology* 43:55-60.
74. Balling, R., H. G. de Couet, K.-F. Fischbach, A. Frey, H. G. Gassen, K. H. Glatzer, R. Hagemann, O. Hess, M. Hofbauer, C. P. Hollenberg, H. Jackle, R. Jager, G. Jurgens, U. Krawinkel, A. Lachmund, I. Melchers, K. Minol, H. G. Neiss, A. Nordheim, G. E. Sachse, U. Schaefer, M. Schartl, W. Seyffert, D. Tautz, and P. Weber. *Lehrbuch der Genetik*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
75. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
76. Beutler, B. 2000. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr.Opin.Immunol.* 12:20-26.
77. O'Neill, L. A. and C. Greene. 1998. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J.Leukoc.Biol.* 63:650-657.
78. Karin, M. and Y. Ben Neriah. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu.Rev.Immunol.* 18:621-663.
79. Lee, J. C., J. T. Laydon, P. C. McDonnell, T. F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M. J. Blumenthal, J. R. Heys, S. W. Landvatter, and . 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372:739-746.
80. Su, B. and M. Karin. 1996. Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr.Opin.Immunol.* 8:402-411.
81. Fanger, G. R., P. Gerwins, C. Widmann, M. B. Jarpe, and G. L. Johnson. 1997. MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr.Opin.Genet.Dev.* 7:67-74.
82. Siow, Y. L., G. B. Kalmar, J. S. Sanghera, G. Tai, S. S. Oh, and S. L. Pelech. 1997. Identification of two essential phosphorylated threonine residues in the catalytic domain of Mekk1. Indirect activation by Pak3 and protein kinase C. *J.Biol.Chem.* 272:7586-7594.
83. Gutkind, J. S. 1998. The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J.Biol.Chem.* 273:1839-1842.
84. Gartner, A., K. Nasmyth, and G. Ammerer. 1992. Signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1. *Genes Dev.* 6:1280-1292.
85. Songyang, Z., K. P. Lu, Y. T. Kwon, L. H. Tsai, O. Filhol, C. Cochet, D. A. Brickey, T. R. Soderling, C. Bartleson, D. J. Graves, A. J. DeMaggio, M. F. Hoekstra, J. Blenis, T. Hunter, and L. C. Cantley. 1996. A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol.Cell Biol.* 16:6486-6493.

86. Clark-Lewis, I., J. S. Sanghera, and S. L. Pelech. 1991. Definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44mpk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase. *J.Biol.Chem.* 266:15180-15184.
87. Schaeffer, H. J. and M. J. Weber. 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol.Cell Biol.* 19:2435-2444.
88. Widmann, C., S. Gibson, M. B. Jarpe, and G. L. Johnson. 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase. *Physiol Rev.* 79:143-180.
89. Garrington, T. P. and G. L. Johnson. 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase. *Curr.Opin.Cell Biol.* 11:211-218.
90. Wasylyk, B., J. Hagman, and A. Gutierrez-Hartmann. 1998. Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *Trends Biochem.Sci.* 23:213-216.
91. Yang, S. H., A. J. Whitmarsh, R. J. Davis, and A. D. Sharrocks. 1998. Differential targeting of MAP kinases to the ETS-domain transcription factor Elk-1. *EMBO J.* 17:1740-1749.
92. Li, Y. S. and P. E. Kolattukudy. 1994. Functional role of the cis-acting elements in human monocyte chemotactic protein-1 gene in the regulation of its expression by phorbol ester in human glioblastoma cells. *Mol.Cell Biochem.* 141:121-128.
93. Martin, T., P. M. Cardarelli, G. C. Parry, K. A. Felts, and R. R. Cobb. 1997. Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative action of NF-kappa B and AP-1. *Eur.J.Immunol.* 27:1091-1097.
94. Young, P. R., M. M. McLaughlin, S. Kumar, S. Kassis, M. L. Doyle, D. McNulty, T. F. Gallagher, S. Fisher, P. C. McDonnell, S. A. Carr, M. J. Huddleston, G. Seibel, T. G. Porter, G. P. Livi, J. L. Adams, and J. C. Lee. 1997. Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *J.Biol.Chem.* 272:12116-12121.
95. Nebreda, A. R. and A. Porras. 2000. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem.Sci.* 25:257-260.
96. Kumar, S., P. C. McDonnell, R. J. Gum, A. T. Hand, J. C. Lee, and P. R. Young. 1997. Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 235:533-538.
97. Goedert, M., A. Cuenda, M. Craxton, R. Jakes, and P. Cohen. 1997. Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *EMBO J.* 16:3563-3571.
98. Kummer, J. L., P. K. Rao, and K. A. Heidenreich. 1997. Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J.Biol.Chem.* 272:20490-20494.
99. Duncia, J. V., J. B. Santella, III, C. A. Higley, W. J. Pitts, J. Wityak, W. E. Frieze, F. W. Rankin, J. H. Sun, R. A. Earl, A. C. Tabaka, C. A. Teleha, K. F. Blom, M. F. Favata, E. J. Manos, A. J. Daulerio, D. A. Stradley, K. Horiuchi, R. A. Copeland, P. A. Scherle, J. M. Trzaskos, R. L. Magolda, G. L. Trainor, R. R. Wexler, F. W. Hobbs, and R. E. Olson. 1998. MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 8:2839-2844.
100. Favata, M. F., K. Y. Horiuchi, E. J. Manos, A. J. Daulerio, D. A. Stradley, W. S. Feeser, D. E. Van Dyk, W. J. Pitts, R. A. Earl, F. Hobbs, R. A. Copeland, R. L. Magolda, P. A. Scherle, and J. M. Trzaskos. 1998. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J.Biol.Chem.* 273:18623-18632.
101. DeSilva, D. R., E. A. Jones, M. F. Favata, B. D. Jaffee, R. L. Magolda, J. M. Trzaskos, and P. A. Scherle. 1998. Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase blocks T cell proliferation but does not induce or prevent anergy. *J.Immunol.* 160:4175-4181.

102. Alessi, D. R., A. Cuenda, P. Cohen, D. T. Dudley, and A. R. Saltiel. 1995. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J.Biol.Chem.* 270:27489-27494.
103. Dudley, D. T., L. Pang, S. J. Decker, A. J. Bridges, and A. R. Saltiel. 1995. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:7686-7689.
104. Scherle, P. A., E. A. Jones, M. F. Favata, A. J. Daulerio, M. B. Covington, S. A. Nurnberg, R. L. Magolda, and J. M. Trzaskos. 1998. Inhibition of MAP kinase kinase prevents cytokine and prostaglandin E2 production in lipopolysaccharide-stimulated monocytes. *J.Immunol.* 161:5681-5686.
105. Marshall, C. J. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179-185.
106. Cowley, S., H. Paterson, P. Kemp, and C. J. Marshall. 1994. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 77:841-852.
107. Takai, Y., A. Kishimoto, M. Inoue, and Y. Nishizuka. 1977. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J.Biol.Chem.* 252:7603-7609.
108. Ron, D. and M. G. Kazanietz. 1999. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J.* 13:1658-1676.
109. Gschwendt, M., S. Dieterich, J. Rennecke, W. Kittstein, H. J. Mueller, and F. J. Johannes. 1996. Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. *FEBS Lett.* 392:77-80.
110. Martiny-Baron, G., M. G. Kazanietz, H. Mischak, P. M. Blumberg, G. Kochs, H. Hug, D. Marme, and C. Schachtele. 1993. Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J.Biol.Chem.* 268:9194-9197.
111. Satake, N., S. Fujimoto, and S. Shibata. 1996. The potentiation of nitroglycerin-induced relaxation by PKG inhibition in rat aortic rings. *Gen.Pharmacol.* 27:701-705.
112. Le Good, J. A., W. H. Ziegler, D. B. Parekh, D. R. Alessi, P. Cohen, and P. J. Parker. 1998. Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 281:2042-2045.
113. Chou, M. M., W. Hou, J. Johnson, L. K. Graham, M. H. Lee, C. S. Chen, A. C. Newton, B. S. Schaffhausen, and A. Toker. 1998. Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr.Biol.* 8:1069-1077.
114. Edwards, A. S. and A. C. Newton. 1997. Phosphorylation at conserved carboxyl-terminal hydrophobic motif regulates the catalytic and regulatory domains of protein kinase C. *J.Biol.Chem.* 272:18382-18390.
115. Keranen, L. M., E. M. Dutil, and A. C. Newton. 1995. Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr.Biol.* 5:1394-1403.
116. Martelli, A. M., N. Sang, P. Borgatti, S. Capitani, and L. M. Neri. 1999. Multiple biological responses activated by nuclear protein kinase C. *J.Cell Biochem.* 74:499-521.
117. Buchner, K. 1995. Protein kinase C in the transduction of signals toward and within the cell nucleus. *Eur.J.Biochem.* 228:211-221.
118. Mellor, H. and P. J. Parker. 1998. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem.J.* 332 ( Pt 2):281-292.
119. Kazanietz, M. G. 2000. Eyes wide shut: protein kinase C isozymes are not the only receptors for the phorbol ester tumor promoters. *Mol.Carcinog.* 28:5-11.

120. Sanz, L., P. Sanchez, M. J. Lallena, M. T. Diaz-Meco, and J. Moscat. 1999. The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF-kappaB activation. *EMBO J.* 18:3044-3053.
121. Lallena, M. J., M. T. Diaz-Meco, G. Bren, C. V. Paya, and J. Moscat. 1999. Activation of IkappaB kinase beta by protein kinase C isoforms. *Mol. Cell Biol.* 19:2180-2188.
122. Schonwasser, D. C., R. M. Marais, C. J. Marshall, and P. J. Parker. 1998. Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isoforms. *Mol. Cell Biol.* 18:790-798.
123. Faux, M. C. and J. D. Scott. 1997. Regulation of the AKAP79-protein kinase C interaction by Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin. *J. Biol. Chem.* 272:17038-17044.
124. Klauck, T. M., M. C. Faux, K. Labudda, L. K. Langeberg, S. Jaken, and J. D. Scott. 1996. Coordination of three signaling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein. *Science* 271:1589-1592.
125. Tamir, A. and N. Isakov. 1994. Cyclic AMP inhibits phosphatidylinositol-coupled and -uncoupled mitogenic signals in T lymphocytes. Evidence that cAMP alters PKC-induced transcription regulation of members of the jun and fos family of genes. *J. Immunol.* 152:3391-3399.
126. Klee, C. B., H. Ren, and X. Wang. 1998. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J. Biol. Chem.* 273:13367-13370.
127. Stewart, A. A., T. S. Ingebritsen, A. Manalan, C. B. Klee, and P. Cohen. 1982. Discovery of a Ca<sup>2+</sup>- and calmodulin-dependent protein phosphatase: probable identity with calcineurin (CaM-BP80). *FEBS Lett.* 137:80-84.
128. Klee, C. B., G. F. Draetta, and M. J. Hubbard. 1988. Calcineurin. *Adv. Enzymol. Relat Areas Mol. Biol.* 61:149-200.
129. Schreiber, S. L. and G. R. Crabtree. 1992. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol. Today* 13:136-142.
130. Milan, D., J. Griffith, M. Su, E. R. Price, and F. McKeon. 1994. The latch region of calcineurin B is involved in both immunosuppressant-immunophilin complex docking and phosphatase activation. *Cell* 79:437-447.
131. Luo, C., K. T. Shaw, A. Raghavan, J. Aramburu, F. Garcia-Cozar, B. A. Perrino, P. G. Hogan, and A. Rao. 1996. Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93:8907-8912.
132. Luo, C., E. Burgeon, J. A. Carew, P. G. McCaffrey, T. M. Badalian, W. S. Lane, P. G. Hogan, and A. Rao. 1996. Recombinant NFAT1 (NFATp) is regulated by calcineurin in T cells and mediates transcription of several cytokine genes. *Mol. Cell Biol.* 16:3955-3966.
133. Jain, J., E. Burgeon, T. M. Badalian, P. G. Hogan, and A. Rao. 1995. A similar DNA-binding motif in NFAT family proteins and the Rel homology region. *J. Biol. Chem.* 270:4138-4145.
134. Loh, C., J. A. Carew, J. Kim, P. G. Hogan, and A. Rao. 1996. T-cell receptor stimulation elicits an early phase of activation and a later phase of deactivation of the transcription factor NFAT1. *Mol. Cell Biol.* 16:3945-3954.
135. Boss, V., D. J. Talpade, and T. J. Murphy. 1996. Induction of NFAT-mediated transcription by Gq-coupled receptors in lymphoid and non-lymphoid cells. *J. Biol. Chem.* 271:10429-10432.
136. Negulescu, P. A., N. Shastri, and M. D. Cahalan. 1994. Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91:2873-2877.
137. Rao, A., C. Luo, and P. G. Hogan. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 15:707-747.

138. Hoey, T., Y. L. Sun, K. Williamson, and X. Xu. 1995. Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins. *Immunity*. 2:461-472.
139. Trama, J., Q. Lu, R. G. Hawley, and S. N. Ho. 2000. The NFAT-related protein NFATL1 (TonEBP/NFAT5) is induced upon T cell activation in a calcineurin-dependent manner. *J.Immunol.* 165:4884-4894.
140. Lopez-Rodriguez, C., J. Aramburu, A. S. Rakean, and A. Rao. 1999. NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:7214-7219.
141. Okamoto, S., N. Mukaida, K. Yasumoto, N. Rice, Y. Ishikawa, H. Horiguchi, S. Murakami, and K. Matsushima. 1994. The interleukin-8 AP-1 and kappa B-like sites are genetic end targets of FK506-sensitive pathway accompanied by calcium mobilization. *J.Biol.Chem.* 269:8582-8589.
142. Rao, A. 1994. NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol.Today* 15:274-281.
143. Chow, C. W., M. Rincon, J. Cavanagh, M. Dickens, and R. J. Davis. 1997. Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* 278:1638-1641.
144. Zhu, J., F. Shibasaki, R. Price, J. C. Guillemot, T. Yano, V. Dotsch, G. Wagner, P. Ferrara, and F. McKeon. 1998. Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell* 93:851-861.
145. Chow, C. W. and R. J. Davis. 2000. Integration of calcium and cyclic AMP signaling pathways by 14-3-3. *Mol.Cell Biol.* 20:702-712.
146. Garcia-Rodriguez, C. and A. Rao. 1998. Nuclear factor of activated T cells (NFAT)-dependent transactivation regulated by the coactivators p300/CREB-binding protein (CBP). *J.Exp.Med.* 187:2031-2036.
147. Sugimoto, T., S. Stewart, and K. L. Guan. 1997. The calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin is the major Elk-1 phosphatase. *J.Biol.Chem.* 272:29415-29418.
148. Jain, J., P. G. McCaffrey, Z. Miner, T. K. Kerppola, J. N. Lambert, G. L. Verdine, T. Curran, and A. Rao. 1993. The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* 365:352-355.
149. Tokumitsu, H., H. Enslin, and T. R. Soderling. 1995. Characterization of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase cascade. Molecular cloning and expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase. *J.Biol.Chem.* 270:19320-19324.
150. Kitani, T., S. Okuno, and H. Fujisawa. 1997. Molecular cloning of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta. *J.Biochem.(Tokyo)* 122:243-250.
151. Anderson, K. A., R. L. Means, Q. H. Huang, B. E. Kemp, E. G. Goldstein, M. A. Selbert, A. M. Edelman, R. T. Fremeau, and A. R. Means. 1998. Components of a calmodulin-dependent protein kinase cascade. Molecular cloning, functional characterization and cellular localization of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta. *J.Biol.Chem.* 273:31880-31889.
152. Soderling, T. R. 1996. Structure and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinases II and IV. *Biochim.Biophys.Acta* 1297:131-138.
153. Sun, P., L. Lou, and R. A. Maurer. 1996. Regulation of activating transcription factor-1 and the cAMP response element-binding protein by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases type I, II, and IV. *J.Biol.Chem.* 271:3066-3073.
154. Enslin, H., H. Tokumitsu, and T. R. Soderling. 1995. Phosphorylation of CREB by CaM-kinase IV activated by CaM-kinase IV kinase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 207:1038-1043.

155. Enslin, H., P. Sun, D. Brickey, S. H. Soderling, E. Klamo, and T. R. Soderling. 1994. Characterization of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV. Role in transcriptional regulation. *J.Biol.Chem.* 269:15520-15527.
156. Matthews, R. P., C. R. Guthrie, L. M. Wailes, X. Zhao, A. R. Means, and G. S. McKnight. 1994. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression. *Mol.Cell Biol.* 14:6107-6116.
157. Chawla, S., G. E. Hardingham, D. R. Quinn, and H. Bading. 1998. CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV. *Science* 281:1505-1509.
158. Sahyoun, N., O. B. McDonald, F. Farrell, and E. G. Lapetina. 1991. Phosphorylation of a Ras-related GTP-binding protein, Rap-1b, by a neuronal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase, CaM kinase Gr. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:2643-2647.
159. Enslin, H., H. Tokumitsu, P. J. Stork, R. J. Davis, and T. R. Soderling. 1996. Regulation of mitogen-activated protein kinases by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:10803-10808.
160. Wayman, G. A., H. Tokumitsu, and T. R. Soderling. 1997. Inhibitory cross-talk by cAMP kinase on the calmodulin-dependent protein kinase cascade. *J.Biol.Chem.* 272:16073-16076.
161. Matsushita, M. and A. C. Nairn. 1999. Inhibition of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase I cascade by cAMP-dependent protein kinase. *J.Biol.Chem.* 274:10086-10093.
162. Wayman, G. A., J. Wei, S. Wong, and D. R. Storm. 1996. Regulation of type I adenylyl cyclase by calmodulin kinase IV in vivo. *Mol.Cell Biol.* 16:6075-6082.
163. Meldolesi, J. and T. Pozzan. 1998. The endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> store: a view from the lumen. *Trends Biochem.Sci.* 23:10-14.
164. Csordas, G., A. P. Thomas, and G. Hajnoczky. 1999. Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *EMBO J.* 18:96-108.
165. Berridge, M. J., P. Lipp, and M. D. Bootman. 2000. Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science* 287:1604-1605.
166. Brini, M., D. Bano, S. Manni, R. Rizzuto, and E. Carafoli. 2000. Effects of PMCA and SERCA pump overexpression on the kinetics of cell Ca(2+) signalling. *EMBO J.* 19:4926-4935.
167. Mogami, H., A. V. Tepikin, and O. H. Petersen. 1998. Termination of cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals: Ca<sup>2+</sup> reuptake into intracellular stores is regulated by the free Ca<sup>2+</sup> concentration in the store lumen. *EMBO J.* 17:435-442.
168. Meldolesi, J. and T. Pozzan. 1998. The heterogeneity of ER Ca<sup>2+</sup> stores has a key role in nonmuscle cell signaling and function. *J.Cell Biol.* 142:1395-1398.
169. Thastrup, O., P. J. Cullen, B. K. Drobak, M. R. Hanley, and A. P. Dawson. 1990. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca<sup>2+</sup> stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>(+)-ATPase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87:2466-2470.
170. Dolmetsch, R. E., R. S. Lewis, C. C. Goodnow, and J. I. Healy. 1997. Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature* 386:855-858.
171. Dolmetsch, R. E., K. Xu, and R. S. Lewis. 1998. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392:933-936.
172. Ping, D., G. H. Boekhoudt, E. M. Rogers, and J. M. Boss. 1999. Nuclear factor-kappa B p65 mediates the assembly and activation of the TNF-responsive element of the murine monocyte chemoattractant-1 gene. *J.Immunol.* 162:727-734.



173. Baldwin, A. S., Jr. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu.Rev.Immunol.* 14:649-683.
174. Baeuerle, P. A. and T. Henkel. 1994. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu.Rev.Immunol.* 12:141-179.
175. Karin, M. 1999. How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* 18:6867-6874.
176. Perkins, N. D. 2000. The Rel/NF-kappa B family: friend and foe. *Trends Biochem.Sci.* 25:434-440.
177. Perkins, N. D. 1997. Achieving transcriptional specificity with NF-kappa B. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 29:1433-1448.
178. Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi. 1997. AP-1 function and regulation. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9:240-246.
179. Hai, T. and T. Curran. 1991. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:3720-3724.
180. Whitmarsh, A. J. and R. J. Davis. 1996. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J.Mol.Med.* 74:589-607.
181. Piechaczyk, M. and J. M. Blanchard. 1994. c-fos proto-oncogene regulation and function. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 17:93-131.
182. Treisman, R. 1992. The serum response element. *Trends Biochem.Sci.* 17:423-426.
183. Kallunki, T., B. Su, I. Tsigelny, H. K. Sluss, B. Derijard, G. Moore, R. Davis, and M. Karin. 1994. JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev.* 8:2996-3007.
184. Minden, A., A. Lin, T. Smeal, B. Derijard, M. Cobb, R. Davis, and M. Karin. 1994. c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases. *Mol.Cell Biol.* 14:6683-6688.
185. Wei, S. J., A. Botero, K. Hirota, C. M. Bradbury, S. Markovina, A. Laszlo, D. R. Spitz, P. C. Goswami, J. Yodoi, and D. Gius. 2000. Thioredoxin nuclear translocation and interaction with redox factor-1 activates the activator protein-1 transcription factor in response to ionizing radiation. *Cancer Res.* 60:6688-6695.
186. Miltenyi, S., W. Muller, W. Weichel, and A. Radbruch. 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11:231-238.
187. Tsuchiya, S., M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno, and K. Tada. 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int.J.Cancer* 26:171-176.
188. Tsuchiya, S., Y. Kobayashi, Y. Goto, H. Okumura, S. Nakae, T. Konno, and K. Tada. 1982. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res.* 42:1530-1536.
189. Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 162:156-159.
190. Martin, T., P. M. Cardarelli, G. C. Parry, K. A. Felts, and R. R. Cobb. 1997. Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative action of NF-kappa B and AP-1. *Eur.J.Immunol.* 27:1091-1097.
191. Krzesz, R., A. H. Wagner, M. Cattaruzza, and M. Hecker. 1999. Cytokine-inducible CD40 gene expression in vascular smooth muscle cells is mediated by nuclear factor kappaB and signal transducer and activation of transcription-1. *FEBS Lett.* 453:191-196.
192. Schreiber, E., P. Matthias, M. M. Muller, and W. Schaffner. 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 17:6419.

193. Murphy, T. L., M. G. Cleveland, P. Kulesza, J. Magram, and K. M. Murphy. 1995. Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site. *Mol. Cell Biol.* 15:5258-5267.
194. Rehli, M., S. W. Krause, M. Kreutz, and R. Andreesen. 1995. Carboxypeptidase M is identical to the MAX.1 antigen and its expression is associated with monocyte to macrophage differentiation. *J. Biol. Chem.* 270:15644-15649.
195. Stahl, R. A., F. Thaiss, M. Disser, U. Helmchen, K. Hora, and D. Schlondorff. 1993. Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis. *Kidney Int.* 44:1036-1047.
196. Jones, M. L., M. S. Mulligan, C. M. Flory, P. A. Ward, and J. S. Warren. 1992. Potential role of monocyte chemoattractant protein 1/JE in monocyte/macrophage-dependent IgA immune complex alveolitis in the rat. *J. Immunol.* 149:2147-2154.
197. Mateo, L., M. La Linn, S. R. McColl, S. Cross, J. Gardner, and A. Suhrbier. 2000. An arthrogenic alphavirus induces monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8. *Intervirology* 43:55-60.
198. Proost, P., A. Wuyts, and J. Van Damme. 1996. Human monocyte chemotactic proteins-2 and -3: structural and functional comparison with MCP-1. *J. Leukoc. Biol.* 59:67-74.
199. Soell, M., M. Diab, G. Haan-Archipoff, A. Beretz, C. Herbelin, B. Poutrel, and J. P. Klein. 1995. Capsular polysaccharide types 5 and 8 of *Staphylococcus aureus* bind specifically to human epithelial (KB) cells, endothelial cells, and monocytes and induce release of cytokines. *Infect. Immun.* 63:1380-1386.
200. Sporri, B., K. M. Muller, U. Wiesmann, and M. Bickel. 1999. Soluble IL-6 receptor induces calcium flux and selectively modulates chemokine expression in human dermal fibroblasts. *Int. Immunol.* 11:1053-1058.
201. Tsukamoto, A., Y. Kaneko, and K. Kurokawa. 1993. Thapsigargin, an inhibitor of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase, enhances c-fos expression but antagonizes vacuole formation of human hepatoma cells induced by teleocidin. *Biochim. Biophys. Acta* 1177:31-36.
202. Yu, R. and P. M. Hinkle. 2000. Rapid turnover of calcium in the endoplasmic reticulum during signaling. Studies with cameleon calcium indicators. *J. Biol. Chem.* 275:23648-23653.
203. Hashimoto, Y., T. Watanabe, M. Kinoshita, K. Tsukamoto, M. Togo, Y. Horie, Y. Matsuda, and K. Kurokawa. 1993. Ca<sup>2+</sup> entry pathways activated by the tumor promoter thapsigargin in human platelets. *Biochim. Biophys. Acta* 1220:37-41.
204. Ho, S., N. Clipstone, L. Timmermann, J. Northrop, I. Graef, D. Fiorentino, J. Nourse, and G. R. Crabtree. 1996. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 80:S40-S45.
205. Rovin, B. H., W. A. Wilmer, M. Danne, J. A. Dickerson, C. L. Dixon, and L. Lu. 1999. The mitogen-activated protein kinase p38 is necessary for interleukin 1beta-induced monocyte chemoattractant protein 1 expression by human mesangial cells. *Cytokine* 11:118-126.
206. Goebeler, M., K. Kilian, R. Gillitzer, M. Kunz, T. Yoshimura, E. B. Brocker, U. R. Rapp, and S. Ludwig. 1999. The MKK6/p38 stress kinase cascade is critical for tumor necrosis factor-alpha-induced expression of monocyte-chemoattractant protein-1 in endothelial cells. *Blood* 93:857-865.
207. Findik, D., Q. Song, H. Hidaka, and M. Lavin. 1995. Protein kinase A inhibitors enhance radiation-induced apoptosis. *J. Cell Biochem.* 57:12-21.
208. Dodge, K. and J. D. Scott. 2000. AKAP79 and the evolution of the AKAP model. *FEBS Lett.* 476:58-61.
209. Bernstein, L. R., D. K. Ferris, N. H. Colburn, and M. E. Sobel. 1994. A family of mitogen-activated protein kinase-related proteins interacts in vivo with activator protein-1 transcription factor. *J. Biol. Chem.* 269:9401-9404.

210. Frost, J. A., T. D. Geppert, M. H. Cobb, and J. R. Feramisco. 1994. A requirement for extracellular signal-regulated kinase (ERK) function in the activation of AP-1 by Ha-Ras, phorbol 12-myristate 13-acetate, and serum. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:3844-3848.
211. Janknecht, R., W. H. Ernst, V. Pingoud, and A. Nordheim. 1993. Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. *EMBO J.* 12:5097-5104.
212. Alonso, A., Y. Bayon, M. Renedo, and M. S. Crespo. 2000. Stimulation of Fc gamma R receptors induces monocyte chemoattractant protein-1 in the human monocytic cell line THP-1 by a mechanism involving I kappa B-alpha degradation and formation of p50/p65 NF-kappa B/Rel complexes. *Int.Immunol.* 12:547-554.
213. Stylianou, E., M. Nie, A. Ueda, and L. Zhao. 1999. c-Rel and p65 trans-activate the monocyte chemoattractant protein-1 gene in interleukin-1 stimulated mesangial cells. *Kidney Int.* 56:873-882.
214. Cordle, S. R., R. Donald, M. A. Read, and J. Hawiger. 1993. Lipopolysaccharide induces phosphorylation of MAD3 and activation of c-Rel and related NF-kappa B proteins in human monocytic THP-1 cells. *J.Biol.Chem.* 268:11803-11810.
215. Hall, A. J., H. L. Vos, and R. M. Bertina. 1999. Lipopolysaccharide induction of tissue factor in THP-1 cells involves Jun protein phosphorylation and nuclear factor kappaB nuclear translocation. *J.Biol.Chem.* 274:376-383.
216. Krzesz, R., A. H. Wagner, M. Cattaruzza, and M. Hecker. 1999. Cytokine-inducible CD40 gene expression in vascular smooth muscle cells is mediated by nuclear factor kappaB and signal transducer and activation of transcription-1. *FEBS Lett.* 453:191-196.
217. Jeon, Y. J., S. H. Han, Y. W. Lee, M. Lee, K. H. Yang, and H. M. Kim. 2000. Dexamethasone inhibits IL-1 beta gene expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by blocking NF-kappa B/Rel and AP-1 activation. *Immunopharmacology* 48:173-183.
218. Steer, J. H., K. M. Kroeger, L. J. Abraham, and D. A. Joyce. 2000. Glucocorticoids suppress tumor necrosis factor-alpha expression by human monocytic THP-1 cells by suppressing transactivation through adjacent NF-kappa B and c-Jun-activating transcription factor-2 binding sites in the promoter. *J.Biol.Chem.* 275:18432-18440.
219. Pierce, J. W., R. Schoenleber, G. Jesmok, J. Best, S. A. Moore, T. Collins, and M. E. Gerritsen. 1997. Novel inhibitors of cytokine-induced I kappa B alpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J.Biol.Chem.* 272:21096-21103.
220. Staudt, L. M., H. Singh, R. Sen, T. Wirth, P. A. Sharp, and D. Baltimore. 1986. A lymphoid-specific protein binding to the octamer motif of immunoglobulin genes. *Nature* 323:640-643.
221. LeBowitz, J. H., T. Kobayashi, L. Staudt, D. Baltimore, and P. A. Sharp. 1988. Octamer-binding proteins from B or HeLa cells stimulate transcription of the immunoglobulin heavy-chain promoter in vitro. *Genes Dev.* 2:1227-1237.
222. Scheidereit, C., A. Heguy, and R. G. Roeder. 1987. Identification and purification of a human lymphoid-specific octamer-binding protein (OTF-2) that activates transcription of an immunoglobulin promoter in vitro. *Cell* 51:783-793.
223. Ping, D., G. Boekhoudt, and J. M. Boss. 1999. trans-Retinoic acid blocks platelet-derived growth factor-BB-induced expression of the murine monocyte chemoattractant-1 gene by blocking the assembly of a promoter proximal Sp1 binding site. *J.Biol.Chem.* 274:31909-31916.
224. Ping, D., G. Boekhoudt, F. Zhang, A. Morris, S. Philipsen, S. T. Warren, and J. M. Boss. 2000. Sp1 binding is critical for promoter assembly and activation of the MCP-1 gene by tumor necrosis factor. *J.Biol.Chem.* 275:1708-1714.
225. Shyy, Y. J., Y. S. Li, and P. E. Kolattukudy. 1990. Structure of human monocyte chemotactic protein gene and its regulation by TPA. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 169:346-351.

226. Quandt, K., K. Frech, H. Karas, E. Wingender, and T. Werner. 1995. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* 23:4878-4884.
227. Clusel, C., S. Meguenni, I. Elias, M. Vasseur, and M. Blumenfeld. 1995. Inhibition of HSV-1 proliferation by decoy phosphodiester oligonucleotides containing ICP4 recognition sequences. *Gene Expr.* 4:301-309.
228. Morishita, R., T. Sugimoto, M. Aoki, I. Kida, N. Tomita, A. Moriguchi, K. Maeda, Y. Sawa, Y. Kaneda, J. Higaki, and T. Ogihara. 1997. In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction. *Nat.Med.* 3:894-899.
229. Fuentes, M. E., S. K. Durham, M. R. Swerdel, A. C. Lewin, D. S. Barton, J. R. Megill, R. Bravo, and S. A. Lira. 1995. Controlled recruitment of monocytes and macrophages to specific organs through transgenic expression of monocyte chemoattractant protein-1. *J.Immunol.* 155:5769-5776.
230. Rollins, B. J. 1996. Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol.Med.Today* 2:198-204.
231. Wang, N., L. Verna, S. Hardy, J. Forsayeth, Y. Zhu, and M. B. Stemerman. 1999. Adenovirus-mediated overexpression of c-Jun and c-Fos induces intercellular adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human endothelial cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 19:2078-2084.
232. Timmerman, C. P., E. Mattsson, L. Martinez-Martinez, L. De Graaf, J. A. Van Strijp, H. A. Verbrugh, J. Verhoef, and A. Fleer. 1993. Induction of release of tumor necrosis factor from human monocytes by staphylococci and staphylococcal peptidoglycans. *Infect.Immun.* 61:4167-4172.
233. Soell, M., M. Diab, G. Haan-Archipoff, A. Beretz, C. Herbelin, B. Poutrel, and J. P. Klein. 1995. Capsular polysaccharide types 5 and 8 of *Staphylococcus aureus* bind specifically to human epithelial (KB) cells, endothelial cells, and monocytes and induce release of cytokines. *Infect.Immun.* 63:1380-1386.
234. Krakauer, T. 1998. Interleukin-8 production by human monocytic cells in response to staphylococcal exotoxins is direct and independent of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J.Infect.Dis.* 178:573-577.
235. Sutterwala, F. S., G. J. Noel, R. Clynes, and D. M. Mosser. 1997. Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J.Exp.Med.* 185:1977-1985.
236. Sporri, B., K. M. Muller, U. Wiesmann, and M. Bickel. 1999. Soluble IL-6 receptor induces calcium flux and selectively modulates chemokine expression in human dermal fibroblasts. *Int.Immunol.* 11:1053-1058.
237. Liu, M. K., P. Herrera-Velit, R. W. Brownsey, and N. E. Reiner. 1994. CD14-dependent activation of protein kinase C and mitogen-activated protein kinases (p42 and p44) in human monocytes treated with bacterial lipopolysaccharide. *J.Immunol.* 153:2642-2652.
238. Sanghera, J. S., S. L. Weinstein, M. Aluwalia, J. Girn, and S. L. Pelech. 1996. Activation of multiple proline-directed kinases by bacterial lipopolysaccharide in murine macrophages. *J.Immunol.* 156:4457-4465.
239. Han, J., J. D. Lee, L. Bibbs, and R. J. Ulevitch. 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265:808-811.
240. Hambleton, J., S. L. Weinstein, L. Lem, and A. L. DeFranco. 1996. Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:2774-2778.
241. Goebeler, M., K. Kilian, R. Gillitzer, M. Kunz, T. Yoshimura, E. B. Brocker, U. R. Rapp, and S. Ludwig. 1999. The MKK6/p38 stress kinase cascade is critical for tumor necrosis factor-alpha-induced expression of monocyte-chemoattractant protein-1 in endothelial cells. *Blood* 93:857-865.

242. Kopp, E., R. Medzhitov, J. Carothers, C. Xiao, I. Douglas, C. A. Janeway, and S. Ghosh. 1999. ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway. *Genes Dev.* 13:2059-2071.
243. Hurme, M., J. Viherluoto, and T. Nordstrom. 1992. The effect of calcium mobilization on LPS-induced IL-1 beta production depends on the differentiation stage of the monocytes/macrophages. *Scand.J.Immunol.* 36:507-511.
244. Soderling, T. R. 1999. The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Trends Biochem.Sci.* 24:232-236.
245. Rosengart, M. R., S. Arbabi, I. Garcia, and R. V. Maier. 2000. Interactions of calcium/calmodulin-dependent protein kinases (CaMK) and extracellular-regulated kinase (ERK) in monocyte adherence and TNFalpha production. *Shock* 13:183-189.
246. Sonobe, M. H., T. Yoshida, M. Murakami, T. Kameda, and H. Iba. 1995. fra-2 promoter can respond to serum-stimulation through AP-1 complexes. *Oncogene* 10:689-696.
247. Castagna, M., Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa, and Y. Nishizuka. 1982. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J.Biol.Chem.* 257:7847-7851.
248. Suzuki, T., H. Okuno, T. Yoshida, T. Endo, H. Nishina, and H. Iba. 1991. Difference in transcriptional regulatory function between c-Fos and Fra-2. *Nucleic Acids Res.* 19:5537-5542.
249. de Groot, R. P., M. Karperien, C. Pals, and W. Kruijer. 1991. Characterization of the mouse junD promoter--high basal level activity due to an octamer motif. *EMBO J.* 10:2523-2532.
250. Conboy, I. M., D. Manoli, V. Mhaikar, and P. P. Jones. 1999. Calcineurin and vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase modulate macrophage effector functions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:6324-6329.
251. Ueda, A., K. Okuda, S. Ohno, A. Shirai, T. Igarashi, K. Matsunaga, J. Fukushima, S. Kawamoto, Y. Ishigatsubo, and T. Okubo. 1994. NF-kappa B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *J.Immunol.* 153:2052-2063.
252. Liu, J., M. Chen, and X. Wang. 2000. Calcitonin gene-related peptide inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin-12 release from mouse peritoneal macrophages, mediated by the cAMP pathway. *Immunology* 101:61-67.
253. Hasko, G., C. Szabo, Z. H. Nemeth, A. L. Salzman, and E. S. Vizi. 1998. Suppression of IL-12 production by phosphodiesterase inhibition in murine endotoxemia is IL-10 independent. *Eur.J.Immunol.* 28:468-472.
254. Freter, R. R., J. A. Alberta, K. K. Lam, and C. D. Stiles. 1995. A new platelet-derived growth factor-regulated genomic element which binds a serine/threonine phosphoprotein mediates induction of the slow immediate-early gene MCP-1. *Mol.Cell Biol.* 15:315-325.
255. Freter, R. R., J. A. Alberta, G. Y. Hwang, A. L. Wrentmore, and C. D. Stiles. 1996. Platelet-derived growth factor induction of the immediate-early gene MCP-1 is mediated by NF-kappaB and a 90-kDa phosphoprotein coactivator. *J.Biol.Chem.* 271:17417-17424.
256. Ueda, A., Y. Ishigatsubo, T. Okubo, and T. Yoshimura. 1997. Transcriptional regulation of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. Cooperation of two NF-kappaB sites and NF-kappaB/Rel subunit specificity. *J.Biol.Chem.* 272:31092-31099.
257. Hacker, H., H. Mischak, T. Miethke, S. Liptay, R. Schmid, T. Sparwasser, K. Heeg, G. B. Lipford, and H. Wagner. 1998. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* 17:6230-6240.

## VII. Abkürzungen und Symbole

$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Calciumkonzentration
°C	Grad Celsius
μ	10 <sup>-6</sup>
10x konz.	zehnfach konzentriert
Abb.	Abbildung
AP-1	„Activating Protein-1“
Art.-Nr.	Artikel-Nummer
ASK1	„Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1“
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaM	Calmodulin
CaMK	CaM Kinase
CaMKK	„CaM Kinase Kinase“
CaN	Calcineurin
CD	„Cluster of Differentiation“
CsA	Cyclosporin A
cPKC	„conventional“ PKC
d.h.	das heißt
DLK	„Dual Leucine-Zipper Bearing Kinase“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„ <u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>A</u> cid“
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EMSA	„Electrophoretic Mobility Shift Assay“
ERK	„Extracellular-Signal Regulated Kinase“
Fa.	Firma
FCS	„Fetal Calf Serum“
FLIPR	„Fluorometric Imaging Plate Reader“

g	Gramm oder Erdbeschleunigung
h	Stunden
i.d.R.	in der Regel
I $\kappa$ B	„Inhibitor of NF- <u><math>\kappa</math>B</u> “
IKK	„I $\kappa$ B Kinases“
IL	Interleukin
JNK	„c-Jun Amino-Terminale Kinase“
Kap.	Kapitel
kDa oder KDa	Kilo Dalton
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
m	10 <sup>-3</sup> oder Meter
MACS	„Magnetic Cell Separation“
MAPK	„Mitogen-Activated Protein Kinase“
MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPK-Kinase-Kinase
MCP-1	„Monoctye Chemoattractant Protein-1“
MEK	„MAPK/ ERK Kinase“
MEKK	„MAPK/ ERK Kinase Kinase“
min	Minute
MKK	„MAPK Kinase“, MAPKK
MLK3	Mixed-Lineage Kinase3
n	10 <sup>-9</sup>
N.D.	„not detected“
NF-AT/NFAT	„Nuclear Factor of Activated T Cells“
NF- $\kappa$ B	„Nuclear Factor- $\kappa$ B“
o.g.	oben genannten
p	10 <sup>-12</sup>
Pan	Pansorbin, Präparation von <i>Staphylococcus aureus</i>
PBMC	„Peripheral Blood Mononuclear Cells“
PCR	„Polymerase Chain Reaction“
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate
RT	Raumtemperatur oder „Reverse Transcription“

---

RT-PCR	„Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction“
s.	siehe
San	Sansorbin, <i>Staphylococcus aureus</i> -Präparation ohne Protein A
SDS-PAGE	„Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis“
sec	Sekunden
SRE	„Serum Response Element“
SRF	„Serum Response Factors“
Tab.	Tabelle
TC	„Tissue Culture“ (Gewegekultur)
TG	Thapsigargin
TNF- $\alpha$	„Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ “
TPA	„12-O- <u>T</u> etradecanoyl- <u>P</u> horbol-13- <u>A</u> cetat“
TRAF6	„TNF Receptor-Associated Factor 6“
TRE	„ <u>T</u> PA <u>R</u> esponse <u>E</u> lement“
u.	unten
Vol.	Volumen



---

## Persönliche Daten

Name: Illya Tietzel  
Anschrift: Große Langgasse 6, 55116 Mainz  
Geburtsdatum: 22.02.1968  
Geburtsort: Bad Pyrmont, Niedersachsen  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

## Curriculum vitae

1974-1978            Grundschule Holzhausen, Bad Pyrmont  
1978-1987            Humboldt-Gymnasium, Bad Pyrmont  
1987                 Allgemeine Hochschulreife  
1987-1998            Altenpflegepraktikum, Bad Münder  
1988-1991            Krankenpflegeausbildung bei der Stadt Hannover  
1991-1998            Biologiestudium an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
1993-1998            Teilzeitanstellung als Krankenpfleger auf einer kardiologischen  
                         Intensivstation  
1997                 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Immunologie der  
                         Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
1998                 Diplomarbeit am Institut für Immunologie: „*Funktionelle  
                         Charakterisierung der zwei Makrophagenlinien J774.A und P388D.1*“  
1998-2001            Promotion unter der Betreuung von Hr. HschDoz. Dr. E. Schmitt bei  
                         der Fa. Grünenthal GmbH mit dem Thema: „*Induktion und Signaltrans-  
                         duktion bei der Expression des Chemokins MCP-1 in Monozyten*“

Mainz, den 15. Juni 2001