



Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 7318

Molekulare Mechanismen der Glukokortikoid-abhängigen Hemmung des IgE-Rezeptor- Signalweges in Mastzellen

J. V. Maier

Institut für Toxikologie und Genetik

August 2007

Forschungszentrum Karlsruhe

in der Helmholtz Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 7318

**Molekulare Mechanismen der
Glukokortikoid-abhängigen Hemmung des
IgE-Rezeptor-Signalweges
in Mastzellen**

Jana Viktoria Maier

Institut für Toxikologie und Genetik

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2007

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)

ISSN 0947-8620

urn:nbn:de:0005-073185

**Molekulare Mechanismen der
Glukokortikoid-abhängigen Hemmung des
IgE-Rezeptor-Signalweges
in Mastzellen**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der Universität Karlsruhe

(TH)

genehmigte

DISSERTATION

von

Jana Viktoria Maier

aus Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. Holger Puchta

Referent: Prof. Dr. Andrew Cato

Korreferent: Prof. Dr. Margot Zöller

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2006

Zusammenfassung

Glukokortikoide sind für ihre starken entzündungshemmenden und anti-allergischen Eigenschaften bekannt. In Mastzellen hemmen sie die Mediatorfreisetzung und die Expression von Entzündungsgenen. Diese Prozesse werden durch die antigenvermittelte Kreuzvernetzung des IgE-Rezeptors FcεRI ausgelöst und zeichnen sich durch eine erhöhte Aktivität der MAP Kinasen ERK1/2, JNK und p38 MAPK aus. Die FcεRI-Oberflächenexpression sowie die antigeninduzierte Phosphorylierung von MAP Kinasen werden durch Glukokortikoide gehemmt. In dieser Arbeit wurden die Mechanismen der Glukokortikoid-vermittelten negativen Regulation der FcεRI-Expression und p38 MAPK- und ERK1/2-Aktivität in Mastzellen (*bone marrow derived mast cells*, BMMC) analysiert.

Die Herabsetzung der FcεRI-Expression ist eine späte Glukokortikoid-Wirkung, die erst nach 16 Stunden Dexamethason-Behandlung von BMMC festgestellt werden konnte. Dexamethason hatte keine Auswirkung auf die mRNA-Menge der einzelnen IgE-Rezeptor-Untereinheiten, setzte jedoch die Proteinmenge der FcεRI β-Kette herab. Durch Verwendung von Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der FcεRI β-Untereinheit den Glukokortikoidrezeptor, eine *de novo* Proteinsynthese sowie die Aktivität des proteasomalen Proteinabbauweges benötigt. BMMC, die zwei bis 24 Stunden in Gegenwart von Dexamethason kultiviert wurden, zeigten eine erhöhte Expression der MAP Kinase-Phosphatasen MKP-1 und MKP-2 und der Phosphatase PEP. Mit Hilfe von BMMC von PEP- und MKP-1-Knockout (KO)-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die negative Regulation von ERK1/2 durch Dexamethason PEP- und MKP-1-unabhängig ist. Ebenso war die p38 MAPK-Phosphorylierung in Glukokortikoid-behandelten PEP KO-BMMC herabgesetzt, wohingegen MKP-1-defiziente BMMC keine Hemmung der p38 MAPK-Phosphorylierung zeigten. Die Aufhebung dieser Glukokortikoid-Wirkung in MKP-1 KO-BMMC konnte nur nach 4 und 8 Stunden Dexamethason-Behandlung beobachtet werden, während eine länger anhaltende Behandlung von MKP-1 KO-BMMC mit Dexamethason zu einer Repression der p38 MAPK-Aktivität führte. Dies zeigt, dass die Fähigkeit von MKP-1, diese Glukokortikoid-Wirkung zu vermitteln, auf einen relativ kurzen Zeitraum beschränkt ist. Eine Reduktion der MKP-2-Proteinmenge mittels siRNA hatte keine Auswirkung auf die Glukokortikoid-abhängige Regulation von ERK1/2 und p38 MAPK. In ähnlicher Weise war die negative Regulation der Expression der pro-inflammatorischen Gene TNF-α, IL-6, MCP-1 und MMP13 durch Dexamethason in MKP-1 KO-BMMC und in BMMC, die mit MKP-2-siRNA transfiziert wurden, unverändert. MKP-1 KO-Mäuse erwiesen sich jedoch hoch empfindlich gegenüber einer systemischen Anaphylaxie. Aber trotzdem war Dexamethason in der Lage, diese IgE/Antigen-induzierte anaphylaktische Reaktion zu inhibieren.

Die Befunde dieser Arbeit demonstrieren somit, dass die Induktion von MKP-1 für die Glukokortikoid-abhängige Hemmung der p38 MAPK-Phosphorylierung benötigt wird, aber nicht ausreicht, um die inhibitorischen Wirkungen der Glukokortikoide in BMMC zu vermitteln.

Abstract

Molecular mechanisms of glucocorticoid-dependent inhibition of IgE receptor signalling in mast cells

Glucocorticoids are well known for their potent anti-inflammatory and anti-allergic properties. In mast cells, glucocorticoids inhibit the release of inflammatory mediators and the expression of pro-inflammatory genes. These processes are triggered by antigenic crosslinking of the high affinity receptor for IgE FcεRI and are associated with an activation of the MAP kinases ERK1/2, JNK and p38 MAPK. FcεRI surface expression and antigen-induced phosphorylation of MAP kinases are inhibited by glucocorticoids. In the work presented here, the mechanisms of glucocorticoid-dependent down-regulation of IgE receptor surface expression and negative regulation of p38 MAP kinase and ERK1/2 activity in bone marrow derived mast cells (BMMC) were analysed.

Down-regulation of FcεRI surface expression is a relatively late effect of glucocorticoids which occurred after 16 hours treatment of BMMC with dexamethasone. Dexamethasone did not affect the mRNA levels of the FcεRI subunits FcεRIα, β and γ, but decreased the β subunit at the protein level. Using different inhibitors it was shown, that reduction of FcεRIβ requires the glucocorticoid receptor, *de novo* protein synthesis and the activity of the proteasome pathway. BMMC, treated for 2-24 hours with dexamethasone, showed an enhanced expression of the MAP kinase phosphatases MKP-1 and MKP-2 and the protein tyrosine phosphatase PEP. By analyzing BMMC derived from PEP and MKP-1 knockout (KO) mice it was shown that the repression of phosphorylation of ERK1/2 by dexamethasone is independent of PEP and MKP-1. Moreover PEP KO BMMC treated with glucocorticoid also showed a decreased phosphorylation of p38 MAPK compared to the control, whereas in MKP-1 deficient BMMC dexamethasone failed to repress the activity of this kinase. This MKP-1-mediated inhibition of p38 MAPK phosphorylation was only observed four and eight hours after glucocorticoid treatment. MKP-1 KO BMMC cultured for a longer time in the presence of dexamethasone showed a decrease in p38 MAPK phosphorylation similar to the wild-type cells, indicating that the contribution of MKP-1 to the mediation of glucocorticoid action is only restricted to a relatively short time after glucocorticoid treatment. A reduction of MKP-2 expression in wild-type BMMC by MKP-2 siRNA did not abolish the repression of p38 MAPK and ERK1/2 phosphorylation by dexamethasone. Similarly the glucocorticoid-mediated down-regulation of expression of the pro-inflammatory genes TNF-α, IL-6, MCP-1 and MMP13 was not altered in MKP-1 KO BMMC and BMMC transfected with MKP-2 siRNA. MKP-1 knockout mice were however highly susceptible to systemic anaphylaxis. Nevertheless dexamethasone was able to suppress the IgE/antigen-induced anaphylactic reaction.

Taken together, the findings of these studies demonstrate that inhibition of IgE receptor-dependent p38 MAPK-phosphorylation by dexamethasone is mediated by induction of MKP-1. However MKP-1 does not suffice for the mediation of the negative regulatory actions of glucocorticoids in BMMC.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	2
Inhaltsverzeichnis	3
1. Einleitung	7
1.1 Glukokortikoidhormone.....	8
1.2 Wirkungsweise der Glukokortikoide.....	10
1.3 <i>Bone marrow derived Mouse Mast cells</i> als Modell zur Untersuchung der Glukokortikoid-vermittelten Hemmung von MAP Kinase-Signalwegen....	14
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	19
2. Material	20
2.1 Chemikalien.....	20
2.2 Zellkulturchemikalien und Zytokine.....	21
2.3 Antikörper.....	21
2.4 siRNA.....	22
2.5 Oligonukleotidprimer.....	22
2.6 Plasmidkonstrukte.....	23
2.7 Enzyme und sonstige Reagenzien.....	24
2.8 Mäusestämme.....	24
3. Methoden	26
3.1 Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren.....	26
3.1.1 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien.....	26
3.1.2 Präparation von kleinen Mengen Plasmid-DNA.....	26
3.1.3 Präparation von großen Mengen Plasmid-DNA.....	27
3.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	27
3.1.5 Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA.....	28
3.1.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	28
3.1.7 Isolation von Gesamt-RNA.....	29
3.1.8 cDNA-Synthese und RT-PCR.....	30
3.1.9 quantitative Real time-PCR-Analyse.....	30
3.2 Methoden zur Analyse von Proteinen.....	31
3.2.1 Herstellung von Gesamtzell-Lysaten.....	31
3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	32
3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
3.2.4 Western blot-Analyse.....	32
3.2.5 Strippen von Western blot-Membranen.....	33
3.2.6 Co-Immunopräzipitation-Analyse.....	34
3.2.7 Detektion von Oberflächenproteinen mittels Durchflusszytometrie ...	35

3.2.8	Luziferase-Reportergen-Analyse	35
3.3	Genotypisierung von Knockout-Mäusen	36
3.3.1	Isolation von genomischer DNA	36
3.3.2	Bestimmung des Genotyps mittels PCR mit Genlocus-spezifischen Primern.....	36
3.4	Zellkultur-Experimente.....	37
3.4.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	37
3.4.2	Generierung von <i>bone marrow derived mouse mast cells</i> (BMMC) ...	37
3.4.3	Bestimmung der Zellzahl.....	38
3.4.4	Stimulierung von BMMC	39
3.4.5	Transiente Transfektion	40
3.5	Passive systemische Anaphylaxie.....	40
4.	Ergebnisse	41
4.1	Selektive Hemmung der IgE-Rezeptor-vermittelten Phosphorylierung von ERK1/2 und MAP Kinase p38 in Glukokortikoid-behandelten Mastzellen	41
4.2	Negative Regulation der IgE-Rezeptor-Expression durch Glukokortikoide....	43
4.2.1	Glukokortikoide reprimieren die Oberflächenexpression des IgE- Rezeptors FcεRI.....	43
4.2.2	Dexamethason reduziert die Proteinmenge der β-Untereinheit des IgE- Rezeptors.....	45
4.2.3	Die negative Regulation der β-Untereinheit des IgE-Rezeptors benötigt den Glukokortikoidrezeptor und eine <i>de novo</i> Proteinsynthese	47
4.2.4	Die Hemmung des proteasomalen Protein-Abbauweges verhindert die Glukokortikoid-abhängige Reduktion der β-Untereinheit des IgE- Rezeptors.....	49
4.3	Glukokortikoide erhöhen die mRNA-Menge der Phosphatasen PEP, MKP-1 und MKP-2 in BMMC	51
4.4	Effekt von Dexamethason auf die IgE-Rezeptor-abhängige p38 MAP Kinase- und ERK1/2-Phosphorylierung in BMMC von PEP Knockout- Mäusen.....	57
4.4.1	Glukokortikoide regulieren die PEP-Expression auf Promotorebene .	57
4.4.2	Die Repression der ERK1/2- und p38 MAP Kinase-Phosphorylierung in Dexamethason-behandelten BMMC erfolgt unabhängig von PEP .	59
4.5	Die Glukokortikoid-vermittelte Repression der p38 MAP Kinase- Phosphorylierung ist in MKP-1-defizienten BMMC beeinträchtigt.....	61
4.6	Eine Reduktion der MKP-2-Expression mittels siRNA hat keinen Einfluss auf die Hemmung der ERK1/2- und p38 MAP Kinase-Phosphorylierung durch Dexamethason.....	64

4.7	Die Wirkung von Dexamethason auf die Expression von pro-inflammatorischen Genen in MKP-1 Knockout- und MKP-2 Knockdown-BMMC	66
4.8	Die antigeninduzierte systemische anaphylaktische Reaktion in MKP-1 Knockout-Mäusen wird durch Dexamethason gehemmt.....	68
5.	Diskussion	71
5.1	Die positive Regulation von Tyrosinphosphatase-Genen in Dexamethason-behandelten Mastzellen.....	72
5.2	Die Induktion von MKP-1 als Grundlage für die Glukokortikoid-abhängige Hemmung der p38 MAP Kinase-Phosphorylierung	74
5.3	Glukokortikoid-abhängige Regulation der Oberflächenexpression des hoch affinen IgE-Rezeptors FcεRI	75
5.4	Dexamethason hemmt die Expression der FcεRIβ-Untereinheit in BMMC auf Proteinebene.....	76
5.5	Die Bedeutung der MKP-1-Induktion für die Glukokortikoid-abhängige Repression von Entzündungsgenen	79
5.6	Die Fähigkeit von Glukokortikoiden, die IgE/Antigen-induzierte anaphylaktische Reaktion zu reprimieren, benötigt keine MKP-1-Induktion	81
6.	Referenzen	85
7.	Abkürzungen	99

1. Einleitung

Seit der Entdeckung der antirheumatischen Wirkung des Kortisons Ende der vierziger Jahre (Hench et al, 1949) gehören Glukokortikoide zu den wirksamsten Medikamenten bei der Behandlung von allergisch entzündlichen Erkrankungen. Sie sind wichtiger Bestandteil der Therapie bei zahlreichen Krankheiten wie zum Beispiel Asthma bronchiale, rheumatoide Arthritis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen und Allergien. Dabei stehen ihre entzündungshemmenden, immunsuppressiven und antiallergischen Eigenschaften im Vordergrund. Wegen ihrer vielseitigen Effekte auf den Knochen- und Calciumstoffwechsel, den Elektrolythaushalt, das Herz-Kreislaufsystem und den Stoffwechsel kommt es jedoch im Rahmen einer längerfristigen Therapie auch zu unerwünschten Nebenwirkungen. Diese negativen Wirkungen stellen in ihrer vollen Ausprägung das iatrogene Cushing-Syndrom dar, und können zu schwerwiegenden, teilweise irreparablen Schäden, wie z.B. einer Osteoporose oder Diabetes mellitus führen (Lukert und Raisz, 1990; Biering et al, 2000) (s. Tab.1).

Schon seit Beginn der klinischen Verwendung der Glukokortikoide bemüht sich die pharmazeutische Chemie um die Entwicklung synthetischer Glukokortikoid-Derivate, welche adäquate antiphlogistische und verminderte unerwünschte Wirkungen besitzen. Versuche zur Vermeidung von Nebenwirkungen durch alleinige Strukturveränderungen am Molekül sind aufgrund der komplexen Wirkungsweise der Glukokortikoide bisher relativ erfolglos geblieben (Schäcke et al, 2002a). Um potente, selektiv wirkende Glukokortikoidanaloga entwickeln zu können, ist es daher unerlässlich aufzuschlüsseln, welche molekularen und zellulären Mechanismen für die therapeutischen Wirkungen von Glukokortikoiden verantwortlich sind.

System	Unerwünschte Wirkungen
Endokrines System/Stoffwechsel	Nebenniereninsuffizienz Hypogonadismus Diabetes mellitus Gewichtszunahme
Knochenstoffwechsel	Osteoporose Knochennekrose
Muskulatur	Myopathie
Haut/Bindegewebe	Wundheilungsstörungen Atrophien, Akne
Augen	Katarakt (grauer Star) Glaukom (grüner Star)
Magen-Darmsystem	Ulzera, Pankreatitis
Kardiovaskuläres/renales System	Bluthochdruck, Ödeme

Tab.1 Unerwünschte Wirkungen und Symptome einer Langzeittherapie mit Glukokortikoiden (nach Schäcke et al, 2002b)

1.1 Glukokortikoidhormone

Glukokortikoide sind Steroidhormone, die neben den Mineralokortikoiden und Androgenen in der Nebennierenrinde gebildet werden. Ausgangsprodukt der Glukokortikoide ist das Cholesterin, welches in den Mitochondrien und im endoplasmatischen Retikulum durch eine Folge von enzymatischen Modifikationen zu Kortikosteron und Kortisol, dem physiologisch wichtigsten Glukokortikoid des Menschen umgewandelt wird. Die Biosynthese der Glukokortikoide steht unter regulatorischer Kontrolle der Hypothalamus-Hypophysenvorderlappen-Nebennierenrinden-Achse (HPA). Das im Hypothalamus gebildete Corticotropin-Releasing Hormon (CRF) regt über das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) die Synthese der Glukokortikoidhormone in der inneren Zone der Nebennierenrinde an (Chrousos, 1995). Bei erhöhten Kortikoidspiegel im Blut kommt es aufgrund eines negativen Rückkopplungsmechanismus zu einer Hemmung der CRF- und ACTH-Freisetzung (Baxter und Rousseau, 1979). Des weiteren liegt der größte Anteil der sezernierten

Glukokortikoide an Plasmaproteine, wie das Corticosteroid-bindende Globulin und Albumin gebunden vor, was neben der Feedback-Hemmung zur Aufrechterhaltung gleichmäßiger Plasmakonzentrationen beiträgt (Breuner und Orchnik, 2002).

Glukokortikoide sind pleiotrop wirkende Hormone, die an der Regulation zahlreicher Prozesse im Körper beteiligt sind (Baxter und Rousseau, 1979; Schäcke et al, 2002b). Ihre Effekte auf den Stoffwechsel dienen alle der Energiebereitstellung. Sie induzieren die Glukoneogenese und den Glykogen-Abbau in der Leber und hemmen die Glukoseaufnahme in Muskel und Fettgewebe. Ihre katabole Wirkung auf den Lipid- und Proteinstoffwechsel setzt Glycerol, Fettsäuren und Aminosäuren frei. Letztere werden wieder zur Glukoneogenese verwendet. Die daraus resultierende Erhöhung des Plasmaglukosespiegels ist insbesondere für die Anpassung an Stresssituationen von Bedeutung (Munck et al, 1984). Unter diesen Bedingungen sind Glukokortikoide auch wichtig für die Vasokonstriktion und Kontraktilität des Herzmuskels.

Neben dem Erhalt der Glukose-Homöostase sind Glukokortikoide auch an der Regulation des Bindegewebe-, Calcium-, und Knochen-Stoffwechsels beteiligt (Grose et al, 2002; Reichardt und Schütz, 1998). Darüber hinaus besitzen sie auch entwicklungsbiologische Relevanz. Bei der Reifung von Leber, Pankreas, Magen-Darm-Trakt und Lunge während der Embryonalentwicklung sind sie von essentieller Bedeutung (Baxter und Rousseau, 1979; Cole et al, 1995). Über ihre zentrale Wirkung können Glukokortikoide Einfluss auf das Gehirn, Gedächtnisleistungen und Verhaltensmuster nehmen (Flanagan-Cato und Fluharty, 1997; De Quervain et al, 1998, Tronche et al, 1999).

Die Wirkungen der Glukokortikoidhormone auf die Immunantwort sind vielfältig und in der Regel supprimierend. In Lymphozyten hemmen Glukokortikoide die Proliferation und die Freisetzung von Zytokinen und induzieren darüber hinaus Apoptose (Lanza et al, 1996; Guizani et al, 1996; Distelhorst 2002). In Mastzellen, Makrophagen und Granulozyten ist die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Entzündungsmediatoren herabgesetzt (Kassel und Cato, 2002; Belvisi, 2004; Valledor und Ricote, 2004). Ebenso wird die Migration und Adhäsion von Mastzellen und anderen Leukozyten durch Glukokortikoide gehemmt (Yamaguchi et al, 1994; Zhang und Thorlacius, 2000; Jeong et al, 2003). Einige der im Rahmen von

Entzündungsreaktionen vermehrt gebildeten Zytokine induzieren die ACTH-abhängige Sekretion von Cortisol durch Aktivierung des HPA-Systems (Auernhammer und Melmed, 1999). Aufgrund ihrer hemmenden Wirkungen auf die Immunantwort, stellen Glukokortikoide demnach ein wichtiges Kontrollsystem der Homöostase dar, indem sie übermäßige Entzündungsprozesse oder allergische Reaktionen unterdrücken und damit verbundene gewebsschädigende Folgen für den Organismus verhindern.

1.2 Wirkungsweise der Glukokortikoide

Nahezu alle Wirkungen der Glukokortikoidhormone werden durch die Bindung des Hormons an ein im Zytoplasma lokalisiertes Rezeptorprotein, den Glukokortikoidrezeptor (GR) vermittelt (Hollenberg et al, 1985). Der GR gehört zur Klasse der Steroidhormonrezeptoren, einer Untergruppe der Proteinfamilie der nukleären Rezeptoren (Mangelsdorf et al, 1995). Im Zytoplasma liegt der GR in inaktiver Form als Bestandteil eines großen Proteinkomplexes zusammen mit verschiedenen Chaperon- und Cochaperon-Molekülen wie z.B. Hsp90, Hsp70 und Immunophilinen vor (Dittmar und Pratt, 1997; DeFranco, 2002). Die Bindung des Glukokortikoids an seinen Rezeptor führt zu Konformationsänderungen innerhalb des Komplexes. Protein-Protein-Wechselwirkungen werden geschwächt, der Komplex dissoziiert und der Liganden-gebundene Rezeptor transloziert in den Kern, wo er auf unterschiedliche Weise die Expression von Genen beeinflussen kann (zur Übersicht siehe Beato, 1989; Cato et al, 1992).

Drei grundsätzlich verschiedene Mechanismen sind für die Regulation der Genexpression durch den GR beschrieben worden (Abb.1). Zum einen agiert der GR als Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor und kann durch Bindung an spezifische Bereiche innerhalb der Promotorstruktur bestimmter Gene, so genannte „glucocorticoid response elements“ (GRE) und negative GRE (nGRE), die Transkription des Zielgens aktivieren (Transaktivierung) oder reprimieren (Transrepression) (Beato et al, 1989; Cato et al, 1992). Das zweite, auch als „Cross-Talk“ bezeichnete Wirkungsprinzip, ist in der Regel GRE-unabhängig und basiert auf der Modulation der transkriptionellen Aktivität von anderen Transkriptionsfaktoren durch Protein-Protein-Wechselwirkungen (Herrlich, 2001). Der dritte Mechanismus

der Regulation der Genexpression durch den GR beruht auf der Interferenz von Glukokortikoiden mit Signaltransduktionswegen, welche die Expression Glukokortikoid-regulierter Gene kontrollieren (Kassel und Cato, 2002; Swantek et al, 1997; Clark und Lasa, 2003).

Die Expression von Genen, die für wichtige Enzyme bei der Glukoneogenese kodieren, werden durch die GRE-medierte Transaktivierung durch Glukokortikoide induziert (Jantzen et al, 1987; Danesch et al, 1987; Imai et al, 1993; Reichardt et al, 1998). Man vermutet daher, dass die bei der Glukokortikoid-Therapie auftretenden unerwünschten metabolischen Effekte hauptsächlich durch die DNA-bindende Eigenschaft des GR und dessen Transaktivierungsfunktion vermittelt werden. Die Expression von Glukokortikoid-regulierten Genen, die eine Schlüsselrolle bei anderen Nebenwirkungen spielen, wie zum Beispiel bei der kortikoid-induzierten Osteoporose, wird nicht ausschließlich durch Transaktivierung reguliert (Schäcke et al, 2002). Dennoch deuten bisherige Studien auf eine zentrale Rolle dieses Mechanismus bei der Regulation von Genen hin, die bei der Vermittlung einiger unerwünschter Wirkungen der Glukokortikoide beteiligt sind (Reichardt et al, 2001).

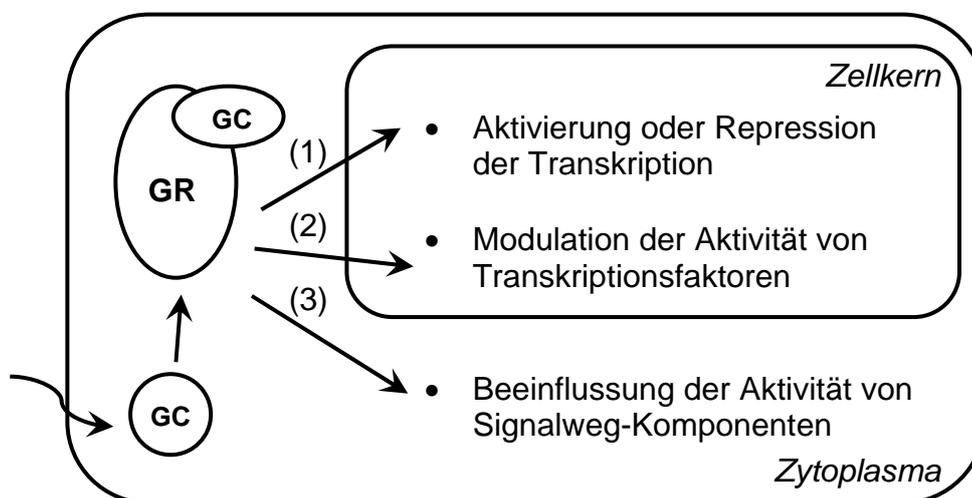


Abb.1 Allgemeine Wirkmechanismen der Glukokortikoide. Glukokortikoide (GC) diffundieren ins Zytoplasma ihrer Zielzellen und binden an den Glukokortikoidrezeptor (GR). Dieser transloziert daraufhin in den Zellkern und kann durch Bindung an bestimmte Promotorbereiche (1) oder durch Protein-Protein-Wechselwirkungen mit anderen Transkriptionsfaktoren (2) die Transkription des Zielgens aktivieren oder reprimieren. Die Beeinflussung von Signaltransduktionswegen durch den GR führt ebenfalls zur Modulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren und somit zur Regulation bestimmter Zielgene (3).

Die Eigenschaft des GR, die Aktivität von Transkriptionsfaktoren und Signalwegkomponenten zu reprimieren, wird dagegen als Grundlage der entzündungshemmenden und anti-allergischen Wirkungen der Glukokortikoide angesehen. Diese Hypothese basiert auf der Tatsache, dass viele Gene, die bei der Entstehung von Entzündungsprozessen beteiligt sind, wie Zytokine, Zytokinrezeptoren, chemotaktisch wirkende Proteine und Adhäsionsmoleküle, unter positiver Kontrolle von Transkriptionsfaktoren stehen, deren Aktivität durch den negativen „Cross-Talk“ mit dem GR inhibiert wird, wie z.B. dem Aktivator Protein 1 (AP-1) und NF- κ B (Jonat et al, 1990; Heck et al, 1997). Die negative Beeinflussung von Signaltransduktionswegen durch Glukokortikoide kann ebenfalls zur Repression der Aktivität pro-inflammatorischer Transkriptionsfaktoren führen (Swantek et al, 1997; Gonzalez et al, 2000). Einen zentralen Stellenwert nehmen dabei die mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAP Kinasen) ein, da sie Komponenten von Signalkaskaden sind, die durch zahlreiche pro-inflammatorische und Stress-auslösende Stimuli (Zytokine, Wachstumsfaktoren, Allergene, Tumorpromotoren) initiiert werden und die Differenzierung und biologischen Funktionen von Entzündungszellen kontrollieren (Chang und Karin, 2001; Dong et al, 2002).

MAP Kinasen werden durch duale Phosphorylierung von konservierten Tyrosin- und Threonin-Resten durch sogenannte MAP Kinase-Kinasen aktiviert, woraufhin sie über Phosphorylierung anderer Proteinkinasen oder Transkriptionsfaktoren die Expression pro-inflammatorischer Gene aktivieren können (Chang und Karin, 2001). Die Hemmung von MAP Kinase-abhängigen Signalwegen durch Glukokortikoide wurde für die MAP Kinasen p38 MAP Kinase, Jun N-terminale Kinasen (JNK) und ERK 1 und 2 (extracellular signal-regulated kinases 1 und 2) beschrieben (Lasa et al, 2002; Swantek et al, 1997; Rider et al, 1996). Während die molekularen Mechanismen des „Cross-Talks“ zwischen dem GR und pro-inflammatorischer Transkriptionsfaktoren, wie AP-1 und NF- κ B in der Vergangenheit sehr intensiv untersucht wurden (De Bosscher, 2003), ist über die genaue mechanistische Grundlage der Repression von MAPK-Signalwegen durch Glukokortikoide bislang zum Teil nur wenig bekannt.

Studien mit Endothelzellen deuten darauf hin, dass die die Glukokortikoid-vermittelte Hemmung der JNK-Phosphorylierung auf einem Transkriptions-unabhängigen Mechanismus basiert (Caelles et, 1997; Conzalez et al, 2000), der die Interaktion des

GR mit dieser MAP Kinase involviert (Bruna et al, 2003). Die Bindung von JNK durch den GR hemmt den Transfer der Kinase in den Zellkern und könnte somit die JNK-abhängige Phosphorylierung von c-Jun, einer Komponente des dimeren Transkriptionsfaktors AP-1 verhindern. Die GR-mediierte Regulation der JNK-Aktivität wird daher auch als alternativer Mechanismus zur Repression AP-1-regulierter Entzündungsgene, wie z.B. Tumor Nekrosis Faktor alpha (TNF- α), angesehen (Swantek et al, 1997; Bruna et al, 2003). Auch in Mastzellen findet die negative Regulation der JNK-Aktivität durch Glukokortikoide unabhängig von einer *de novo* Proteinsynthese statt (Kassel und Cato, 2001). Im Gegensatz dazu, benötigt die Glukokortikoid-vermittelte Hemmung der MAP Kinasen ERK 1 und 2 und der p38 MAP Kinase die Neusynthese eines oder mehrerer Proteine. Ebenso wurde nachgewiesen, dass die Aktivität einer Proteintyrosinphosphatase an der negativen Regulation dieser Kinasen beteiligt ist, was auf eine Glukokortikoid-induzierte Dephosphorylierung von ERK1/2 und der p38 MAP Kinasen indeutet (Kassel et al, 2001; Lasa et al, 2002).

Die p38 MAP Kinase- und ERK1/2-abhängigen Signalwege sind nicht allein für die Regulation der Expression von pro-inflammatorischen Genen von Bedeutung. In basophilen Granulozyten und Mastzellen sind sie darüber hinaus an der Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie anaphylaktisch wirkende Aminene und Eikosanoiden beteiligt (Hirasawa et al, 1995; Zhang et al, 1997, Gibbs, 2002). Diese Prozesse werden ebenfalls durch Glukokortikoide gehemmt (Daeron et al, 1982; Rider et al, 1996; Ecklund et al, 1997; Sewell et al, 1998; Kassel und Cato, 2001). Die negative Regulation der Aktivität dieser MAP Kinasen wird auch deshalb als eine wichtige Grundlage der entzündungshemmenden und anti-allergischen Wirkungen der Glukokortikoide angesehen. Es ist daher von besonderem Interesse, die molekularen Mechanismen der Glukokortikoid-vermittelten Hemmung der p38 MAP Kinase- und ERK1/2-Phosphorylierung zu entschlüsseln, um so die Relevanz dieses Wirkungsprinzip für die therapeutischen Effekte der Glukokortikoide beurteilen zu können.

1.3 *Bone marrow derived Mouse Mast cells* als Modell zur Untersuchung der Glukokortikoid-vermittelten Hemmung von MAP Kinase-Signalwegen

Mastzellen eignen sich sehr gut als System, um die Regulation von MAP Kinase-Signalwegen durch Glukokortikoide im Zusammenhang mit der Hemmung von allergisch entzündlichen Prozessen zu untersuchen. Mastzellen sind Effektorzellen der spezifischen und unspezifischen Immunantwort. Sie übernehmen wichtige Funktionen bei der frühen und späten Phase von Allergien und bei der Abwehr mikrobieller Pathogene (Wedemeyer et al, 2000; Galli et al, 2005). Zahlreiche Entzündungserkrankungen zeichnen sich durch eine verstärkte Beteiligung von Mastzellen aus. Beispiele dafür sind die Atopische Dermatitis, das allergische Asthma bronchiale, Rheumatoide Arthritis und Multiple Sklerose (Chiaparra et al, 2001; Bradding und Holgate, 1999; Kruger, 2001).

Mastzellen sind ubiquitär vorkommende Bindegewebszellen, die aus hämatopoietischen (CD34 positiven) Stammzellen des Knochenmarks entstehen und als unreife Vorläuferzellen im peripheren Blut zirkulieren (Metcalf et al, 1997). Von dort aus wandern sie ins Gewebe der meisten Organe ein und reifen unter Einfluss von Wachstumsfaktoren zu Mastzellen aus. Erhöhte Mastzellzahlen findet man in Geweben, welche in direktem Kontakt mit der Umwelt stehen, wie in der Haut und in den Schleimhäuten von Auge, Nase, Gastrointestinal- und Respirationstrakt.

Die wichtigsten Wachstumsfaktoren für Mastzellen sind der Stem Cell Factor (SCF oder c-Kit ligand) und das Interleukin 3 (IL-3) (Metcalf et al, 1997; Kitamura et al, 1993; Kirshenbaum et al, 1992). Die Effekte des SCF werden über einen membranständigen Tyrosinkinaserzeptor (c-Kit oder CD117) vermittelt und sind sowohl für die Proliferation von c-Kit positiven Stammzellen im Knochenmark, als auch für die Einwanderung der Mastzellvorläufer aus dem Blut ins Gewebe von Bedeutung (Ashman, 1999; Tsuji et al, 1992; Dastych und Metcalf, 1994). Den c-Kit-Rezeptor exprimieren neben hämatopoetischen Stammzellen und Mastzellen nur noch wenige andere Zellen (Besmer et al, 1993). SCF wird von Stromazellen des Knochenmarks, von Fibroblasten, Melanozyten und Endothelzellen und von Mastzellen selbst produziert (Denburg, 1995; Galli et al, 1994; Heinrich et al, 1993,

Welker et al, 1999). Das in den Geweben synthetisierte SCF wirkt auf die Mastzellvorläuferzelle chemotaktisch (Sundstrom et al, 2001). Die Zellen wandern in die Gewebe ein und weitere Chemokinrezeptoren und Mastzell-spezifische Proteine werden exprimiert (Oliveira und Lukacs, 2001). Schließlich verbleiben die ausgereiften Vorläufer als residente Mastzellen in Bindegewebe und können dort mehrere Monate überleben. IL-3 hat ähnliche Effekte auf CD34 positive Zellen wie SCF (Lantz und Huff, 1995). Bei Mäusen und Ratten ist es ebenfalls ein Überlebensfaktor für ausdifferenzierte Mastzellen, während reife humane Mastzellen keine IL-3-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren.

Primäre Mastzellen lassen sich *in vitro* durch 4- bis 5-wöchige Kultivierung von murinen Knochenmarkszellen in Gegenwart von SCF, IL-3 und fetalem Kälberserum gewinnen (Tsuji et al, 1991; Gurish et al, 1992; Rottem et al, 1993; Haig et al, 1994; Rottem et al, 1994). Die als *Bone marrow derived Mouse Mast cells* (BMMC) bezeichneten Zellen sind CD34 und c-Kit positive Zellen mit mastzellspezifischen Markern, wie Mastzellproteasen und der hoch affinen IgE-Rezeptor Fc ϵ RI (Razin et al, 1982; Razin et al, 1983; Broide et al, 1988). BMMC werden häufig als System verwendet, um die zellulären Prozesse der c-Kit- oder Fc ϵ RI-abhängigen Mastzellaktivierung zu studieren.

Die Stimulierung des hoch affinen IgE-Rezeptors Fc ϵ RI stellt die immunologische Aktivierung der Mastzelle dar. Der Fc ϵ RI-Rezeptor wird bei Mäusen und Ratten neben Mastzellen auch auf der Oberfläche von basophilen Granulozyten exprimiert (Blank et al, 1989; Ra et al, 1989). Er gehört zur Proteinfamilie der Immunglobulin Fc-Rezeptoren und besteht aus einer IgE-bindenden α -Kette, einer tetra-transmembranen β -Untereinheit und zwei γ -Ketten, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Ra et al, 1989; Ravetch und Kinet, 1991). Die multimeren Fc ϵ RI-Rezeptoren sind *in vivo* immer mit IgE-Molekülen beladen, die bei Kontakt mit einem Allergen (Antigen) von B-Lymphozyten produziert werden. Beim erneuten Kontakt mit dem selben Antigen werden die IgE-Rezeptoren durch das spezifische Antigen gebunden und kreuzvernetzt, wodurch neben Calcium-abhängigen auch MAP Kinase-vermittelte Signalkaskaden aktiviert werden (Turner und Kinet, 1999). Diese antigeninduzierten Ereignisse initiieren schließlich drei

unterschiedliche zelluläre Prozesse, die in der Freisetzung von pro-inflammatorischen Molekülen resultieren: Die Mastzelldegranulation, den Arachidonsäure-Metabolismus und die Expression von Entzündungsgenen (Abb.2).

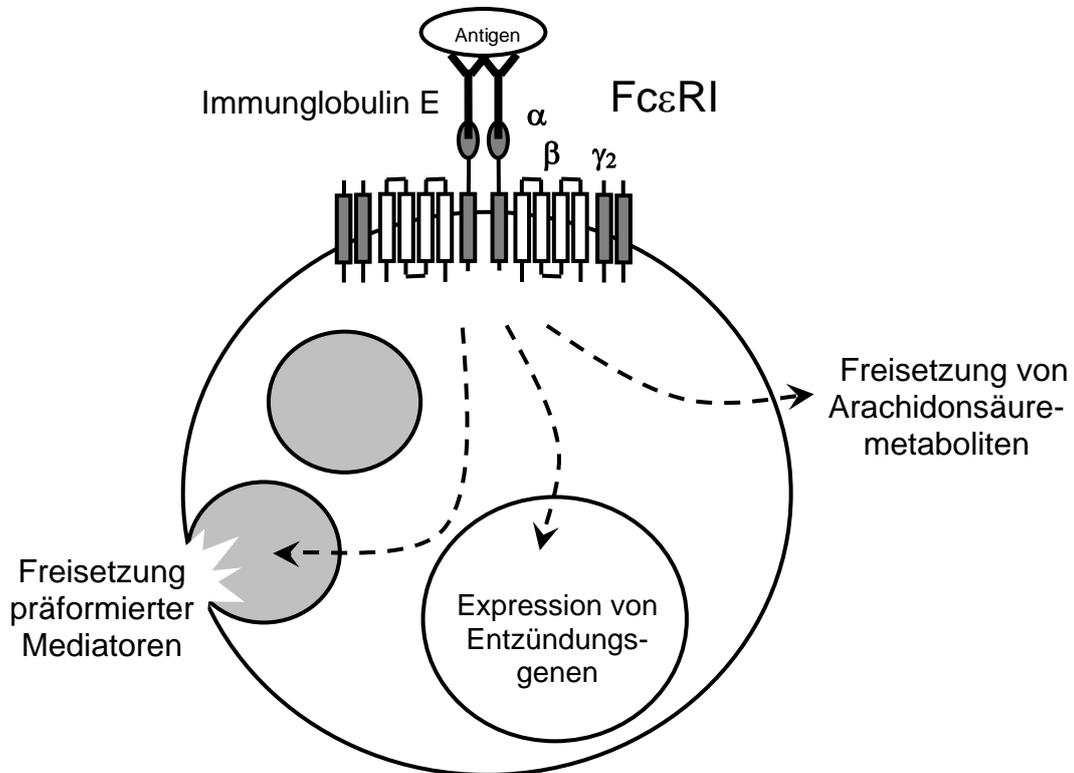


Abb.2 IgE/Antigen-induzierte Prozesse in Mastzellen. Die Aktivierung des hoch affinen IgE-Rezeptor FcεRI induziert zelluläre Ereignisse, die in der exozytotischen Freisetzung von präformierten Entzündungsmediatoren aus Granula (Degranulation), der Produktion von Lipid-Mediatoren aus Arachidonsäure und der Synthese von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen resultieren.

Bei der Degranulation werden präformierte, in Granula gespeicherte Entzündungsmediatoren, wie anaphylaktisch wirkende Amine (z.B. Histamin und Serotonin) und proteolytische Enzyme durch Exozytose, in die Umgebung der Mastzelle sezerniert (Schneider et al, 1992; Ishizaka et al, 1984; Stevens und Austen, 1989). Diese Substanzen wirken auf glatte Muskelzellen, wie sie in der Bronchien- und Alveolarwand vorkommen, kontraktil. Sie führen zu Vasodilatation und erhöhen die Kapillarpermeabilität und Rekrutierung von anderen Zellen zum Entzündungsort. Die IgE-vermittelte Mastzelldegranulation geschieht innerhalb von wenigen Minuten und korreliert mit den akuten allergischen Reaktionen von Typ-I-Allergien, wie sie

beim Asthma bronchiale und bei Heuschnupfen anzutreffen sind (Hart, 2001; Bingham und Austen, 2000).

Der zweite Prozess bei der IgE-Rezeptor-abhängigen Mastzellstimulierung ist die Aktivierung des Arachidonsäure-Metabolismus in der Zellmembran (Ishizaka und Ishizaka, 1984; Zhang et al, 1997). Durch den oxidativen Abbau von Arachidonsäure entstehen wichtige Lipid-Mediatoren (Eikosanoide), hauptsächlich Prostaglandine und Leukotriene, deren Freisetzung ebenfalls zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Bronchiokontraktion, Vasodilatation und Chemokinese beiträgt.

Schließlich wird auch die Expression von zahlreichen Entzündungsgenen induziert. Pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine, wie z.B. Tumor Necrosis Faktor (TNF)- α (Gordon und Galli, 1991), GM-CSF (Wodnar-Filipowicz et al, 1989) und IL-13 (Plaut et al, 1989) werden verstärkt synthetisiert und gelangen in die extrazelluläre Umgebung der Mastzelle, wo sie zur Stimulierung von Granulozyten und Lymphozyten beitragen (Wang und Thorlacius, 2005; Maezawa et al, 2003).

Die p38 MAP Kinase und ERK1/2 sind in Mastzellen sowohl an der Mediatorfreisetzung als auch an der Regulation der Expression einiger Entzündungsgene beteiligt (Gibbs et al, 2002; Kimata et al, 2000; Kassel und Cato, 2002; Hirasawa et al, 2000; Masuda et al, 2002). Von einer Glukokortikoid-abhängigen Hemmung der ERK1/2-Phosphorylierung in Mastzellen wurde bereits berichtet (Rider et al, 1996). Untersuchungen zum Mechanismus der negativen Regulation der Aktivität dieser Kinasen durch Glukokortikoide haben jedoch zu unterschiedlichen Hypothesen geführt.

Beaven und Mitarbeiter postulieren, dass Glukokortikoide die Expression der inhibitorischen Adaptormoleküle Dok-1 und SLAP-1, die im Fc ϵ RI-Signaltransduktionsweg proximal von ERK1 und ERK2 liegen, induzieren und so die antigeninduzierte Phosphorylierung dieser MAP Kinasen hemmen (Hiragun et al, 2005; Hiragun et al, 2006). Im Gegensatz dazu existieren Hinweise für eine Beteiligung der MAP Kinase Phosphatase (MKP) 1 an der Glukokortikoid-abhängigen Regulation von ERK1/2 in Mastzellen (Kassel et al, 2001). MKP-1 ist eine Tyrosin/Threonin-Phosphatase, deren Expression in verschiedenen Zelltypen durch Glukokortikoide induziert wird (Kassel et al, 2001; Lasa et al, 2002; Jeong et al, 2002).

Ein MKP-1-abhängiger Mechanismus wurde auch im Fall der Glukokortikoid-vermittelten negativen Regulation der p38 MAP Kinase-Phosphorylierung in humanen Cervix-Karzinomzellen vermutet (Lasa et al, 2002). Darüber hinaus deuten Ergebnisse verschiedener Studien mit Makrophagen von MKP-1 Knockout-Mäusen auf eine Beteiligung von MKP-1 bei der Kontrolle der Endotoxin-induzierten p38 MAP Kinase-Phosphorylierung hin, weshalb MKP-1 als ein wichtiger negativer Regulator von p38 MAP Kinase-regulierten Entzündungsprozessen angesehen wird (Hammer et al, 2006; Zhao et al, 2006; Salojin et al, 2006; Chi et al, 2006).

Diese Befunde weisen auf eine Beteiligung der Phosphatase MKP-1 bei der negativen Regulation der p38 MAP Kinase- und ERK1/2-Aktivität durch Glukokortikoide hin. Die Bedeutung der MKP-1-Induktion für die IgE-Rezeptor-abhängige p38 MAP Kinase-Phosphorylierung in Mastzellen wurde jedoch bislang nicht untersucht. Ebenso ist noch unklar, welchen Stellenwert MKP-1 bei der Hemmung der antigeninduzierten ERK1/2-Phosphorylierung einnimmt und welche Rolle weitere Glukokortikoid-Effekte dabei spielen. Folglich bedarf es noch weiterer Analysen, die zur Klärung der mechanistischen Grundlage der Glukokortikoid-abhängigen Regulation der p38 MAP Kinase- und ERK1/2-Phosphorylierung in IgE/Antigen-stimulierten Mastzellen beitragen könnten.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Promotionsarbeit ist es, die molekularen Mechanismen der Glukokortikoid-abhängigen negativen Regulation der ERK1/2- und p38 MAP Kinase-Phosphorylierung in BMMC zu entschlüsseln. Weiterhin soll geklärt werden, ob diese Wirkungsprinzipien verantwortlich sind für die Fähigkeit der Glukokortikoide, die IgE/Antigen-induzierten Funktionen der Mastzelle zu inhibieren.

2. Material

2.1 Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
Acrylamid/Bis-Acrylamid (30/0,8)	Roth, Karlsruhe
Agarose	peqLab, Erlangen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma, Taufkirchen
ALLN	Calbiochem, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Bacto-Agar	Otto Nordwald KG, Hamburg
Bafilomycin A1	Sigma, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Borsäure, kristallin	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserum-Albumin)	PAA Laboratories, Cölbe
Coelenterazin	Byosinth, Gstaat, Schweiz
Dexamethason	Sigma, Taufkirchen
Dexamethason, water soluble	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Neu-Ulm
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Epoxomicin	Biomol, Hamburg
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid, deionisiert	Roth, Karlsruhe
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycylglycin	Sigma, Taufkirchen
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen
Luziferin	Roche, Mannheim
MG132	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
4-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Sigma, Taufkirchen
Nonidet P-40 (NP40)	Sigma, Taufkirchen

PMSF	Sigma, Taufkirchen
Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC)	Sigma, Taufkirchen
Protein-G-Agarose	Upstate, Hamburg
RU486	Sigma, Taufkirchen
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA)	Sigma, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tris base	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Tween20	Roth, Karlsruhe

2.2 Zellkulturchemikalien und Zytokine

Chemikalie	Bezugsquelle
Dinitrophenyl-HSA (DNP-HSA)	Sigma, Taufkirchen
Fötales Rinderserum (FBS)	Biowhittaker, Belgien
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe
murines anti-DNP IgE (Klon SPE-7)	Sigma, Taufkirchen
murines Interleukin-3 (IL-3), rekombinant	Peptotech, London
Iscove's Modified Dulbecco's Medium IMDM	Gibco, Karlsruhe
PBS	Gibco, Karlsruhe
Pyruvat	Gibco, Karlsruhe
murines SCF, rekombinant	Peptotech, London und freundlicherweise von Michael Stassen zur Verfügung gestellt (Stassen et al, 2006).

2.3 Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Primärantikörper	
Anti-ERK2 (D2)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-FcεRI β (monoklonal)	Zur Verfügung gestellt von R. P. Siraganian
Anti-MKP-1 (M-18)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-MKP-2 (S-18)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-IgE, Klon R35-72	Pharmingen, Heidelberg
normales IgG (Ratte)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-PEP	Zur Verfügung gestellt von A. Chan (Hasegawa et al, 2004)
Anti-p38 MAPK (C-20)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	Cell Signalling, Frankfurt
Anti-phospho-p44/p42 MAPK (Thr202/Tyr204)	Cell Signalling, Frankfurt

Sekundärantikörper

Anti-Kaninchen, HRP-konjugiert	Dako, Hamburg
Anti-Maus, HRP-konjugiert	Dako, Hamburg
Anti-armenischer Hamster, FITC-konjugiert	Jackson ImmunoResearch Laboratories, UK

Antikörper für die Durchflusszytometrie

Anti-c-Kit (CD117), PE-konjugiert	Pharmingen, Hamburg
Anti-FcεRI α, Klon MAR-1	eBioscience, San Diego
Anti-IgE, FITC-konjugiert	Pharmingen, Hamburg

2.4 siRNA

Die siRNA-Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg bezogen.

MKP-2-siRNA (Dusp4_2254)	5'-CCAGAUCACUGAAGAUAA(dTdT)-3'
Kontroll-siRNA (DsRed/drFP583)	5'-UUGGAGCCGUACUGGAACU(dTdT)-3'

2.5 Oligonukleotidprimer

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, und Metabion, Martinsried, bezogen.

Primer für die Genotypisierung von Knockout-Mäusen

MKP-1 (Dusp1)	erpII _{fw}	5'-CAGGTACTGTGTGTCGGTGGTGCTAATG-3'
	erpII _{rev}	5'-CTATATCCTCCTGGCACAATCCTCCTAG-3'
neo-Cassette	HHneo	5'-AAATGTGTCAGTTTCATAGCCTGAAGAACG-3'
PEP (Ptpn22)	KH-1	5'-AATGCCCGCTTGATGAGCAGAGGTCTG-3'
	KH-2	5'-GGCTTCTTTCAGTAGTTGCTGCAGAAT-3'
neo-Cassette	KH-4	5'-TGCTAAAGCGCATGCTCCAGACTGC-3'

Primer für die Real-time PCR-Analyse

β-Actin (Actb)	For	5'-TGGCCATCTCTTGCTCGAA-3'
	Rev	5'-TCACCCACACTGTGCCCAT-3'
36B4 (Arbp)	For	5'-GGACCCGAGAAGACCTCCTT-3'
	Rev	5'-GCACATCACTCAGAATTTCAATGG-3'

Primer für die Real-time PCR-Analyse

FcεRIα (Fcer1a)	For 5'-GCAAGGGCTATCTTAGGCAGG-3' Rev 5'-TTGAGAGCAATAACCCCGTGT-3'
FcεRIβ (Ms4a2)	For 5'-GGCCTTTTGCAGTGCTGTG-3' Rev 5'-TGTTTCCCCTTTGTCTCCCAA-3'
FcεRIγ (Fcer1g)	For 5'-GCCGTGAGAAAGCAGATGC-3' Rev 5'-CAAGAGGGCTCGGAGAGAATT-3'
MKP-1 (Dusp1)	For 5'-GGATATGAAGCGTTTTTCGGCT-3' Rev 5'-GGATTCTGCACTGTCAGGCA-3'
MKP-2 (Dusp4)	For 5'-CCTGCTTAAAGGTGGCTATGAGA-3' Rev 5'-GGTGCTGGGAGGTACAGGG-3'
MKP-3 (Dusp6)	For 5'-TTTTCCCTGAGGCCATTTCTT-3' Rev 5'-GGCTGATACCTGCCAAGCAA-3'
PEP (Ptpn22)	For 5'-CAGCTTTTCCCCACCGTTAAA-3' Rev 5'-AGACTCGGGTGTCCGTTTCCAG-3'
Ccl2 (MCP-1)	For 5'-GTCCCTGTCATGCTTCTGGG-3' Rev 5'-GGCGTAACTGCATCTGGCT-3'
IL-6 (IL6)	For 5'-TTGGGACTGATGCTGGTGAC-3' Rev 5'-TGGGAGTGGTATCCTCTGTGAAGT-3'
Mmp13 (Clg)	For 5'-CTATGCGTGGCTGGAACCA-3' Rev 5'-AGCACGCAAGAATCAGGTGA-3'
TNF-α (TNF)	For 5'-AGTTCTATGGCCCAGACCCTC-3' Rev 5'-GTTTGCTACGACGTGGGCTAC-3'

2.6 Plasmidkonstrukte

Plasmid	Bezugsquelle
pGL3 PEP	Kodiert das <i>Photinus</i> -Luiziferase-Gen unter der Kontrolle der 5'-upstream Promotorregion (1,7 Kb upstream vom ATG) des murinen <i>pep</i> -Gens, die als <i>Acc651/XhoI</i> -Fragment in den pGL3 Basisvektor kloniert wurde (Hergestellt von A. Moorthy).

Plasmid	Bezugsquelle
pTK Renilla Luc	Promega, Mannheim
pGL3 Basisvektor	Promega, Mannheim
pGL3 MMTV	Kodiert das <i>Photinus</i> -Luiziferase-Gen unter der Kontrolle der <i>long terminal repeat</i> -Region (-241 bis -137) des <i>mouse mammary tumor virus</i> (MMTV), die als BamHI/BglIII-Fragment in den pGL3 Basisvektor kloniert wurde (Schneikert et al, 1999).

2.7 Enzyme und sonstige Reagenzien

Alle verwendeten Restriktionsenzyme, Taq-Polymerase und reverse Transkriptase wurden von der Firma Promega, Mannheim, bezogen. Protein- und DNA-Längenstandards und dNTP wurden von der peqlab, Erlangen, bezogen. Die ECL Lösungen wurden von der Firma Amersham Biosciences, Freiburg, bezogen (*ECL Detection Kit*). Die Bradford-Reagenz (BioRad Protein Assay Dye) wurde von der Firma Biorad, München bezogen.

2.8 Mausstämme

Adulte Mäuse des Stammes C57BL/6J wurden von Harlan Winkelmann, Borcheln, bezogen und werden seit 1995 im Tier-Labor des ITG gezüchtet.

C57BL/6 MKP-1^{+/-} Blastozysten von Mäusen, bei denen das endogene *erp/mkp-1*-Gen durch homologe Rekombination inaktiviert wurde (Insertionsmutation in Exon 2), wurden im Rodrigo Bravo Labor am Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute generiert (Dorfman et al, 1996) und vom Jackson Laboratory, USA, bezogen. MKP-1-Knock-out (KO)-Mäuse wurden mittels Blastozystentransfer generiert und die Nachkommen wurden auf verschiedene genetische Hintergründe gekreuzt. Die für die Zellkultur-Experimente (s. Kapitel 3.4) verwendeten MKP-1-Knock-out-Mauslinie (interne Bezeichnung: B6, MKP-1 (erp)) befand sich in einem gemischten Stammhintergrund von 129 Sv und C57BL/6. Die MKP-1-Knock-out-Mauslinie, die im Anaphylaxie-Modell (s. Kapitel 3.5) verwendet wurde befand sich in einem reinen C3H/He-Stammhintergrund (interne Bezeichnung: C3H/He, MKP-1 (erp)).

PEP-Knock-out-Mäuse, bei denen das endogene *pep/ptpn22*-Gen durch homologe Rekombination inaktiviert wurde, wurden am Andrew Chan Labor generiert (Hasegawa et al, 2004) und über die Firma Genentech Inc., South San Francisco, bezogen und befanden sich in einem reinen C57BL/6-Stammhintergrund (interne Bezeichnung: PEP KO).

Alle Mäuse wurden im Tierlabor des ITG (Sicherheitsstufe S1, GenTG) unter konventionellen (PEP KO) oder SPF-(specific pathogen free)-Bedingungen (B6, MKP-1 (erp), C3H/He, MKP-1 (erp) und C57BL/6J) in einem 12 stündlichen Lichtzyklus gehalten. Die Aufzucht, Haltung und Tötung der Mäuse sowie die tierexperimentellen Studien wurden unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes (TierSchG) durchgeführt.

3. Methoden

3.1 Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren

3.1.1 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien

Zur Transformation von Bakterien wurden 100 µl einer Suspension von chemisch kompetenten Bakterien (DH5a in 10 mM MOPS pH7, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 15% Glycerin) auf Eis aufgetaut und mit 1-10 ng Plasmid-DNA gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 90 Sekunden Schütteln im Heizblock bei 42°C und 2 Minuten auf Eis wurden 450 µl SOC-Medium (2% Bacto-Trypton, 0,5% Bacto-Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glukose) zugegeben und eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 200 µl der Bakteriensuspension auf eine Selektiv-Agarplatten (1% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, 100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht im Bakterienbrutschrank bei 37°C inkubiert.

3.1.2 Präparation von kleinen Mengen Plasmid-DNA

Zur Überprüfung einer vorangegangenen Transformation wurden einzelne Bakterienkolonien gepickt und in 5 ml LB-Medium (1% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, 100 µg/ml Ampicillin) über Nacht bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 1,5 ml Zellsuspension in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und bei 6 000 U/min in einer Tisch-Kühlzentrifuge (Hermle) zentrifugiert. Sowohl die alkalische Lyse der Zellen, als auch die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit Puffern des „Qiagen Plasmid Purification Maxi Kits“ der Firma Qiagen. Dabei wurden die Bakterien in 150 µl Puffer P1 (10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 400 µg/ml RNase A) resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zell-Lyse erfolgte durch Zugabe von 300 µl Puffer 2 und bei 5-minütiger Inkubation auf Eis. Nach Applikation von 225 µl Puffer P3 wurde das Lysat gemischt und erneut für 5 Minuten bei 4°C inkubiert. Membranbestandteile und genomische Bakterien-DNA wurden sedimentiert (12 000 U/min, 10 Minuten, 4°C) und 400 µl des Überstandes wurden in ein neues Eppendorf-Röhrchen transferiert und mit 1 ml eiskaltem Ethanol vermengt. Durch Abkühlung auf -80°C (mindestens 30 Minuten lang) wurde die Plasmid-DNA präzipitiert, anschließend für 10 Minuten bei 4°C und

12000 U/min zentrifugiert und in 1 ml 75% Ethanol gewaschen. Das gereinigte Präzipitat wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert.

3.1.3 Präparation von großen Mengen Plasmid-DNA

Um größere Mengen Plasmid-DNA zu gewinnen, wurden neben den Puffern auch die Chromatographie-Säulen des *Qiagen Plasmid Maxi Kit* verwendet. Hierfür wurden 250 ml LB-Medium inklusive 100 µg/ml Ampicillin mit 200 µl Bakterien-Suspension angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden 10 Minuten bei 6 000 U/min zentrifugiert, in 10 ml Puffer P1 (10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8, 400 µg/ml RNase A) resuspendiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 10 ml Puffer P2 (200 mM NaOH und 1% SDS) und nach sorgfältigem Mischen wurden die Bakterienzellen lysiert. Nach 5 Minuten wurde die alkalische Lyse durch Zugabe von 10 ml Puffer 3 (3 M Natriumacetat pH 4,9) gestoppt und das Lysat wurde für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Die denaturierten Proteine und genomische DNA wurden dann 20 Minuten bei 7500 U/min und 4°C abzentrifugiert und der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand wurde auf eine Qiagen-Säule (Qiagen-tip AX-500) transferiert, die zuvor mit 10 ml QBT Puffer (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7, 15% Isopropanol, 0,15% Triton X-100) equilibriert wurde. Die Säule wurde zweimal mit 30 ml QC Puffer (1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7, 15% Isopropanol) gewaschen und anschließend mit 15 ml QF Puffer (1,25 mM NaCl, 50 mM TrisCl pH 8,5, 15% Isopropanol) eluiert. Die gereinigte DNA wurde dann durch Zugabe von 11 ml Isopropanol präzipitiert, zentrifugiert (30 Minuten, 7 500 U/min, 4°C) und zweimal mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA in 250 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert. Ein Aliquot von 1,5 µl wurde für die Extinktionsmessung zur Bestimmung der DNA-Konzentration verwendet (s. Kapitel 3.1.4).

3.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen wurde spektralphotometrisch durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm bestimmt. Eine OD_{260} von eins entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 40 µg/ml RNA. Durch Messung der OD bei einer

Wellenlänge von 280 nm können Kontaminationen durch Proteine oder Phenol wahrgenommen werden. Bewegt sich der Wert des Verhältnisses von OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ zwischen 1,8 bis 2,0, liegt der Reinheitsgrad der Lösung in einem annehmbaren Bereich. Die Messung der DNA- und RNA-Konzentration erfolgte mit dem UV/Vis-Spektralphotometer NanoDrop ND-1000 (peqlab, Erlangen).

3.1.5 Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA

Zur qualitativen Überprüfung der isolierten Plasmid-DNA wurden 1 µg DNA zusammen mit 10 U des entsprechenden Restriktionsenzym und in Gegenwart der vom Hersteller angegebenen Puffer- und Temperaturbedingungen für 3 Stunden oder über Nacht inkubiert. Das Reaktionsvolumen betrug dabei mindestens das 10-fache des Volumens der zugesetzten glyzerinhaltigen Enzymlösung. Die Inkubation erfolgte für 3 Stunden oder über Nacht in Gegenwart der vom Hersteller angegebenen Puffer- und Temperaturbedingungen. Zur Größenbestimmung und Reinigung der Fragmente wurde die DNA anschließend in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Fragmentgröße erfolgte die Separation von DNA-Fragmenten in Gelen mit einer Agarosekonzentration von 0,8 bis 2%. Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris pH 7,2, 2mM Natriumazetat, 1mM EDTA pH 8) oder 1x TBE-Puffer (90 mM Tris pH 8,3, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA pH 8) durch Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen der Agarose-Lösung auf ca. 60°C wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,3 µg/ml zugegeben und die Agarose wurde in eine horizontale Elektrophoresekammer gegossen. Das polymerisierte Gel wurde mit 1x TAE- bzw. 1x TBE-Puffer überschichtet und die mit DNA-Probenpuffer (10 mM EDTA pH 8, 0,1% SDS, 50% Glycerol, 0,03% Bromphenolblau) versetzten Proben wurden in die ausgesparten Taschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 50-100 V. Unter Verwendung eines Transilluminators (IL-350, Bachofer, Reutlingen) wurden die DNA-Banden unter UV-Licht (256 nm) sichtbar gemacht und anschließend photographiert.

Zur elektrophoretischen Auftrennung von 0,5 µg Gesamt-RNA in einem denaturierenden Agarose-Gel wurde 1 g Agarose in 100 ml MOPS-Puffer, pH 7 (20

mM 4-Morpholinpropansulfonsäure, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA pH 8) gelöst und autoklaviert. Das Gel wurde durch Erhitzen verflüssigt und mit 3 ml 37% Formaldehyd-Lösung versehen, in eine RNase-freie Gelelektrophorese-Kammer gegossen und nach dem Polymerisieren mit MOPS-Puffer beschichtet. Unmittelbar vor dem Auftragen der Proben auf das Gel, wurde die RNA-Proben mit dem 3-fachen Volumen RNA-Probenpuffer (1x MOPS, 17,6% Formaldehyd, 50% deionisiertes Formamid, 3,3 mg/ml Ethidiumbromid, 5% Glycerol, 1 mM EDTA, 0,03% Bromphenolblau) versetzt und für 15 Minuten bei 56°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei 90 V. Das Gel wurde anschließend unter UV-Licht (256 nm) photographiert. Die Integrität sowie das mengenmäßige Verhältnis der 28S und 18S rRNA-Bande (1,5-2) wurden als Parameter für die Unversehrtheit der isolierten Gesamt-RNA herangezogen. Ein 28S/18S-Verhältnis kleiner 1,5 ist ein Hinweis für RNA-Degradationen.

3.1.7 Isolation von Gesamt-RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus BMMC wurde der „NucleoSpin RNA II Kit“ der Firma Macherey-Nagel, Düren, verwendet. Die Zellsuspension wurde zunächst 5 min bei 2000 U/min zentrifugiert und das Medium wurde verworfen. $2-3 \times 10^6$ Zellen wurden durch Zugabe von 350 µl RA1 Puffer + 3,5 µl β-Mercaptoethanol lysiert. Das Lysat wurde 5 mal durch eine Injektionskanüle (20 Gauche, Becton Dickinson, Heidelberg) gesaugt und auf eine NucleoSpin Filtriersäule transferiert und für 1 min bei 13 000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde das homogenisierte Lysat mit 350 µl 70% Ethanol vermischt und auf eine NucleoSpin RNA II Säule pipettiert und für 30 s bei 13 000 U/min zentrifugiert. Durch Zugabe von 350 µl Membrane Desalting Buffer und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 13 000 U/min wurde das an die Siliziumdioxid-Matrix gebundene RNA-Präzipitat gewaschen. Zur Entfernung von genomischer DNA wurden 90 µl eines DNase-Reaktionsansatzes appliziert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Waschen der Säule erfolgte mit 200 µl RA2 Puffer, 600 µl und 250 µl RA3 Puffer + 80% Ethanol, wobei jeweils für 1 min bei 13 000 U/min zentrifugiert wurde. Die gefällte RNA wurde schließlich in 55 µl RNase-freiem Wasser eluiert und für 1 min bei 13 000 U/min zentrifugiert. Ein Aliquot von 1,5 µl wurde für die Extinktionsmessung zur Bestimmung der RNA-Konzentration verwendet (s. Kapitel 3.1.4).

3.1.8 cDNA-Synthese und RT-PCR

Jeweils 0,25-0,5 µg Gesamt-RNA wurde in einem Volumen von 14 µl mit 250 ng Random Oligonukleotidprimern für 5 min bei 70°C und anschließend für 1 min bei 4°C inkubiert. Die Transkription erfolgte in Anwesenheit von 0,5 mM Desoxynukleotidtriphosphat (dNTPs), 200 U Moloney Murine Leukemia Virus-Reverse Transkriptase (M-MLV-RT) und 5 µl 5x Reaktionspuffer in einem Volumen von 25 µl. Zum Nachweis von Rückständen genomischer DNA wurde die gleiche Reaktion in einem 12,5 µl Volumen ohne M-MLV-RT angesetzt („minus RT-Kontrolle“). Beide Ansätze wurden zunächst für 10 min bei 20°C und anschließend für 60 min bei 42°C inkubiert. Die Enzym-Inaktivierung wurde durch 15-minütiges Erhitzen auf 70°C erreicht. Nach 5 min bei 4°C wurden 75 µl Wasser zugegeben. Die daran anschließende Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) diente der qualitativen Kontrolle der synthetisierten cDNA und der Detektion von genomischer DNA. Hierfür wurden 5 µl cDNA-Syntheseansatz mit je 0,5 µM b-Actin-sequenzspezifischen Oligonukleotiden (forward und reverse Primer), 200 nM dNTP-Lösung (je 200 nM dATP; dCTP; dGTP; dTTP; pH 7,0) und 1,25 U Taq-Polymerase und 4 µl 5x PCR-Puffer (Promega, Mannheim) in einem Gesamtvolumen von 20 µl angesetzt. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 94°C für 1 min, die Hybridisierung der Primer bei 60°C für 1 min und die DNA-Synthese bei 72°C für 1 min. Die Amplifikationsprodukte wurden nach 30 Zyklen durch gelelektrophoretische Auftrennung in einem 2% TBE-Agarose-Gel überprüft (s. Kapitel 3.1.6).

3.1.9 quantitative Real time-PCR-Analyse

Bei der quantitativen Analyse der cDNA-Menge ausgewählter Gene mittels Real time-PCR wurden zwei mal 5 µl cDNA-Syntheseansatz mit je 0,5 µM sequenzspezifischen Oligonukleotiden (forward und reverse Primer) und 10 µl 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix der Firma Qiagen, Hilden, in einem Volumen von 20 µl angesetzt. Der verwendete Master Mix enthielt dabei neben dem Farbstoff SYBR Green I, der doppelsträngige DNA bindet, auch den Referenz-Farbstoff ROX sowie dNTPs, die thermostabile Taq-DNA-Polymerase und die für die Enzymaktivität notwendigen Salzkonzentrationen (SYBR Green PCR Puffer). Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen in einem ABI Prism Sequence Detection System 7000 (Applied Biosystems, Darmstadt): Inkubation bei 50°C für 2

min und 95°C für 15 min, gefolgt von 40 Zyklen bestehend aus der Denaturierung bei 95°C für 15 s und der Hybridisierung bei 60°C für 1 min. Nach Ablauf der PCR-Reaktion wurden die generierten Amplifikationsprodukte in einem so genannten Dissoziationsprotokoll 5 min bei 95°C denaturiert und langsam auf 60°C abgekühlt. Hierbei wurde die Kinetik der Renaturierung der komplementären Stränge analysiert und in einer Schmelzkurve dargestellt. Anhand der für jedes Amplikon charakteristischen Schmelzkurve kann überprüft werden, ob unspezifische Primer-DNA-Hybridisierungen zu unerwünschten Nebenprodukten geführt haben.

3.2 Methoden zur Analyse von Proteinen

3.2.1 Herstellung von Gesamtzell-Lysaten

Zur Gewinnung von Gesamtzell-Lysaten, die für die Immunoblot-Analyse des Membranrezeptors FcεRI eingesetzt wurden, wurde NP40 Lyse-Puffer verwendet. Hierbei wurden ca. 2×10^6 BMMC in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 5 min bei RT und 1 500 U/min zentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und die Zellen wurden einmal mit 1 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 55 µl NP40 Lyse-Puffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8, 5 mM EDTA, pH 8, 1% NP40, 1% Protease Inhibitor Cocktail (PIC) Sigma, Taufkirchen) resuspendiert und für 20 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde für 15 min bei 4°C und 12 000 U/min zentrifugiert und das Lysat wurde in ein neues Gefäß überführt. Ein Aliquot von 2 µl wurde zur Bestimmung der Protein-Konzentration verwendet (s. Kapitel 3.2.2).

Um die Phosphatasen MKP-1 und MKP-2 im Immunoblot-Verfahren detektieren zu können, wurde ein SDS-Probenpuffer zum Lysieren der Zellen verwendet. Ca. 2×10^6 BMMC wurden einmal mit PBS gewaschen und 5 min bei RT und 1 500 U/min zentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und die Zellen wurden in 50-100 µl PBS resuspendiert und gegebenenfalls stimuliert (s. Kapitel 3.4.4). Danach wurde das gleiche Volumen 2x SDS-Probenpuffer (160 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau, 4% β-Mercaptoethanol) zugegeben, gemischt (Vortex) und sofort für mindestens 5 min bei 95°C im Heizblock inkubiert. Das Lysat wurde kurz bei 12 000 U/min abzentrifugiert und anschließend mit 5 Impulsen im Ultraschall-Desintegrator sonifiziert (Stufe 2-3; Branson Sonifier, G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd).

3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung der Protein-Konzentration von Gesamtzell-Lysaten (NP40-Lysate) wurden jeweils 2 µl Lysat zu 1 ml 1x Bradford Protein Assay Dye (Biorad, München) gegeben und gevortext. Parallel dazu wurden 2 µl NP40-Lysis Puffer alleine sowie 1, 2, 4 und 6 µl BSA (1 mg/ml) ebenfalls mit 1 ml 1x Bradford Protein Assay Dye gemischt. Aus jedem Ansatz wurden 200 µl in ein Well einer Mikrotiter-Platte pipettiert und die Extinktion bei 595 nm gegen den Leerwert (Bradford Protein Assay Dye mit bzw. ohne NP40-Lysepuffer) in einem ELISA-Lesegerät spektralphotometrisch gemessen. Nach Berechnung der Steigung der BSA-Eichkurve ($m = \text{Extinktion}_{959} [\text{BSA}] / \text{Konzentration} [\text{BSA}]$) wurde die Proteinkonzentration der Lysate anhand deren Extinktionswert bestimmt ($\text{Konzentration} [\text{Lysat}] = \text{Extinktion}_{959} [\text{Lysat}] / 2m$).

3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteinen mittels SDS-PAGE wurde ein 12% Trenngel und ein 5% Sammelgel verwendet. Hierzu wurden zuerst 20-25 ml Trenngel (375 mM Tris, pH 8,8, 12% Acrylamid, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,05 % TEMED) zwischen zwei fixierte Glasplatten (20x20 cm, 1,5 mm Abstand) gegossen und mit 70% Rotisol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Rotisol mit deionisiertem Wasser abgewaschen und 5-10 ml Sammelgel (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 5% Acrylamid, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,1 % TEMED) wurden auf das Trenngel gegossen und mit einem Kamm (15 Taschen) bestückt. Nach dem Auspolymerisieren wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine vertikale Laufapparatur (PerfectBlue Doppelsystem Twin L, Peqlab, Erlangen) eingespannt und mit Laemmli-Puffer (25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1% SDS) bedeckt. Vor dem Auftragen der Proben wurden die Lysate 5-10 min bei 95°C inkubiert und anschließend kurz bei 13 000 U/min abzentrifugiert. Die Gelelektrophorese erfolgte zunächst bei 90 V. Nachdem die Bromphenolblau-Front das Trenngel erreicht hatte, wurde die Spannung auf 150-160 V erhöht.

3.2.4 Western blot-Analyse

Proteine in SDS-Polyacrylamid-Gelen wurden durch Elektrotransfer mit Hilfe einer Nasstransferkammer (Trans-Blot, Bio Rad laboratories GmbH, München) auf eine PVDF-Membran (Immobilon, Millipore) übertragen. Zuvor wurde die Membran für

ca. 2 Minuten in Methanol inkubiert und anschließend 1 mal mit Transferpuffer (25 mM Tris-Base, 190 mM Glycin, 20% Methanol) gewaschen. Membran und Proteingel wurden dann luftblasenfrei zwischen je drei Lagen 3MM Whatman-Papier platziert, mit Hilfe einer Kasette fixiert und in eine mit Transferpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt, so dass die Membran zur Anode hin orientiert war. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 4°C und 300-350 mA. Nach beendetem Transfer wurde die Membran kurz in PBS gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierlösung (TBST (10 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) mit 5% Magermilch) inkubiert. Anschließend wurde die Membran in TBST/5% Milch oder TBST/5% BSA (bei phosphospezifischen Antikörpern) mit dem entsprechenden Primärantikörper (Verdünnung je Antikörper 1:250-1:2000) für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C unter ständigem Rotieren inkubiert. Die Membran wurde dann 3 mal 10 min mit TBST gewaschen und mit dem jeweiligen Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper (1:2000) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils mindestens 10 min in TBST wurde der Sekundärantikörper und damit auch das Zielprotein mit Hilfe von Chemilumineszenz detektiert. Diese Licht-freisetzende Reaktion basiert auf der Oxidation eines Substrates, welche durch die Meerrettich-Peroxidase katalysiert wird. Hierzu wurde die Membran 1 min mit ECL Western blot Reagenzien der Firma Amersham, Braunschweig benetzt, danach mit einer Folie bedeckt und einem Röntgenfilm (ECL oder MP Hyperfilm, Amersha, Braunschweig) exponiert, der anschließend entwickelt wurde.

3.2.5 Strippen von Western blot-Membranen

Um eine Western blot-Membran insgesamt 3 mal mit verschiedenen Antikörpern analysieren zu können, wurde die Membran nach der ECL-Analyse für 10 min mit PBS gewaschen und dann in vorgewärmter „Stripping“-Lösung (62,5 mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 0,75% β -Mercaptoethanol) für 30 min bei 55-60°C unter Schütteln inkubiert. Zur Entfernung des β -Mercaptoethanols und SDS wurde anschließend 5 mal für 15 min mit PBS gewaschen.

3.2.6 Co-Immunpräzipitationsanalyse

Zur Immunopräzipitation der Fc ϵ RI β -Rezeptorkette mit Hilfe eines anti-IgE Antikörpers wurden 10×10^6 BMMC für 2 Stunden in Gegenwart von IgE (0,5 μ g/ml) kultiviert. Die Zellen wurden geerntet und 5 min bei 4°C und 1 500 U/min zentrifugiert und 2 mal mit eiskaltem PBS + 1 mM PMSF + 1 mM Natriumorthovanadat + 1% PIC gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 0,5 ml Lyse-Puffer (0.5 % Triton-X-100, 200 mM Borsäure, 160 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM Natriumorthovanadat, 1% PIC) resuspendiert und für 20 min auf Eis gestellt. Die Lysate wurden 20 min bei 4°C und 12 000 U/min zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Ein Aliquot von je 4 μ l wurde zur Bestimmung der Protein-Konzentration verwendet (s. Kapitel 3.2.2). Von jeder Probe wurde die maximale Menge an Protein entnommen und mit Lyse-Puffer auf 1 ml aufgefüllt, wobei die verwendete Proteinmenge sich nach dem am niedrigsten konzentrierten Lysat richtete. Jedem Lysat wurden 50 μ l 50% Protein-G-Agarose-beads zugegeben und für 1 Stunde bei 4°C rotierend inkubiert (Pre-clearing). Parallel dazu wurden 50 μ l 50% Protein-G-Agarose-beads („Beads“) zusammen mit 5 μ g anti-IgE Antikörper oder 5 μ g IgG-Kontroll-Antikörper 30 min bei 4°C inkubiert. Nach dem Pre-clearing wurde das Lysat für 30 Sekunden bei 12 000 U/min und 4°C abzentrifugiert, die Beads wurden verworfen und der Überstand wurde zu dem mit Protein-G-Agarose-beads vorinkubiertem Antikörper pipettiert, wobei zuvor 20 μ l als Input-Kontrolle entnommen und bei -20 °C gelagert wurden. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden bei 4°C (rotierend) wurden die Protein-G-Agarose-beads 5 mal mit eiskaltem 1 ml Lyse-Puffer gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift 30 Sekunden bei 12 000 U/min und 4°C zentrifugiert wurde und der Überstand mit einer Kanüle (0,40 x 20 mm) entfernt wurde. Anschließend wurden die Beads in 90 μ l SDS-Probenpuffer für 10 min bei 95°C inkubiert und zusammen mit der Input-Kontrolle wie in Kapitel 3.2.3 und 3.2.4 beschrieben auf die Menge an immunopräzipitierter Fc ϵ RI β -Rezeptorkette hin analysiert.

3.2.7 Detektion von Oberflächenproteinen mittels Durchflusszytometrie

Die Detektion des hoch affinen IgE-Rezeptors (FcεRI) und des SCF-Rezeptors (c-Kit) auf der Oberfläche von BMMC erfolgte durch Verwendung von Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und anschließender Analyse der Zellen im Fluorescence activated cell sorter (FACS)-Gerät. Hierzu wurden je 1×10^6 Zellen in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 1-mal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 100 µl FACS-Puffer (PBS mit 2% FCS) + 2 µl anti-FcεRIα Antikörper resuspendiert und für 20 min bei 37°C und ca. 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2-mal mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und in 100 µl FACS-Puffer mit einem Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)-konjugierten Sekundär-Antikörper (Verdünnung 1:50) aufgenommen und 20 min im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Alternativ dazu wurden unbehandelte Zellen direkt mit 100 µl FACS-Puffer + 2 µl eines Phycoerythrin (PE)-konjugierten anti-c-Kit Antikörpers behandelt. Nach 2-mal Waschen wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. 100 µl der Zellsuspension wurden mit 200 µl PBS gemischt und im Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson) gemessen. Dabei wurden die Zellen nach Lichtstreuung und Fluoreszenzintensität analysiert. Die an die Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe werden hierbei von einem Argon-Laser zur Emission von Lichtimpulsen angeregt, welche von einem Detektor registriert werden und durch einen Photomultiplier an den Computer übermittelt werden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der BD Cellquest Pro Software (Becton Dickinson).

3.2.8 Luziferase-Reportergen-Analyse

BMMC, die mit einem *Renilla*-Luziferase-Expressionsvektor (2,5 µg pTK Renilla Luc) und dem entsprechenden *Photinus*-Luziferase-Reportergenplasmid (6 µg pGL3, pGL3 MMTV bzw. pGL3 PEP) transfiziert worden waren (s. Kap. 3.4.5), wurden 4 Stunden nach der Transfektion für 16 Stunden mit Ethanol (0,001%) oder Dexamethason (100 nM) behandelt und geerntet, 2 mal mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und in 100 µl 1x Passive Lysis Buffer (Promega, Mannheim) resuspendiert. Nach 30 min auf Eis wurde das Lysat 5 min bei 9 500 U/min zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die Bestimmung der *Photinus*-Luziferase-Aktivität erfolgte mit Hilfe eines (ELX808;

Bio-Tek Instruments), wobei 20 µl Lysat mit 70 µl Reaktionspuffer (25 mM Glycylglycin, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, pH 7,8 mit 1 mM DTT und 2 mM ATP) und 30 µl D-(-)-Luziferin-Lösung (0,28 mg/ml 0,5 M Tris, pH 7,5) gemischt und sofort gemessen wurden. Zur Bestimmung der *Renilla*-Luziferase-Aktivität wurden 20 µl Lysat zusammen mit 100 µl Coelenterazin-Puffer (0,2 M KH₂PO₄, 0,2 M K₂HPO₄, pH 7,6) und 0,2 µM Coelenterazin analysiert. Die bei der Luziferin- und Coelenterazin-Oxidation freiwerdende Lumineszenz wurde gemessen (relative Lichteinheiten, RUL), der Quozient aus RUL [Luziferin] / RUL [Coelenterazin] wurde gebildet und alle Daten wurden mit dem Wert von pGL3 Basisvektor transfizierten, Ethanol-behandelten Zellen normalisiert.

3.3 Genotypisierung von Knockout-Mäusen

3.3.1 Isolation von genomischer DNA

Zur Bestimmung des Genotyps der Nachkommen der PEP-Knockout- und MKP-1-Knockout-Mauslinie wurden Schwanzbiopsien von neugeborenen oder von adulten Mäusen in je 200 µl Lysis-Puffer (100 mM Tris pH 8,5, 5 mM EDTA, 0,2 % SDS, 200 mM NaCl, Proteinase K 100 µg/ml) gegeben und 4 Stunden oder über Nacht bei 55°C verdaut. Anschließend wurde nach sorgfältigem Mischen (Vortex) 5 min bei 12 000 U/min zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die genomische DNA durch Zugabe von 200 µl kaltem Isopropanol präzipitiert. Die DNA wurde 10 min bei 12 000 U/min zentrifugiert und im Heizblock bei 37°C getrocknet und anschließend in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris pH 7,5, 0,1 mM EDTA pH 8,0) aufgenommen. Durch Inkubation bei 37°C für mindestens 2 Stunden und unter Schütteln wurde das Präzipitat wieder in Lösung gebracht.

3.3.2 Bestimmung des Genotyps mittels PCR mit Genlocus-spezifischen Primern

Die isolierte DNA wurde anschließend für eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet, in der mit Hilfe von zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primer, s. 2.1.4) DNA-Fragmente des zu untersuchenden Gen-Locus mit einer temperaturbeständigen Taq-Polymerase amplifiziert wurden. Die Reaktion (30 Zyklen) erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 20 µl in einem Thermocycler

(Peltier Thermal Cycler, PTC-200, Perkin Elmer), wobei 3 µl DNA, 200 nM dNTP-Lösung (je 200 nM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, pH 7,0), je 0,5 µM Primer, 1,25 U Taq-Polymerase und 4 µl 5x PCR-Puffer (Promega, Mannheim) eingesetzt wurden. Bei der Verwendung von MKP-1-spezifischen Primern enthielt die PCR-Reaktion außerdem noch 3 µl 86%iges Glycerin (13%). Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 94°C für 1 Minute, die Hybridisierung bei 55°C für 1 Minute und die DNA-Synthese bei 72°C für 1 Minute. Die Amplifikationsprodukte wurden anschließend in einem 2% TAE- oder TBE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die PCR-Reaktion mit den Oligonukleotidprimern für die MKP-1 Knockout-Mauslinie lieferte beim Wildtyp-Allel ein 288 bp großes Fragment und beim mutierten Allel ein 230 bp großes Fragment. Bei Verwendung der Primer für die PEP Knockout-Mauslinie wurde beim Wildtyp-Allel ein 550 bp großes Fragment und beim mutierten Allel ein 470 bp großes Fragment amplifiziert.

3.4 Zellkultur-Experimente

3.4.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe S2 an einer Sicherheitswerkbank (Klasse II; Thermo Elektron, Dreieich) durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37°C, 5-6% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert (Labotec, Göttingen). Zum Waschen von Zellen wurde steriles Magnesium- und Calcium-freies PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) verwendet.

3.4.2 Generierung von *bone marrow derived mouse mast cells*

Zur Generierung von *bone marrow derived mouse mast cells* (BMMC) wurden Mäuse vom Stamm C57BL/6J oder B6, MKP-1 (erp) (s. Kapitel 2.8) im Alter von 6 bis 10 Wochen durch zervikale Dislokation getötet. Bei Verwendung von genetisch veränderten Mäusen wurde ein kleines Stück des Schwanzes abgeschnitten und für eine spätere Genotypisierung bei -20°C aufbewahrt (s. Kapitel 3.3.2). Die Mäuse wurden mit 75% Rotisol desinfiziert und mit Hilfe von Nadeln auf einem Präparierbrett fixiert. Bauch- und Beckenhöhle wurden geöffnet und die Hinter- und Vorderextremitäten abgetrennt. Femora, Tibiae und Humeri wurden von der umgebenen Haut und Muskulatur freipräpariert und in serumfreiem IMDM bis zur

Weiterverarbeitung bei 4°C aufbewahrt. Im Zell-Labor wurden die Knochen einmal mit 75% Rotisol und dreimal mit PBS gewaschen. Nach dem Abschneiden der Epiphysen wurden die Knochen unter sterilen Bedingungen mit kaltem IMDM mittels einer 10 ml-Spritze (0.45 x 25 mm-Kanüle) mehrmals durchgespült, bis die Markhöhle möglichst frei von Blut war. Das auf diese Weise gewonnene Knochenmark von jeweils drei bis vier Mäusen (des gleichen Geschlechts) wurde in 50ml-Röhrchen vereint und für 5 min bei 1500 U/min und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Pumpe abgezogen und die Zellen wurden in 10 ml Medium resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Zur Lyse von Erythrozyten wurden die Zellen in 2 ml ACK-Lysispuffer (150 mM NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 1 mM EDTA, pH 7.3, steril filtriert) resuspendiert und 2 min bei RT inkubiert und anschließend mit 10 ml IMDM verdünnt. Zur Entfernung von Knochensplittern wurde die Zellsuspension über ein 70 µm-Zellsieb (cell strainer, Dickonson) dekantiert, erneut zentrifugiert und in 20 ml Wachstumsmedium (IMDM mit 10% hitzeinaktiviertem FBS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Pyruvat, 5 ng/ml IL-3 und 100 ng/ml SCF) resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in einer Dichte von 2x10⁶ Zellen/ml Wachstumsmedium in 24-Wellplatten (Greiner) ausgesät (1 ml/Well) und für 4 bis 5 Wochen kultiviert. Dabei wurde alle 2-3 Tage die Hälfte des Mediums vorsichtig entfernt und die nicht-adhärenenten Zellen wurden mit Hilfe einer 1 ml-Pipette nach mehrmaligem Spülen in eine neue 24-Wellplatte überführt und mit frischem Medium versorgt. Die adhärenenten Zellen wurden verworfen. Die Expression des hoch affinen IgE-Rezeptors FcεRI und des SCF-Rezeptors c-Kit (CD117) auf der Oberfläche der so gewonnenen BMNC wurde mit Hilfe von Fluorochrom-markierten Antikörpern im Durchflußzytometer (Fluorescence activated cell sorter, FACS) bestimmt (s. Kapitel 3.2.7).

3.4.3 Bestimmung der Zellzahl

Das Zählen von Zellen erfolgte unter dem Lichtmikroskop mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension 1:10 mit einer 0,25% Trypanblau-Lösung verdünnt und in die Zählkammer überführt. Anschließend wurden alle 4 großen Eckquadrate ausgezählt und der Mittelwert wurde gebildet. Die Umrechnung auf Zellen/ml Suspension erfolgte durch Multiplikation des Mittelwertes mit 10⁴ und dem Verdünnungsfaktor 10.

3.4.4 Stimulierung von BMDC

Zur Stimulierung der p38 MAP Kinase- und ERK1/2-Phosphorylierung mittels Antigen und IgE wurden BMDC in der Regel in Wachstumsmedium (IMDM mit 10% hitzeinaktiviertem FBS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Pyruvat, 5 ng/ml IL-3 und 100 ng/ml SCF) in einer Zelldichte von $1,5-2 \times 10^6$ Zellen/ml kultiviert und für die entsprechenden Zeiträume mit Dexamethason (100 nM) oder dem Lösungsmittel Ethanol (0,01%) behandelt. Zwei Stunden vor dem Ernten der Zellen wurde dem Medium anti-DNP IgE in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben, um eine vollständige Beladung der FcεRI-Rezeptoren mit IgE-Molekülen zu erreichen. Schließlich wurden die Zellen in ein 1-ml-Eppendorf-Röhrchen überführt und 5 min bei 1 500 U/min zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge). Das Medium wurde verworfen und die Zellen wurden einmal mit 37°C-warmen PBS gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 50 µl PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µl DNP-HSA-Lösung (1 µg/ml PBS) wurden die Zellen 0,5 bis 30 min (in der Regel 5 min) im Heizblock bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl SDS-Probenpuffer (s. Kapitel 3.2.1) und durch sofortiges Erhitzen des Lysats auf 95°C gestoppt.

Für die Stimulierung von BMDC mittels 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) und Stem Cell Factor (SCF) wurden die Zellen zunächst einmal mit IMDM gewaschen und anschließend für 12 Stunden in Gegenwart von Dexamethason (100 nM) in Wachstumsmedium ohne IL-3 und SCF kultiviert. Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben für 10 min mit TPA (80 ng/ml) und SCF (100 ng/ml) stimuliert und geerntet.

In einigen Experimenten wurden BMDC parallel zur Dexamethason-Behandlung für 16 Stunden mit dem GR-Antagonisten RU486 (1 µM, gelöst in Ethanol) inkubiert oder für 10 Stunden mit dem Translationshemmer Cycloheximid (5 ng/ml) bzw. den Proteasominhibitoren Epoxomicin (10 µM), MG132 (Carbobenzoxy-leucyl-leucyl-leucinal, Z-LLL-CHO) (10 µM), ALLN (N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal) (30 µM) oder den Lysosomeninhibitoren Bafilomycin A1 (200 nM) und Leupeptin (2 µM) behandelt. Alle verwendeten Inhibitoren wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.4.5 Transiente Transfektion

Die Transfektion von BMMC mit siRNA bzw. Plasmid-DNA erfolgte durch Elektroporation mit Hilfe des Nucleofector II (Amaxa) unter Verwendung des Programms T-023. Hierfür wurden BMMC zunächst zweimal mit IMDM gewaschen und 5 min bei 1 500 U/min zentrifugiert. Jeweils $4-6 \times 10^6$ Zellen wurden in 100 μ l 37°C-warmen IMDM resuspendiert. 2 μ l siRNA (100 μ M) oder insgesamt 8,5 μ g Plasmid-DNA (Vgl. Kapitel 3.2.8) wurden mit IMDM auf 100 μ l aufgefüllt und mit den Zellen gemischt. Die 200 μ l Zellsuspension wurden in eine Küvette (Amaxa) transferiert und im Nucleofector-Elektroporationsgerät behandelt. Danach wurden sofort 800 μ l vorgewärmtes Wachstumsmedium in die Küvette gegeben und die Zellen wurden mit einer Plastikpipette in eine vorbereitete 6-Wellplatte mit 2 ml vorgewärmten Medium überführt. Nach 2-4 Stunden Inkubation bei 37°C und 5-6% CO₂ wurde das Medium gewechselt, wobei Zellen, die in mehreren Küvetten mit den gleichen Nukleinsäuren transfiziert worden waren, vereint wurden und der (nach ca. 16 Stunden) folgenden Behandlung mit Dexamethason und Ethanol entsprechend ausgesät wurden.

3.5 Passive systemische Anaphylaxie

16 Wochen alten weiblichen Mäusen vom Stamm C3H/He, MKP-1 (erp) wurden pro 20 g Körpergewicht 100 μ l einer anti-DNP IgE-Lösung (0,2 mg/ml PBS) in die Bauchhöhle injiziert. Nach einer Inkubationszeit von ca. 21 Stunden bekamen die Mäuse 100 μ l Dexamethason (wasserlöslich; 0,2 mg/ml PBS) oder 100 μ l PBS pro 20 g Körpergewicht ebenfalls per intraperitoneale Injektion verabreicht. Drei Stunden später wurde die Körpertemperatur der Mäuse rektal mit einem Veterinär-Fieberthermometer (Microlife VT 1831 Vet-Temp; Tiershop, Linden) gemessen. Anschließend wurden 200 μ g DNP-HSA (in 200 μ l PBS gelöst) oder 200 μ l PBS in die dorsale Schwanzvene (Vena coccygealis dorsalis) injiziert und die Körpertemperatur wurde in 5-Minuten-Intervallen über einen Zeitraum von 1 Stunde gemessen. Jede der vier Behandlungsgruppen bestand aus vier Tieren.

4. Ergebnisse

4.1 Selektive Hemmung der IgE-Rezeptor-vermittelten Phosphorylierung von ERK1/2 und MAP Kinase p38 in Glukokortikoid-behandelten Mastzellen

Die mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1/2 und MAP Kinase p38 sind für die biologischen Funktionen von Mastzellen und somit bei der Entstehung allergisch entzündlicher Prozesse von zentraler Bedeutung (Gibbs et al, 2002; Kimata et al, 2000; Kassel und Cato, 2002; Hirasawa et al, 2000; Masuda et al, 2002). Die negative Regulation der Aktivität dieser Kinasen wird als eine Grundlage für die entzündungshemmenden und anti-allergischen Wirkungen von Glukokortikoiden vermutet. Der genaue Mechanismus der Glukokortikoid-abhängigen Repression der ERK1/2 und p38 MAP Kinase-Aktivität bei Mastzellen ist jedoch bislang unbekannt.

Sowohl der ERK1/2- als auch der p38 MAP Kinase-Signalweg werden in Mastzellen durch die antigen-vermittelte Quervernetzung von IgE-Rezeptormolekülen (FcεRI) und infolge der Aktivierung des c-Kit-Rezeptors durch seinen Liganden SCF initiiert (Ishizuka et al, 1999). Neben diesen mastzellspezifischen Stimuli, führt auch die Behandlung mit dem Tumorpromotor TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) zu einer Phosphorylierung dieser Kinasen (Gewert et al, 2000). Im ersten Schritt der Untersuchung der Glukokortikoid-abhängigen Repression der MAP Kinase p38- und ERK1/2-Aktivität wurde zunächst überprüft, ob Glukokortikoide den gleichen Effekt auf die IgE/Antigen-, SCF- und TPA-induzierte Phosphorylierung dieser Kinasen haben. Zu diesem Zweck wurden BMMC (bone marrow derived mast cells), generiert und für 12 Stunden mit dem synthetischen Glukokortikoid Dexamethason oder dem verwendeten Lösungsmittel Ethanol als Kontrolle behandelt und anschließend mit den verschiedenen Substanzen stimuliert. Für die antigen-abhängige Aktivierung des IgE-Rezeptors wurden die Zellen vor der Stimulierung für 2 Stunden in Gegenwart eines monoklonalen anti-Dinitrophenyl IgE Antikörpers (IgE) kultiviert, um so eine Beladung der Rezeptoren mit IgE zu erreichen. Danach wurden die IgE-Rezeptormoleküle durch Inkubation der Zellen mit dem multivalenten Antigen Dinitrophenyl-HSA (Dinitrophenyl-Humanes Serum Albumin, DNP) kreuzvernetzt und somit aktiviert. Parallel dazu wurden IgE-unbehandelte BMMC mit TPA oder

SCF stimuliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Lyse-Puffers gestoppt und die Aktivität von ERK1/2 und MAP Kinase p38 wurde mit Hilfe des Immunoblot-Verfahrens unter Verwendung phospho-spezifischer Antikörper ermittelt. Ein Antikörper gegen nicht-phosphoryliertes ERK2 wurde zur Bestimmung der eingesetzten Gesamtproteinmenge verwendet.

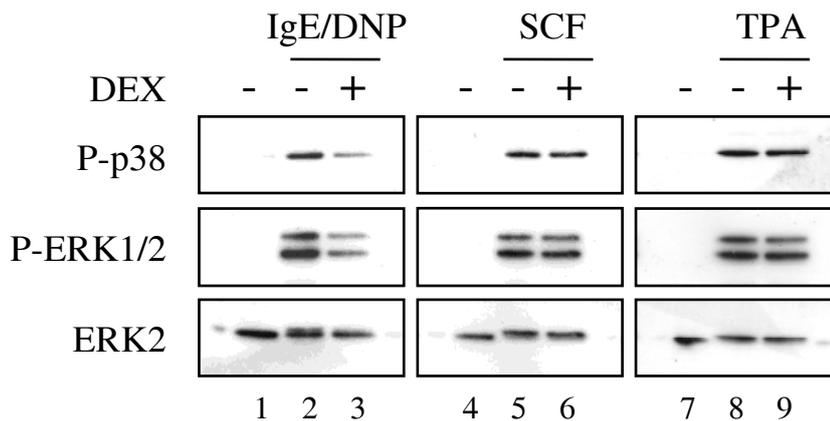


Abb.4.1 Dexamethason hemmt die Phosphorylierung der p38 MAP Kinase und ERK1/2 in IgE/Antigen-stimulierten, aber nicht in SCF- oder TPA-aktivierten BMMC. 2×10^6 BMMC wurden für 12 Stunden in Kulturmedium ohne IL-3 und SCF kultiviert und gleichzeitig mit Dexamethason (100 nM) oder nur dem Lösungsmittel Ethanol (0,01%) behandelt. Ein Teil der Zellen wurde dabei für die letzten 2 Stunden der Behandlungszeit mit anti-DNP IgE (1 µg/ml) kultiviert und anschließend für 5 min mit DNP-HSA (500 ng/ml) stimuliert. IgE-unbehandelte Zellen wurden 10 min mit TPA (80 ng/ml) oder SCF (100 ng/ml) stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und die Gesamtzell-Lysate mittels Western blot-Verfahren analysiert, wobei phospho-spezifische Antikörper gegen p38 MAP Kinase und ERK1/2 verwendet wurden. Ein anti-ERK2-Antikörper wurde verwendet, um die eingesetzte Proteinmenge zu bestimmen.

Die Western blot-Analyse zeigt, dass die Behandlung von BMMC mit Dexamethason in einer Reduktion der IgE/DNP-abhängigen p38 MAP Kinase- und ERK1/2-Phosphorylierung resultiert (Abb.4.1, vgl. Spur 2 mit 3), jedoch keine hemmende Wirkung auf die SCF- und TPA-induzierte Phosphorylierung der Kinasen hat (Abb.4.1, vgl. Spur 5 mit 6 und Spur 8 mit 9). Dieses Experiment demonstriert somit, dass Glukokortikoide die p38 MAP Kinase- und ERK1/2-Aktivität in Mastzellen herabsetzen, wobei der Hormoneffekt spezifisch für die IgE-Rezeptor-vermittelte Mastzell-Aktivierung ist.

4.2 Negative Regulation der IgE-Rezeptor-Expression durch Glukokortikoide

4.2.1 Glukokortikoide reprimieren die Oberflächenexpression des IgE-Rezeptors FcεRI

Da der hoch affine IgE-Rezeptor FcεRI der wichtigste Vermittler IgE-abhängiger allergischer Reaktionen ist (Dombrowicz et al, 1993; Dombrowicz et al, 1996), wurde der Effekt von Dexamethason auf die Oberflächenexpression dieses Rezeptors untersucht.

Die Detektion von IgE-Rezeptormolekülen in der Membran von BMMC erfolgte durch Inkubation der Zellen mit einem Antikörper, welcher die extrazelluläre Domäne der α-Untereinheit des multimeren FcεRI-Rezeptors erkennt. Die Verwendung eines Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörpers ermöglichte die durchflusszytometrische Analyse der behandelten Zellen im FACS (Fluorescence activated cell sorter)-Gerät. Abbildung 4.2A zeigt die Fluoreszenzkurven von BMMC, die 8 und 16 Stunden nach der Zugabe von Dexamethason mit den genannten Antikörpern behandelt wurden, wobei die Zellzahl in Abhängigkeit von der Fluoreszenzintensität dargestellt ist. Vergleicht man die Kurven von Dexamethason-behandelten (rote Kurve) und unbehandelten Zellen (blaue Kurve), sind zum Zeitpunkt 0 sowie nach 8 Stunden Hormonbehandlung noch keine Unterschiede in der Fluoreszenzintensität vorhanden, während nach 16 Stunden eine deutliche Abnahme der Signalstärke zu erkennen ist (Linksverschiebung der roten Kurve). Folglich führt eine 16-stündige Behandlung mit Dexamethason zu einer Reduktion der Zahl an IgE-Rezeptormolekülen an der Oberfläche von BMMC. Als Kontrolle wurde die Oberflächenexpression des SCF-Rezeptors c-Kit in BMMC, die 24 Stunden mit Dexamethason behandelt wurden, bestimmt. Die FACS-Analyse zeigt, dass selbst diese lang anhaltende Glukokortikoid-Behandlung keinen wesentlichen Einfluss auf die Expression dieses Rezeptors hat (Abb.4.2B).

Diese Ergebnisse demonstrieren somit, dass Glukokortikoide die Oberflächenexpression des IgE-Rezeptors und nicht des SCF-Rezeptors in BMMC herabsetzen. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass Dexamethason die

IgE/DNP-abhängige, jedoch nicht die SCF-vermittelte Aktivierung der p38 MAP Kinase- und ERK1/2-Phosphorylierung herabsetzt.

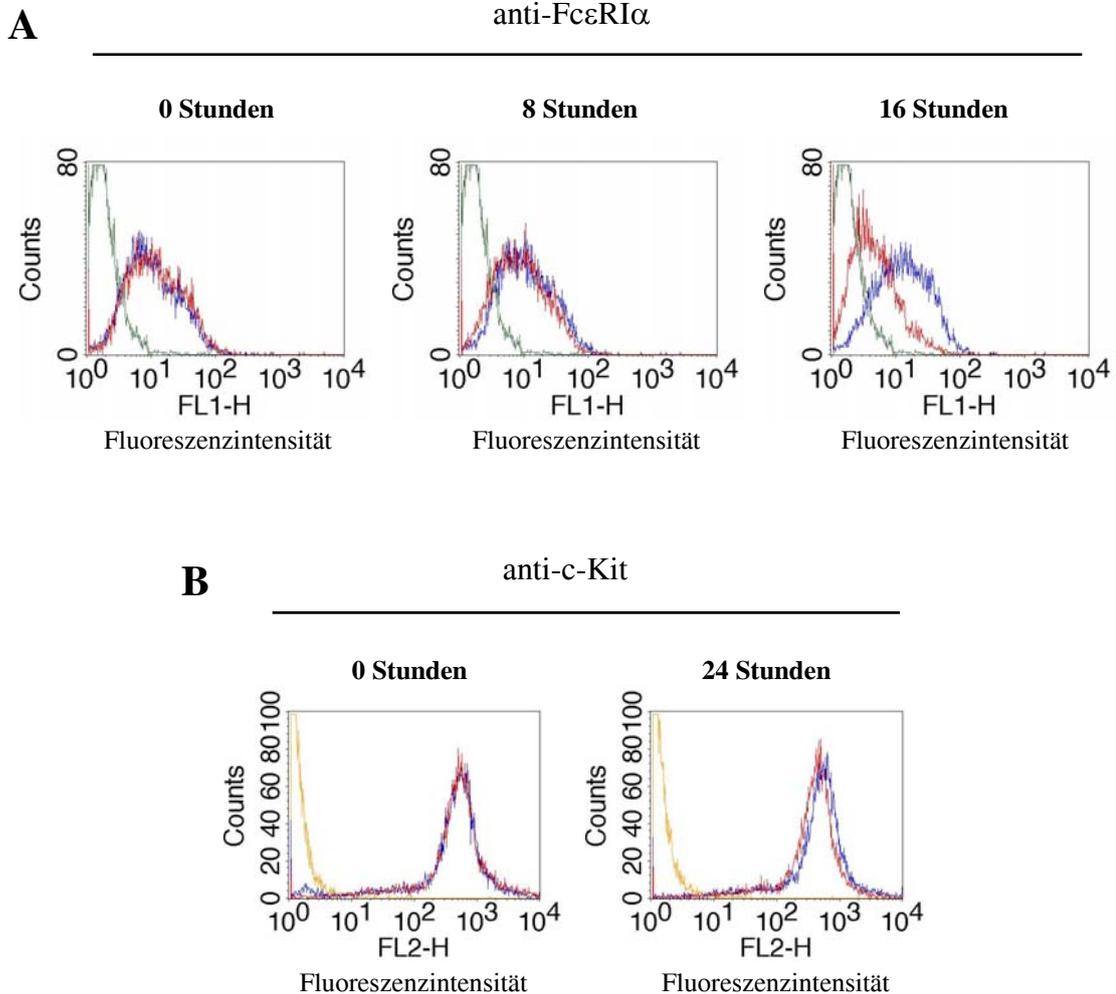


Abb.4.2 Glukokortikoide reduzieren die Oberflächenexpression des FcεRI-Rezeptors in BMMC. Je $0,5 \times 10^6$ Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit Dexamethason (100 nM) oder nur dem Lösungsmittel Ethanol (0,01%) behandelt und anschließend gewaschen. Die Zellen wurden mit einem anti-FcεRIα Antikörper und einem Fluoreszeinisothiozyanat-konjugierten Sekundärantikörper (A) bzw. Phycoerythrin-konjugierten anti-c-Kit Antikörper (B) gefärbt und durchflußzytometrisch mit Hilfe eines FACScan-Gerätes analysiert. Gezeigt sind die jeweiligen Fluoreszenzkurven von zehntausend gezählten Zellen (Counts), wobei die blaue Kurve unbehandelte und die rote Kurve Dexamethason-behandelte Zellen darstellt. Die grüne Kurve stammt von Zellen, die nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden. Die gelbe Kurve repräsentiert ungefärbte Zellen.

4.2.2 Dexamethason reduziert die Proteinmenge der β -Untereinheit des IgE-Rezeptors

Fc ϵ RI-Rezeptormoleküle werden auf der Oberfläche von murinen Mastzellen ausschließlich in heterotetramerer Form bestehend aus der IgE-bindenden α -Untereinheit, einer β - und zwei γ -Ketten exprimiert (Blank et al, 1989; Ra et al, 1989). Als Konsequenz könnte eine Reduktion der Synthese von nur einer der drei Fc ϵ RI-Rezeptor-Untereinheiten in einer herabgesetzten Oberflächenexpression des Rezeptors resultieren. Um den Mechanismus der Glukokortoid-vermittelten Hemmung der Fc ϵ RI-Expression zu analysieren, wurde der Effekt von Dexamethason auf die mRNA-Menge der einzelnen Rezeptor-Ketten mit Hilfe des quantitativen Real time-PCR-Verfahrens untersucht. Diese Analyse zeigte jedoch, dass eine Glukokortikoid-Behandlung von BMMC für 24 Stunden keine Reduktion der mRNA-Menge der α -, β - und γ -Rezeptor-Untereinheit hervorruft (Abb.4.3). Zusammen mit den Ergebnissen der FACS-Analyse, lassen die Daten der mRNA-Analyse die Schlussfolgerung zu, dass Glukokortikoide die Fc ϵ RI-Expression auf post-transkriptioneller Ebene regulieren.

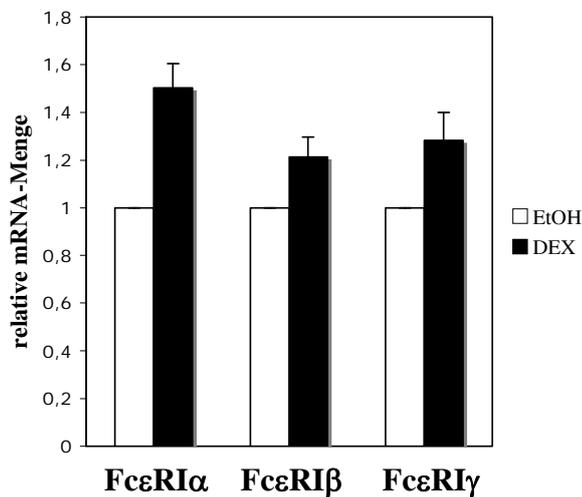


Abb.4.3 Glukokortikoide haben keinen Einfluss auf die mRNA-Menge der IgE-Rezeptoruntereinheiten Fc ϵ RI α , - β und - γ von BMMC. 2×10^6 Zellen wurden für 24 Stunden mit Dexamethason (100 nM) oder dem Lösungsmittel Ethanol (0,01%) behandelt und lysiert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und im quantitativen Real time-PCR-Verfahren analysiert, wobei Oligonukleotidprimer für Fc ϵ RI α , - β , - γ und β -Actin verwendet wurden. Die Bestimmung der β -Actin-mRNA-Menge diente als interne Kontrolle und wurde zur Normalisierung herangezogen. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Nachdem Dexamethason keine Wirkung auf die mRNA-Menge der IgE-Rezeptorkomponenten zeigte, wurde untersucht, ob die Proteinmenge von einer der Untereinheiten des FcεRI-Rezeptorkomplexes im Gesamtzell-Lysat von Glukokortikoid-behandelten Mastzellen reduziert ist. Hierfür wurden BMMC für 8, 16 und 24 Stunden in Gegenwart von Dexamethason kultiviert und anschließend geerntet und lysiert. Die Zellextrakte wurden mit Hilfe eines anti-FcεRIβ Antikörpers durch Anwendung des Western blot-Verfahrens analysiert. Die Proteinmenge der α- und γ-Kette konnte mit Hilfe dieser Methode nicht ermittelt werden, da die erhältlichen Antikörper nur ungenügend funktionierten. Die Immunoblot-Analyse zeigte, dass eine Kultivierung der Zellen mit Dexamethason für 16 und 24 Stunden zu einer deutlichen Reduktion des FcεRIβ-Peptids führt (Abb.4.4A, Vgl. Spuren 5 und 6 und Spuren 7 und 8), wobei eine relativ schwache Abnahme dieses Proteins auch nach 8 Stunden der Behandlung festgestellt werden kann (Abb.4.4, Vgl. Spuren 4 und 3). Dieses Ergebnis demonstriert, dass Dexamethason die Proteinmenge der β-Untereinheit des IgE-Rezeptors reduziert.

Um zu zeigen, dass die Menge der FcεRIβ-Untereinheit auch in der Zellmembran durch Glukokortikoide herabgesetzt wird, wurden die membranständigen FcεRI-Rezeptormoleküle an der Oberfläche von BMMC zunächst mit IgE beladen und die Zellen wurden geerntet und lysiert. Anschließend wurden die IgE-FcεRI-Komplexe mit Hilfe eines anti-IgE-Antikörpers immunopräzipitiert. Die Menge der β-Rezeptorkette im Präzipitat wurde schließlich mittels Western blot-Analyse durch Verwendung eines anti-FcεRIβ Antikörpers analysiert. Auf diese Weise war es möglich, nur die FcεRIβ-Moleküle zu detektieren, die sich an der Oberfläche der Zellen befinden.

Das Ergebnis dieses Experiments zeigt, dass die Menge der membranständigen FcεRIβ-Untereinheit von BMMC, die 16 Stunden in Gegenwart von Dexamethason kultiviert wurden, geringer ist als bei den unbehandelten Zellen (Abb.4.4B, Vgl. Spuren 5 und 6). Dieser Befund bestätigt somit die vorherigen Ergebnisse der FACS-Analyse, welche ebenfalls demonstrieren, dass Dexamethason die Oberflächenexpression des IgE-Rezeptors herabsetzt.

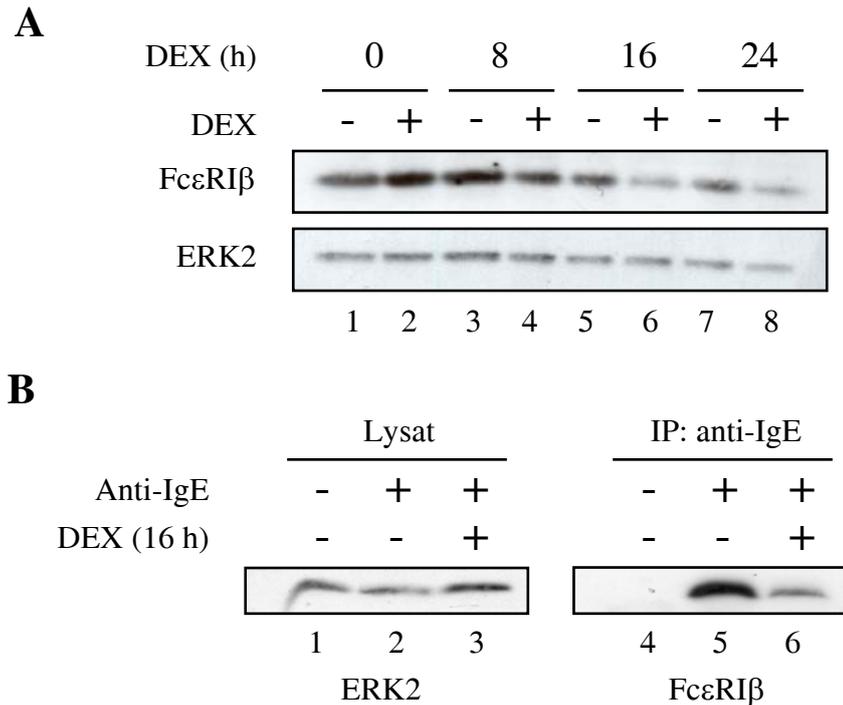


Abb.4.4 Glukokortikoide reduzieren die Proteinmenge der FcεRIβ-Untereinheit. (A) 2×10^6 BMMC wurden für die angegebenen Zeiträume mit Dexamethason (100 nM, DEX) oder nur dem Lösungsmittel Ethanol (0,01%) behandelt und lysiert. Die Gesamtzell-Lysate wurden durch Anwendung des Immunoblot-Verfahrens analysiert, wobei ein anti-FcεRIβ Antikörper und ein ERK2 Antikörper als Kontrolle verwendet wurden. (B) 10×10^6 BMMC wurden für 14 Stunden (h) mit Dexamethason (100 nM, DEX) vorbehandelt und anschließend für weitere 2 Stunden in Gegenwart von IgE (0,5 µg/ml) kultiviert, anschließend lysiert und mit einem anti-IgE Antikörper oder IgG-Kontroll-Antikörper (Spur 1 und 4) für 6 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Immunopräzipitate wurden mit Hilfe von Protein-G-Agarose extrahiert (IP-anti-IgE) und parallel zu den verwendeten Zell-Lysaten (Lysat) mittels Immunoblot-Analyse wie oben beschrieben analysiert.

4.2.3 Die negative Regulation der β-Untereinheit des IgE-Rezeptors benötigt den Glukokortikoidrezeptor und eine *de novo* Proteinsynthese

Die β-Untereinheit des hoch affinen IgE-Rezeptors hat eine wichtige Funktion bei der Regulation der FcεRI-Oberflächenexpression, da sie durch frühe Assoziation mit der α-Kette im endoplasmatischen Retikulum den Abbau neu synthetisierter IgE-Rezeptorkomplexe verhindert (Donnadieu et al, 2000). Aufgrund dieser FcεRI-Rezeptor-stabilisierenden Eigenschaft der β-Kette wurde der Mechanismus der Glukokortikoid-vermittelten Reduktion der FcεRIβ-Untereinheit analysiert.

Zunächst wurde mit Hilfe des Glukokortikoidrezeptor (GR)-Antagonisten RU486 überprüft, ob die negative Regulation der β -Kette durch den GR vermittelt wird. Hierfür wurden BMMC in Gegenwart von RU486 für 16 Stunden mit Dexamethason behandelt und anschließend lysiert. Der Effekt des Glukokortikoids auf die Menge des β -Proteins wurde mittels Immunoblot-Analyse bestimmt. Das Ergebnis der Analyse zeigt, dass eine Behandlung der Zellen mit RU486 die Dexamethason-abhängige Reduktion der Fc ϵ RI β -Proteinmenge verhindert (Abb.4.5A, Vgl. Spur 3 mit 4 und Spur 1 mit 2) und demonstriert somit, dass der Glukokortikoidrezeptor für diese Glukokortikoid-Wirkung benötigt wird.

Durch Hemmung der Translation sollte ferner geklärt werden, ob die *de novo* Synthese eines Proteins für die Dexamethason-vermittelte negative Regulation der Fc ϵ RI β -Untereinheit erforderlich ist. Zu diesem Zweck wurden BMMC 12 Stunden mit Dexamethason behandelt. Um nun eine Neusynthese von Proteinen zu unterbinden, wurde 2 Stunden nach Applikation des Glukokortikoids der Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid (CHX) der Kultur zugegeben. Falls es nun durch die Glukokortikoid-Behandlung zu Veränderungen in der Proteinmenge der Fc ϵ RI β -Kette kommt, können diese nur auf der Aktivität von bereits synthetisierten Proteinen basieren.

Die Immunoblot-Analyse der von diesen Zellen präparierten Lysate mit dem anti-Fc ϵ RI β Antikörper zeigt, dass es, im Gegensatz zu unbehandelten Zellen, im Fall der mit CHX kultivierten BMMC zu keiner Herabsetzung der Proteinmenge der β -Kette durch Dexamethason kommt (Abb.4.5B, Vgl. Spur 4 und 3 mit Spur 2 und 1). Die relativ geringe Proteinmenge der Fc ϵ RI β -Kette in den CHX-behandelten BMMC ist dabei wahrscheinlich auf die kurze Halbwertszeit des Proteins von ungefähr 4 Stunden zurückzuführen (Gomez et al, 2005).

Dieses Experiment zeigt, dass eine andauernde *de novo* Proteinsynthese für die Herabsetzung der Fc ϵ RI β -Untereinheit durch Dexamethason benötigt wird. Dieses Resultat demonstriert, dass die Glukokortikoid-Wirkung durch die Synthese von anderen Proteinen vermittelt wird. Eine Möglichkeit ist, dass Dexamethason die Expression von bestimmten Proteasen verstärkt, welche für den Abbau dieser Rezeptorkette verantwortlich sind.

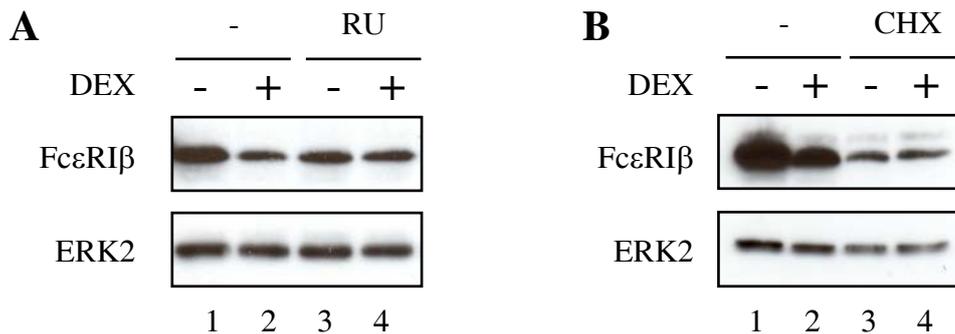


Abb.4.5 Für die Glukokortikoid-abhängige Reduktion der FcεRIβ-Untereinheit werden sowohl der GR als auch eine *de novo* Proteinsynthese benötigt. 2×10^6 BMMC wurden 16 (A) bzw. 12 (B) Stunden in Gegenwart von Dexamethason (100 nM, DEX) oder dem Lösungsmittel Ethanol (0,01%) kultiviert. Dabei wurden die Zellen mit RU486 (RU; 1 μ M) (A) oder Cycloheximid (CHX; 5 μ g/ml) (B) behandelt. Die Cycloheximid-Behandlung erfolgte dabei 2 Stunden nach Zugabe von Dexamethason. Die Zellen wurden lysiert und die Gesamtzell-Lysate wurden mittels Western blot-Verfahren analysiert, wobei ein anti-FcεRIβ Antikörper und ein ERK2 Antikörper als Kontrolle verwendet wurden.

4.2.4 Die Hemmung des proteasomalen Protein-Abbauweges verhindert die Glukokortikoid-abhängige Reduktion der β -Untereinheit des IgE-Rezeptors

Viele verschiedene Proteasen sind am intrazellulären Abbau von Proteinen beteiligt. Die Proteasomen und Lysosomen stellen jedoch die zwei wichtigsten Protein-Abbauwege in eukaryotischen Zellen dar (Hilt und Wolf, 2000; Pillay et al, 2002). Um Hinweise zu erhalten, ob Glukokortikoide die Degradation der FcεRIβ-Kette beeinflussen, wurde sowohl der proteasomale als auch der lysosomale Protein-Abbauweg mit Hilfe von verschiedenen Enzym-Inhibitoren blockiert und der Effekt von Dexamethason auf die Proteinmenge der FcεRIβ-Untereinheit wurde unter diesen Bedingungen analysiert. Zur Hemmung der Lysosomen-Aktivität wurden die Substanzen Bafilomycin A1, welches spezifisch die vakuoläre V-ATPase hemmt, und Leupeptin, ein Inhibitor lysosomaler Serin-Cystein-Proteinasen, verwendet (Seglen, 1983). Außerdem wurden die Substanzen Epoxomicin, MG132 und ALLN eingesetzt. Die beiden letzteren können sowohl die lysosomale als auch proteasomale Degradation von Proteinen hemmen (Rock et al, 1994; Fuertes et al, 2003). Epoxomicin inhibiert weitgehend selektiv die Aktivität des Proteasoms (Meng et al, 1999; Lee und Goldberg, 2000). Die Immunoblot-Analyse der Zell-Extrakte von BMMC, welche in Anwesenheit von Bafilomycin A1 (Baf) oder Leupeptin (Leup)

mit Dexamethason behandelt wurden, zeigt, dass diese Lysosomen-Inhibitoren keine Auswirkung auf die Glukokortikoid-vermittelte Reduktion der β -Kette haben (Abb.4.6A, Vgl. die Spuren 3-6 mit Spur 1 und 2). Nach Kultivierung der Zellen mit Epoxomicin (Epoxo), MG123 (MG) und ALLN konnte hingegen keine Abnahme der Fc ϵ RI β -Untereinheit in den Dexamethason-behandelten BMMC mehr festgestellt werden (Abb.4.6B, Vgl. Spuren 3-8 mit Spur 1 und 2). Demnach blockieren sowohl der spezifische (Epoxomicin) als auch die unspezifischen (MG123, ALLN) Proteasomen-Inhibitoren die Glukokortikoid-abhängige Reduktion von Fc ϵ RI β .

Die Ergebnisse der Protease-Inhibitor-Experimente zeigen, dass die negative Regulation der Fc ϵ RI β -Untereinheit durch Dexamethason die enzymatische Aktivität des Proteasomen-abhängigen Proteinabbauweges erfordert und weist somit auf einen Glukokortikoid-induzierten proteasomalen Abbau dieser IgE-Rezeptorkette hin.

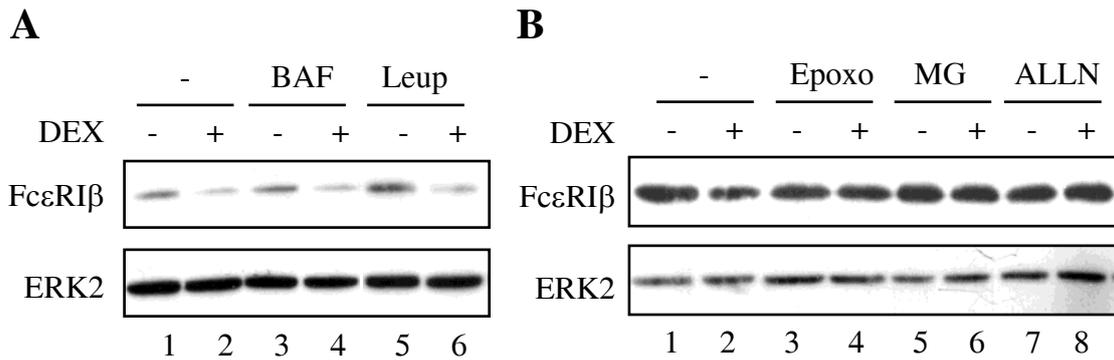


Abb.4.6 Inhibitoren des Proteasom-abhängigen Proteinabbauweges blockieren die Dexamethason-abhängige Reduktion des Fc ϵ RI β -Proteins. 2×10^6 BMMCs wurden für 12 Stunden mit Dexamethason (100 nM) oder nur dem Lösungsmittel Ethanol (0,01%) behandelt, wobei 2 Stunden nach Hormonzugabe Bafilomycin A1 (BAF, 200 nM), Leupeptin (Leup, 2 μ M), Epoxomicin (Epoxo, 10 μ M), MG132 (MG, 10 μ M) bzw. ALLN (30 μ M) dem Kulturmedium zugegeben wurden. Die Zellen wurden anschließend lysiert. Die Gesamtzell-Lysate wurden mittels Western blot-Verfahren analysiert, wobei ein anti-Fc ϵ RI β Antikörper und ein ERK2 Antikörper als Kontrolle verwendet wurden.

4.3 Glukokortikoide erhöhen die mRNA-Menge der Phosphatasen PEP, MKP-1 und MKP-2 in BMMC

Die vorherigen Resultate zeigen, dass eine deutliche Reduktion der Expression des IgE-Rezeptors durch Dexamethason erst nach 16 Stunden zur Ausprägung kommt. Um zu überprüfen, ob diese Abnahme an FcεRI-Molekülen die Ursache für die negative Regulation von ERK1 und ERK2 und die Hemmung der Phosphorylierung der p38 MAP Kinase ist, wurden Kinetik-Experimente durchgeführt, die zeigen sollten, ob die Hemmung des IgE-Rezeptors mit der Repression der ERK1/2- und p38 MAP Kinase-Phosphorylierung korreliert.

Hierfür wurden BMMC 6, 8 und 12 Stunden in Gegenwart von Dexamethason kultiviert, mittels IgE und DNP stimuliert und anschließend lysiert. Die Immunoblot-Analyse der phosphorylierten ERK1/2 und p38 MAP Kinase-Proteine zeigt, dass bereits eine 6-stündige Dexamethason-Behandlung ausreicht, um die Phosphorylierung der p38 MAP Kinase zu inhibieren (Abb.4.7, Vgl. Spuren 2 und 3). Dieser Glukokortikoid-Effekt tritt nach 8 und 12 Stunden mit einer ähnlichen Stärke auf (Abb.4.7, Spuren 4 bis 7). Die antigen-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung ist ebenfalls 6, 8 und 12 Stunden nach der Dexamethason-Behandlung reduziert. Hier ist die Glukokortikoid-vermittelte Repression nach 6 Stunden jedoch nur schwach ausgeprägt (Abb.4.7, Vgl. Spuren 2 und 3) und nimmt nach 8 und 12 Stunden zu (Abb.4.7, Spuren 4 bis 7).

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die negative Regulation der antigen-abhängigen Aktivität von ERK1/2 und der p38 MAP Kinase durch Dexamethason innerhalb einer 6- bis 12-stündigen Glukokortikoid-Behandlung stattfinden kann. Da die Oberflächenexpression des IgE-Rezeptors erst nach 16 Stunden deutlich herabgesetzt ist, müssen noch andere, frühe Glukokortikoid-Effekte für die Hemmung der Phosphorylierung dieser MAP Kinasen durch Dexamethason verantwortlich sein.

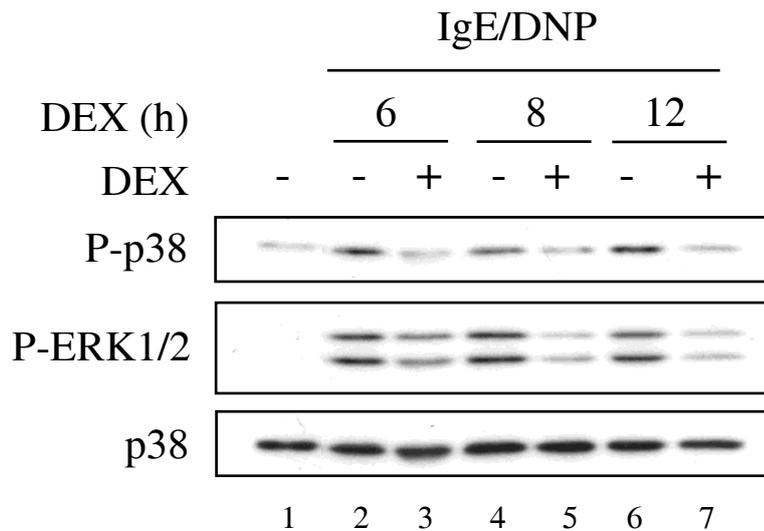


Abb.4.7 Die FcεRI-abhängige Phosphorylierung der MAP Kinasen p38 MAPK, ERK1 und ERK2 ist nach 6 bis 12 Stunden Dexamethason-Behandlung herabgesetzt. Je 2×10^6 BMMC wurden für die in der Abbildung genannten Zeiträume mit Dexamethason (100 nM, DEX) oder nur dem Lösungsmittel Ethanol (0,01%) behandelt und für die letzten 2 Stunden der Behandlung mit anti-DNP IgE (1 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 5 min mit DNP-HSA (500 ng/ml, DNP) stimuliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Lyse-Puffers gestoppt und die Gesamtzell-Lysate wurden mittels Immunoblot-Verfahren analysiert, wobei phospho-ERK1/2-, phospho-p38 MAPK- sowie ein p38 Antikörper als Kontrolle verwendet wurden.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine GR-vermittelte Induktion von Tyrosinproteinphosphatasen für die Repression der MAP Kinase p38- und ERK1/2-Phosphorylierung benötigt wird (Gewert et al, 2000; Lasa et al, 2001; Kassel et al, 2001). Zur Identifizierung glukokortikoid-regulierter Phosphatase-Gene, die als Vermittler dieser MAP Kinase-Hemmung in Frage kommen könnten, wurde die DNA-Microarray-Technologie genutzt. Als mRNA-Quelle für die Analyse diente hierbei Gesamt-RNA von BMMC, die 8 oder 16 Stunden in Gegenwart von Dexamethason kultiviert worden waren. Die Hybridisierung der mRNA mit den cDNA-Sonden sowie die Fluoreszenzmarkierung und Auswertung der Daten erfolgte mit DNA-Mikrochips der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) und wurde am Biochip-Labor des Instituts für Zellbiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Unter den identifizierten Genen, deren Expression negativ durch Dexamethason reguliert war, waren zahlreiche pro-inflammatorische Gene, die z.T. bereits als Glukokortikoid-reprimierte Gene beschrieben wurden. Beispiele dafür sind

Matrixmetalloproteinasen (MMP12 und MMP13, Nenan et al, 2005), Mastzellproteasen (MCPT9), Eklund et al, 1997) oder Zytokine, wie TNF- α (Swanek et al, 1997) und verschiedene Chemokine und deren Rezeptoren (Pype et al, 1999). Ferner waren auch die Transkripte bekannter Glukokortikoid-induzierter Gene, wie Metallothionein 1 und 2 (Karin et al, 1979; Richards et al, 1984) und der Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF- κ B, I κ B α (Auphan et al, 1995) sowie verschiedene Phosphatasen durch Dexamethason positiv reguliert. Die mRNA-Menge des konstitutiv exprimierten α -Tubulins wurde wie erwartet nicht durch Dexamethason beeinflusst. Einige dieser Gene sind in der Tabelle 2 aufgelistet. Die Expression dieser bekannten Glukokortikoid-regulierten Gene kann als Parameter für die Hormonwirkung angesehen werden und lässt demnach die Schlussfolgerung zu, dass Veränderungen im Expressionsmuster auf die Dexamethason-Behandlung zurückzuführen sind.

Zu den Glukokortikoid-induzierten Phosphatase-Genen gehörte zum einen die Proteintyrosinphosphatase PEP (auch bekannt als PTPN22). PEP ist eine so genannte Nicht-Rezeptor-Tyrosinphosphatase (PTPN), die Mitglieder der src-Kinase-Familie dephosphoryliert und bislang als negativer Regulator des T-Zell-Rezeptor-Signalweges beschrieben wurde (Wu et al, 2006; Hasegawa et al, 2004).

Neben PEP waren außerdem die Serin/Threonin-Phosphatase PP1 γ (PPP1CC) und drei Tyrosin/Threonin-Phosphatasen der Familie der dual spezifischen Phosphatasen (DUSP) in den Dexamethason-behandelten BMDC überexprimiert: DUSP1/MKP-1, DUSP4/MKP-2 und DUSP6/MKP-3. Diese Phosphatasen sind auch als MAP Kinase-Phosphatasen (MKP) bekannt und können die Aktivität von MAP Kinasen durch Dephosphorylierung von Tyrosin- und Threonin-Resten negativ regulieren (Alessi et al, 1993; Sun et al, 1993; Chu et al, 1996; Groom et al, 1996). Demnach sind sie besonders interessante Kandidaten für die Hemmung der MAP Kinase p38- und ERK1/2-Phosphorylierung.

Gen (Symbol)	Synonyme, Bezeichnungen	Expression relativ zur Kontrolle	
		8 h DEX	16 h DEX
TUBA1	α Tubulin	-1,14	-1,05
MT1	MT-I	1,5	1,41
MT2	MT-II	2,56	2,18
I κ B α	Nf κ b α	2,38	1,55
MMP12	Makrophagen Elastase	-	-2,57
MMP13	Kollagenase 3	-1,75	-3,91
Mastzellproteasen:			
MCPT9	Mast cell chymase 1	-1,6	-2,48
Zytokine:			
TNF- α	TNF	-1,82	-
Chemokine:			
MIP-1 α	Ccl3	-1,72	-1,72
MIP-1 β	Ccl4	-1,83	-2,24
MCP-1	Ccl2	-	-1,42
MCP-3	Ccl7	-2,19	-2,18
MCP-5	Ccl12	-1,99	-2,49
Chemokin-Rezeptoren:			
CCR2	MIP-1 α receptor	-	-1,52
CCR7	MIP-3 β receptor	-	-2,77
Tyrosinphosphatasen:			
PTPN22	PEP, PTPN8, Lyp	2,14	-
Serin/Threonin-Phosphatasen:			
PPP1CC	PP1 γ	1,85	1,8
Tyrosin/Threonin-Phosphatasen:			
DUSP1	MKP-1, CL-100, Erp	2,36	1,54
DUSP4	MKP-2, hVH2, TYP	4,51	4,49
DUSP6	MKP-3, PYST1	-	1,44

Tab.2 Glukokortikoid-abhängige Regulation verschiedener Gene in Dexamethason-behandelten Mastzellen. 4×10^6 BMMC wurden für 8 oder 16 Stunden (h) mit Dexamethason (DEX; 100 nM) oder nur dem Lösungsmittel Ethanol (0,01%) als Kontrolle behandelt und anschließend lysiert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert. Mögliche Verunreinigungen mit genomischer DNA wurden mittels Dnase entfernt. Die mRNA wurde mit Hilfe der DNA-Mikroarray (Affymetrix)-Technologie analysiert.

Da die Glukokortikoid-vermittelte Hemmung der ERK1/2- und p38 MAP Kinase-Phosphorylierung die Aktivität einer Proteintyrosinphosphatase benötigt (Lasa et al, 2002; Kassel et al, 2001), kamen sowohl die Tyrosin/Threonin-Phosphatasen MKP-1, MKP-2 und MKP-3 als auch die Tyrosinphosphatase PEP als möglicher Vermittler für diese Hormonwirkung in Frage.

Die Ergebnisse der DNA-Microarray-Analyse dieser Phosphatasen wurden zunächst mittels RT-PCR-Analyse überprüft. Hierfür wurden BMMC für unterschiedliche Zeiträume (2-24 Stunden) in Gegenwart von Dexamethason kultiviert und anschließend geerntet. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und durch Anwendung der quantitativen Real-time PCR analysiert. Die Auswertung der

Analyse zeigte im Fall der PEP-, MKP-1- und MKP-2-Transkripte Glukokortikoid-abhängige Regulationen, die den Affymetrix-Ergebnissen sehr ähnlich waren (Abb.4.8A-C, 8 und 16 Stunden).

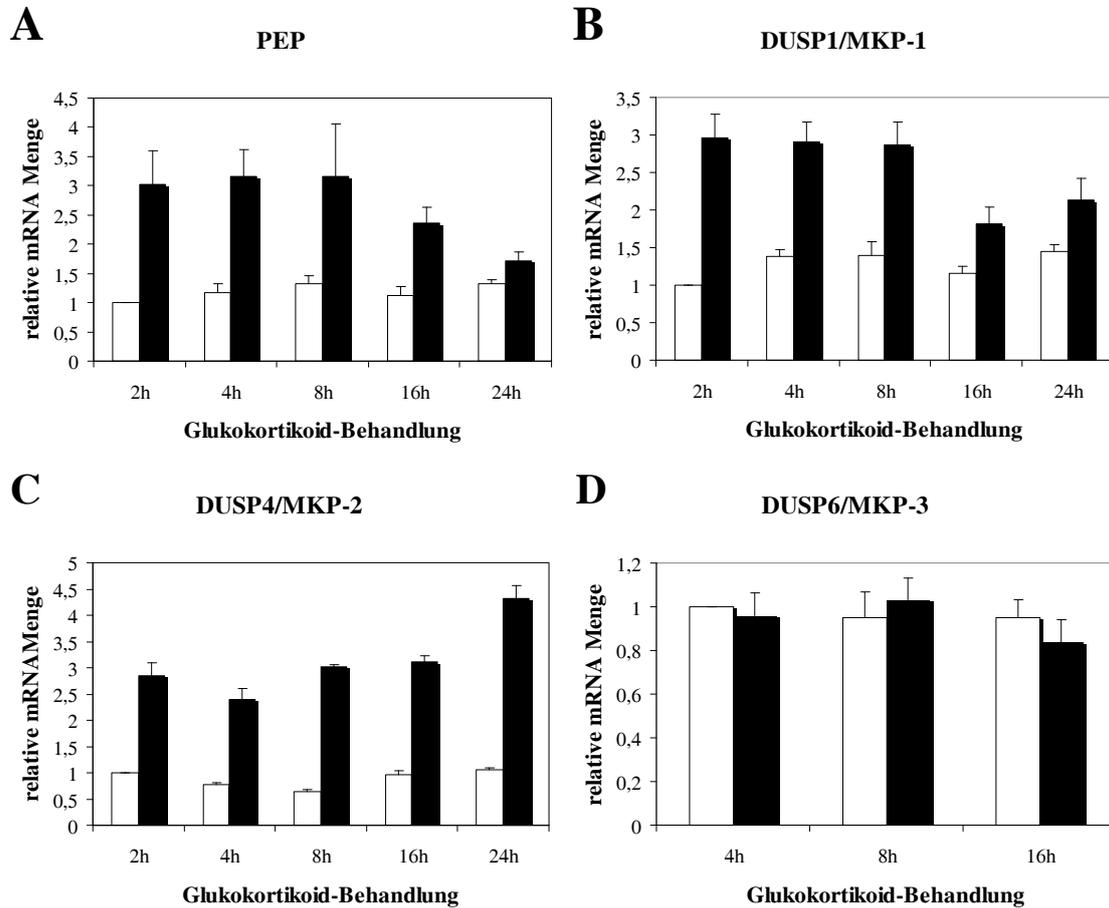


Abb.4.8 Glukokortikoide erhöhen die mRNA-Menge der Phosphatasen PEP, MKP-1 und MKP-2. Jeweils 2×10^6 BMMC wurden für 2, 4, 8, 16 und 24 Stunden (h) mit Dexamethason (100 nM) oder Ethanol (0,01%) behandelt und anschließend geerntet und lysiert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und im quantitativen Real time-PCR-Verfahren analysiert, wobei spezifische Oligonukleotidprimer für PEP, DUSP1/MKP-1, DUSP4/MKP-2, DUSP6/MKP-3 und 36B4 verwendet wurden. Die Bestimmung der mRNA-Menge des 36B4-Gens diente als interne Kontrolle und wurde zur Normalisierung herangezogen. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei Experimenten. □, Ethanol; ■, Dexamethason.

Darüber hinaus war die mRNA-Menge dieser Phosphatasen bereits 2 und 4 Stunden nach Zugabe des Glukokortikoids deutlich erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Auch nach 24 Stunden der Dexamethason-Behandlung war noch ein Anstieg in der Transkript-Menge festzustellen, wenn auch etwas schwächer im Fall von PEP und MKP-1. Die ohnehin relativ schwache Glukokortikoid-Regulation der MKP-3-

mRNA-Menge (Tab.2) hatte sich nicht bestätigt (Abb.4.8D). Als Konsequenz wurde diese Phosphatase als möglicher Kandidat für die Glukokortikoid-abhängige Hemmung der MAP Kinase-Phosphorylierung ausgeschlossen.

Um zu überprüfen, ob PEP, MKP-1 und MKP-2 auch unter den Bedingungen durch Dexamethason induziert werden, bei denen die ERK1 und ERK2 sowie die p38 MAP Kinase nach IgE-Rezeptor-Aktivierung phosphoryliert werden, wurde die mRNA-Menge dieser Phosphatasen in antigenstimulierten BMMC analysiert.

Zu diesem Zweck wurden BMMC für 6 Stunden in Gegenwart von Dexamethason behandelt, mit anti-DNP IgE sensibilisiert und anschließend mittels DNP für 5 min stimuliert. Die Zellen wurden geerntet und lysiert und die Menge der isolierten PEP-, MKP-1- und MKP-2-mRNA wurde mit Hilfe der quantitativen Real-time PCR-Analyse bestimmt.

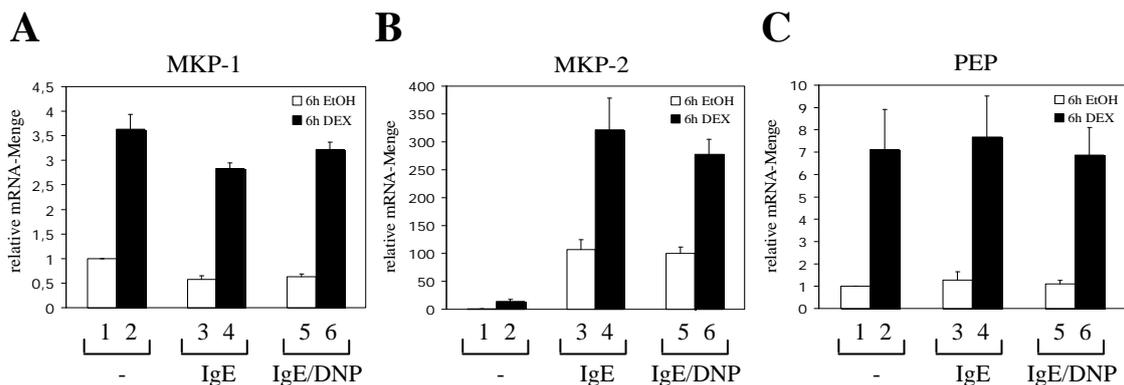


Abb.4.9 Der Effekt von Dexamethason auf die MKP-1-, MKP-2- und PEP-mRNA-Menge in unbehandelten, IgE- und IgE/Antigen-behandelten BMMC. Jeweils 2×10^6 BMMC wurden 6 Stunden mit Dexamethason (DEX, 100 nM) oder dem Lösungsmittel Ethanol (EtOH, 0,01%) behandelt. Die Sensitivierung mit anti-DNP IgE (IgE, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) erfolgte für 2 Stunden vor der Stimulierung mit DNP-HSA (500 ng/ml) für 5 min. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und im quantitativen Real-time PCR-Verfahren analysiert, wobei spezifische Oligonukleotidprimer für MKP-1 (A), MKP-2 (B), PEP (C) sowie 36B4 als interne Kontrolle verwendet wurden. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei Experimenten.

Das Ergebnis dieser Analyse zeigt, dass die PEP- und MKP-1-mRNA-Menge sowohl in unbehandelten als auch in IgE- und IgE/DNP-stimulierten BMMC ähnlich stark durch Dexamethason erhöht wird (Abb.4.9A,C Vgl. Spur 1 mit 2, Spur 3 mit 4 und Spur 5 mit 6). Die MKP-2-mRNA-Menge ist unter diesen Bedingungen ebenfalls in den Dexamethason-behandelten BMMC erhöht im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb.4.9B, Vgl. Spur 1 mit 2, Spur 3 mit 4 und Spur 5 mit 6), wobei die

Transkript-Menge auch sehr stark durch die IgE-Behandlung erhöht wird (Abb.4.9B, Vgl. Spur 1 mit 3). Die 5-minütige Stimulierung der IgE-behandelten Zellen mit DNP hat keinen Einfluss auf die Menge der PEP-, MKP-1- und MKP-2-mRNA (Abb.4.9A-C, Vgl. Spuren 3 und 4 mit 5 und 6).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression von MKP-1, MKP-2 und PEP nicht nur in unstimulierten sondern auch in IgE- und IgE/Antigen-behandelten BMMC durch Dexamethason erhöht wird. Aufgrund der Korrelation dieses Glukokortikoid-Effekts mit der Herabsetzung der antigeninduzierten ERK1/2- und p38 MAP Kinase-Phosphorylierung könnte die Induktion einer dieser Phosphatasen die Grundlage für die negative Regulation der Aktivität von ERK1/2- und p38 MAP Kinase durch Dexamethason sein.

4.4 Effekt von Dexamethason auf die IgE-Rezeptor-abhängige p38 MAP Kinase- und ERK1/2-Phosphorylierung in BMMC von PEP Knockout-Mäusen

Die Expression des PEP-Gens ist auf hämatopoietische Zellen beschränkt (Cloutier und Veillette, 1996). Die Rolle dieser Tyrosinphosphatase bei der Regulation der Mastzell-Aktivierung ist bislang nicht bekannt. Für T-Lymphozyten wurde hingegen gezeigt, dass die Abwesenheit von PEP in einer verstärkten Phosphorylierung der MAP Kinasen ERK1/2 und p38 MAPK nach T-Zell-Rezeptor-Stimulierung resultiert und eine gesteigerte Proliferation zur Folge hat (Hasegawa et al, 2004). Mit Hilfe von BMMC sollte zunächst untersucht werden, welches Wirkungsprinzip der beobachteten Glukokortikoid-Regulation der PEP-mRNA-Menge zugrunde liegt.

4.4.1 Glukokortikoide regulieren die PEP-Expression auf Promotorebene

Um zu überprüfen, ob die Glukokortikoid-vermittelte Erhöhung der PEP-mRNA-Menge auf einer gesteigerten Transkription des PEP-Gens beruht, wurde die Aktivität des PEP-Promotors in Dexamethason-behandelten BMMC mit Hilfe der Luziferase-Reportergen-Analyse bestimmt. Dabei wurden BMMC mit einem Reporterkonstrukt transfiziert, bei dem die Transkription der kodierenden Sequenz der *Photinus*-Luziferase durch die 5'-Promotor-Region des murinen PEP-Gens kontrolliert wird (pGL3 PEP). Als Kontrolle für die Glukokortikoid-Wirkung wurden parallel dazu

Zellen mit einem Reporterkonstrukt transfiziert, welches den Promotorbereich des Glukokortikoid-regulierten mouse mammary tumor virus (MMTV)-Gens enthält (pGL3 MMTV). Als Negativkontrolle wurde das promotorlose Luziferase-Reporterkonstrukt verwendet (pGL3). Um mögliche Unterschiede in der Transfektionseffizienz berücksichtigen zu können, wurden ein Expressionsvektor co-transfiziert, der die *Renilla*-Luziferase konstitutiv exprimiert. Vier Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 20 Stunden mit Dexamethason oder Ethanol behandelt, anschließend lysiert und die Luziferase-Aktivität, welche proportional zur Promotor-Aktivierung ist, wurde durch Messung der Lumineszenz bestimmt. In Abb.4.10 ist das Ergebnis der Reporteragen-Analyse dargestellt.

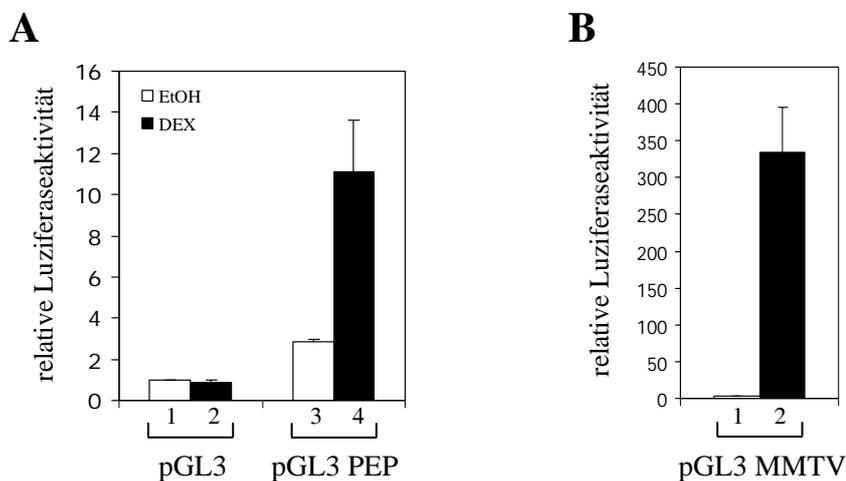


Abb.4.10 Dexamethason erhöht die Promotoraktivität des murinen PEP-Gens in BMMC. Zur Bestimmung der PEP-Promotor-Aktivität in BMMC wurden 3×10^6 Zellen mit $2,5 \mu\text{g}$ eines *Renilla*-Luziferase-Expressionsvektors und $6 \mu\text{g}$ eines PEP-Promotor (pGL3 PEP)-, MMTV-Promotor (pGL3 MMTV)- oder promotorlosen (pGL3) Luziferase-Reporterkonstrukts mittels Elektroporation in einem Volumen von $200 \mu\text{l}$ co-transfiziert. Nach 4 Stunden wurden die Zellen für 20 Stunden mit Dexamethason (100 nM, DEX) oder nur dem Vehikel Ethanol (0,01%, EtOH) behandelt, geerntet und lysiert. Anschließend wurde die *Photinus*-Luziferase-Aktivität gemessen und zur *Renilla*-Luziferase-Aktivität normalisiert. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der relativen Aktivität der *Photinus*-Luziferase von zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Die dargestellten Werte beziehen sich auf die Aktivität von Ethanol-behandelten Zellen, die mit dem promotorlosen Konstrukt transfiziert wurden (Spur 1).

Vergleicht man die Luziferase-Aktivität von unbehandelten Zellen, die mit dem PEP-Promotorkonstrukt transfiziert wurden mit der Aktivität des promotorlosen Konstrukts, ist bereits eine Aktivierung des PEP-Promotors feststellbar (Abb.4.10A, Vgl. Spuren 1 und 3). Diese Aktivität ist in Dexamethason-behandelten Zellen um das

4-fache erhöht (Abb.4.10A, Vgl. Spuren 3 und 4). Die Aktivität des MMTV-Promotors ist ebenfalls in Glukokortikoid-abhängiger Weise induziert (Abb.4.10B, Vgl. Spuren 1 und 2). Demnach kann die PEP-Promotor-Aktivierung in den Dexamethason-behandelten Zellen auf die Glukokortikoid-Wirkung zurückgeführt werden. Dieses Experiment weist somit darauf hin, dass Glukokortikoide die Expression des PEP-Gens auf der Ebene des Promotors regulieren.

4.4.2 Die Repression der ERK1/2- und p38 MAP Kinase-Phosphorylierung in Dexamethason-behandelten BMMC erfolgt unabhängig von PEP

Die Bedeutung der Proteintyrosinphosphatase PEP für die Glukokortikoid-vermittelte Hemmung der ERK1/2- und p38-Phosphorylierung in Mastzellen wurde mit Hilfe von BMMC untersucht, welche von genetisch veränderten Mäusen stammten, denen das PEP-Protein fehlt. Zu diesem Zweck wurden BMMC von Wildtyp- und PEP-Knockout Mäusen generiert, deren Genotyp mittels PCR-Analyse bestimmt worden war. Die Zellen wurden für 16 Stunden mit Dexamethason oder Ethanol behandelt, mit anti-DNP IgE inkubiert und mittels DNP stimuliert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten (0,5-30 Minuten) lysiert. Die DNP-induzierte Phosphorylierung der p38 MAP Kinase und ERK1/2 wurde mittels Immunoblot-Analyse bestimmt.

Das Ergebnis der Analyse ist in Abb.4.11 dargestellt. Vergleicht man zunächst die Phosphorylierung von ERK1/2 und der p38 MAP Kinase in unbehandelten Wildtyp (PEP WT)- und PEP-defizienten (PEP KO) BMMC, sind keine wesentlichen Unterschiede erkennbar (Abb.4.11, Vgl. Spuren 1-6 mit 13-18). Die DNP-abhängige Phosphorylierung beider Kinasen ist nach 1 Minute maximal (s. Spuren 3 und 15) und nimmt nach zunehmender DNP-Inkubation wieder ab, wobei ERK1 und ERK2 nach 10 und 30 Minuten wieder in dephosphorylierter Form vorliegen, während die Phosphorylierung der p38 MAP Kinase noch anhält (s. Spuren 5, 6, 17 und 18).

Ein Vergleich von unbehandelten mit Dexamethason-behandelten Wildtyp-Zellen zeigt, dass die Phosphorylierung der p38 MAP Kinase wie erwartet durch Dexamethason gehemmt wurde (Vgl. Spuren 2-6 mit 8-12). Die Glukokortikoid-abhängige Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung in diesen BMMC ist nur nach 5-minütiger Inkubation der Zellen mit dem Antigen zu erkennen (Vgl. Spur 4 und 10),

da das Signal der Phosphorylierung nach kürzeren Stimulierungszeiten zu stark ist, um bestehende Unterschiede detektieren zu können (Vgl. Spur 2 und 3 mit Spur 8 und 9).

Die Analyse der ERK1/2- und p38 MAPK-Phosphorylierung in den PEP-Knockout-BMMC zeigt, dass die Dexamethason-Behandlung ebenfalls in einer Hemmung der DNP-induzierten Aktivität dieser MAP Kinasen resultiert (Vgl. Spuren 14-18 mit 20-24).

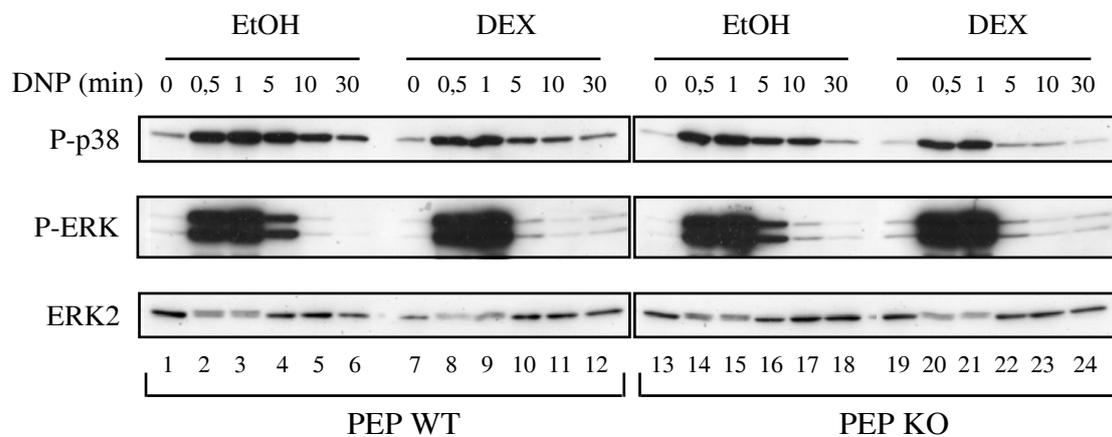


Abb.4.11 Glukokortikoide hemmen die FcεRI-abhängige Phosphorylierung der p38 MAP Kinase und ERK1/2 in BMMC von Wildtyp- und PEP Knockout-Mäusen. Je 2×10^6 BMMC von Wildtyp- (PEP WT) und PEP Knockout (PEP KO)-Mäusen wurden für 16 Stunden mit Dexamethason (DEX, 100 nM) oder dem Lösungsmittel Ethanol (EtOH, 0,01%) behandelt und für die letzten 2 Stunden der Behandlung in Gegenwart von anti-DNP IgE (1 µg/ml) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 0,5-30 min mit DNP-HSA (500 ng/ml, DNP) stimuliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Lyse-Puffers gestoppt und die Gesamtzell-Lysate wurden mittels Immunoblot-Verfahren analysiert, wobei phospho-ERK1/2-, phospho-p38 MAPK- sowie ein ERK2 Antikörper als Kontrolle verwendet wurden.

Die Analyse der PEP-defizienten BMMC hat somit gezeigt, dass die Glukokortikoid-abhängige Repression der ERK1/2- und p38 MAP Kinase-Phosphorylierung in Dexamethason-behandelten BMMC auch in Abwesenheit von PEP stattfinden kann. Da auch noch kürzeren Glukokortikoid-Behandlungszeiten (4, 6, 8 und 12 Stunden) keine Hemmung der ERK1/2- und p38 MAP Kinase-Phosphorylierung in BMMC von PEP Knockout-Mäusen festgestellt wurden (nicht gezeigte Daten), kann die Induktion der Phosphatase PEP nicht die Ursache für die negative Regulation dieser MAP Kinasen sein.

4.5 Die Glukokortikoid-vermittelte Repression der p38 MAP Kinase-Phosphorylierung ist in MKP-1-defizienten BMMC beeinträchtigt

Die Befunde der vorherigen Experimente zeigen, dass neben PEP auch die mRNA-Menge von MKP-1 und MKP-2 in IgE/DNP-stimulierten Mastzellen durch Dexamethason erhöht wird. Um zunächst eine mögliche Funktion von MKP-1 bei der Glukokortikoid-abhängigen Repression der p38 MAP Kinase- und ERK1/2-Aktivität zu ermitteln, wurden BMMC von MKP-1 Wildtyp- und MKP-1 Knockout-Mäusen für 4, 8 und 12 Stunden mit Dexamethason behandelt, mit anti-DNP IgE inkubiert und für 5 und 10 min mit DNP stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und der Effekt von Dexamethason auf die MKP-1- und MKP-2-Proteinmenge sowie die Phosphorylierung der p38 MAPK und ERK1/2 wurde im Western blot-Verfahren analysiert.

Das Resultat der Analyse zeigt, dass die MKP-1-Menge sowohl in IgE- als auch in DNP-behandelten Wildtyp-Zellen, die in Gegenwart von Dexamethason kultiviert wurden, erhöht ist (Abb.4.12 Vgl. Spur 2-7, 16-21 und 30-35). BMMC von MKP-1 Kockout-Mäusen zeigten erwartungsgemäß keine Zunahme der MKP-1-Proteinmenge (Abb.4.12 Spuren 8-14, 22-28 und 36-42).

Die Analyse des MKP-2-Western blots zeigte ebenfalls einen Anstieg in der MKP-2-Proteinmenge in Dexamethason behandelten BMMC, wobei die MKP-2-Menge in für 5 Minuten DNP-stimulierten Zellen allgemein höher ist als in unstimulierten Zellen (Abb.4.12 Vgl. z.B. Spur 2 und 3 mit den Spuren 4-7). Die geringere Migrationsgeschwindigkeit des MKP-2-Proteins während der Gelelektrophorese in DNP-stimulierten Zellen (Shift der MKP-2-Bande nach oben) weist auf eine antigeninduzierte Phosphorylierung des Proteins hin (Abb.4.12 Vgl. z.B. Spur 3 und 5). Unterschiede in der MKP-2-Expression in Wildtyp- und MKP-1 knockout-BMMC sind darüber hinaus nicht vorhanden (Abb.4.13 Vgl. MKP-1 WT mit MKP-1 KO).

Die Analyse der p38 MAP Kinase-Phosphorylierung ergab, dass in MKP-1-defizienten BMMC, die für 4 und 8 Stunden in Gegewart von Dexamethason kultiviert wurden, die DNP-induzierte Phosphorylierung von p38 MAPK nicht durch Dexamethason herabgesetzt werden konnte (Abb.4.12 Vgl. Spuren 11-14 und Spuren

25-28), während die p38 MAPK-Phosphorylierung in Dexamethason-behandelten Wildtyp-BMMC gehemmt wurde (Abb.4.12 Vgl. Spuren 4-7 und Spuren 18-21). In BMMC von MKP-1 Knockout-BMMC, die 12 Stunden mit Dexamethason behandelt wurden, konnte die Glukokortikoid-Behandlung die p38 MAPK-Phosphorylierung jedoch inhibieren (Abb.4.12 Vgl. Spuren 39-42).

Die Untersuchung der Dexamethason-Wirkung auf die Phosphorylierung von ERK1/2 in MKP-1 Knockout-BMMC ergab darüber hinaus, dass die Hemmung dieser Kinasen durch Dexamethason, welche nach 8 und 16 Stunden erkennbar war, sowohl in den Wildtyp- als auch in den MKP-1-defizienten Mastzellen stattfindet (Abb.4.12 Vgl. Spuren 18-21 und 32-35 und die Spuren 25-28 und 39-42).

Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren, dass die Hemmung der IgE/DNP-induzierten p38 MAP Kinase-Phosphorylierung durch Dexamethason im Fall einer 4- und 8-stündigen Glukokortikoid-Behandlung die Induktion der Phosphatase MKP-1 benötigt, wohingegen die Wirkung von Dexamethason nach einer längeren Behandlung von 12 Stunden unabhängig von MKP-1 erfolgt. Darüber hinaus findet die negative Regulation der ERK1/2-Aktivität gänzlich in Abwesenheit von MKP-1 statt und benötigt demnach keine Induktion von MKP-1.

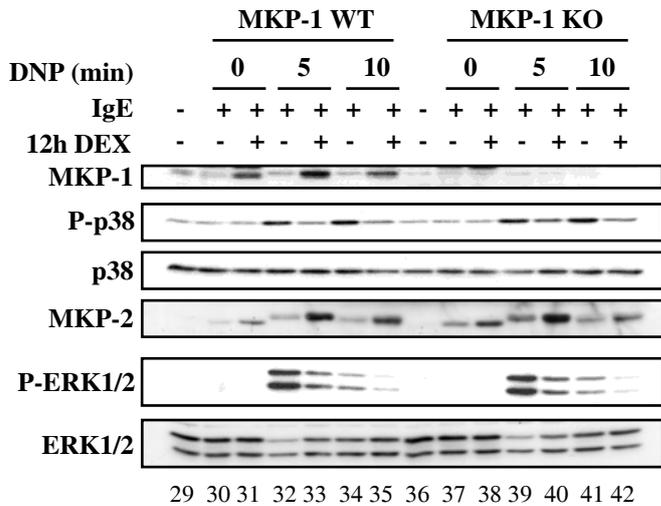
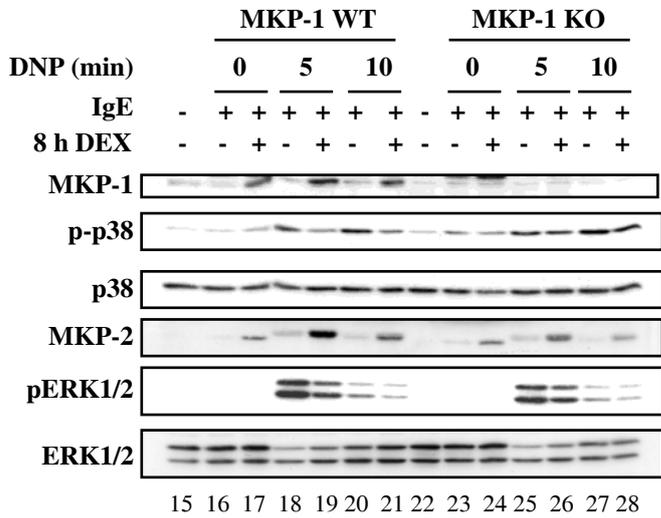
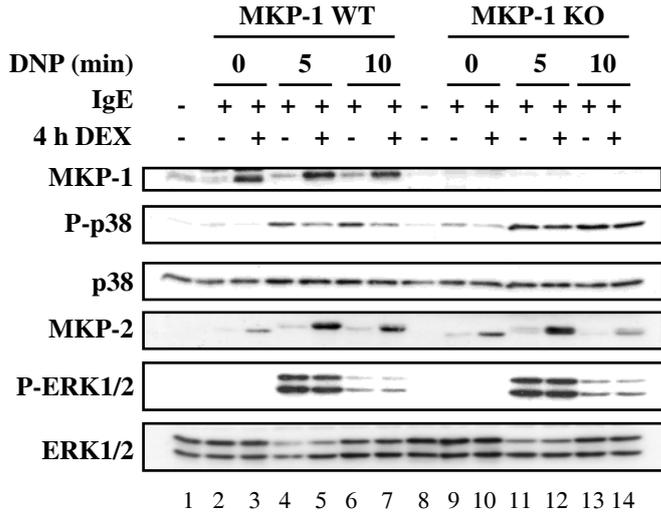


Abb.4.12 Effekt von Dexamethason auf die p38 MAP Kinase- und ERK1/2-Phosphorylierung in BMMC von MKP-1 Wildtyp- und MKP-1 Knockout-BMMC.

Je 2×10^6 BMMC von Wildtyp- (WT) und MKP-1 Knockout (KO)-Mäusen wurden für die angegebenen Zeiträume mit Dexamethason (DEX, 100 nM) oder nur dem Vehikel Ethanol (0,01%) behandelt und für 2 Stunden mit anti-DNP IgE (1 μ g/ml, IgE) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 5 und 10 min mit DNP-HSA (500 ng/ml, DNP) stimuliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Lyse-Puffers gestoppt und die Gesamtzell-Lysate wurden mittels Immunoblot-Verfahren analysiert, wobei phospho-ERK1/2-, phospho-p38 MAPK-, MKP-1-, MKP-2-, sowie p38 MAPK- und ein ERK1/2-Antikörper als Kontrolle verwendet wurden.

4.6 Eine Reduktion der MKP-2-Expression mittels siRNA hat keinen Einfluss auf die Hemmung der ERK1/2- und p38 MAP Kinase-Phosphorylierung durch Dexamethason

Die vorherigen Experimente zeigen, dass die Glukokortikoid-abhängige Regulation der p38 MAP Kinase durch die Induktion von MKP-1 vermittelt werden kann, die Hemmung der ERK1/2-Phosphorylierung jedoch nicht. Da die Phosphatase MKP-2 ebenfalls in Glukokortikoid-behandelten BMMC hochreguliert wird, wurde nun überprüft, ob womöglich MKP-2 in der Lage ist, die negative Regulation von ERK1/2 zu vermitteln. Leider bestand kein Zugang zu der existierenden MKP-2 Knockout-Mauslinie. Um trotzdem die Rolle der MKP-2-Induktion bei der Vermittlung der Glukokortikoid-Wirkung in Mastzellen untersuchen zu können, wurde die MKP-2-Proteinmenge durch Transfektion von Wildtyp-BMMC mit MKP-2-siRNA reduziert (sog. MKP-2-Knockdown). Anschließend wurde die Fähigkeit von Dexamethason, die antigeninduzierte Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 in diesen Zellen herabszusetzen, mit Hilfe des Western blot-Verfahrens analysiert. Um feststellen zu können, ob die Reduktion der MKP-2-Menge möglicherweise auch Auswirkungen auf die p38 MAP Kinase-Aktivität hat, wurde neben der Phosphorylierung von ERK1/2 auch die der p38 MAP Kinase bestimmt. Als Kontrolle wurde die Proteinmenge von MKP-2 und MKP-1 sowie der p38 MAP Kinase bestimmt.

Das Ergebnis der Immunoblot-Analyse zeigt, dass die MKP-2-Menge in BMMC, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden, infolge der Dexamethason-Behandlung erhöht ist, wobei die MKP-2-Induktion in IgE/DNP-behandelten Zellen deutlich stärker ist als in unstimulierte Zellen (Abb.4.13 Vgl. Spur 2 mit 3 und Spur 4 mit 5). BMMC, die mit der MKP-2-siRNA transfiziert wurden, hatten drastisch geringere Mengen an MKP-2 als die Kontrollzellen (Abb.4.13 Vgl. Spuren 7-10 mit den Spuren 2-5). Beide Zellpopulationen zeigen darüber hinaus sowohl eine DNP-abhängige Aktivierung von ERK1/2 als auch eine Hemmung dieser Phosphorylierung durch Dexamethason (Abb.4.13 Vgl. Spuren 4-5 und 9-10). Die relativ schwache ERK1/2-Phosphorylierung in den mit MKP-2-siRNA transfizierten BMMC ist auf die geringere Menge an eingesetztem Zell-Lysat zurückzuführen (Vgl. p38 MAPK-Western blot Spuren 4-5 mit 9-10). Neben der ERK1/2-Phosphorylierung ist auch die Phosphorylierung der p38 MAP Kinase in den in Gegenwart von Dexamethason

kultivierten MKP-2 Knockdown-BMMC reduziert (Abb.4.13 Vgl. Spuren 2-5 und 7-8). Die Analyse des MKP-1-Western blots beweist, dass die Menge an MKP-1 in diesen Zellen durch die Dexamethason-Behandlung erhöht wurde (Abb.4.13 Vgl. Spuren 2-5 und 7-8).

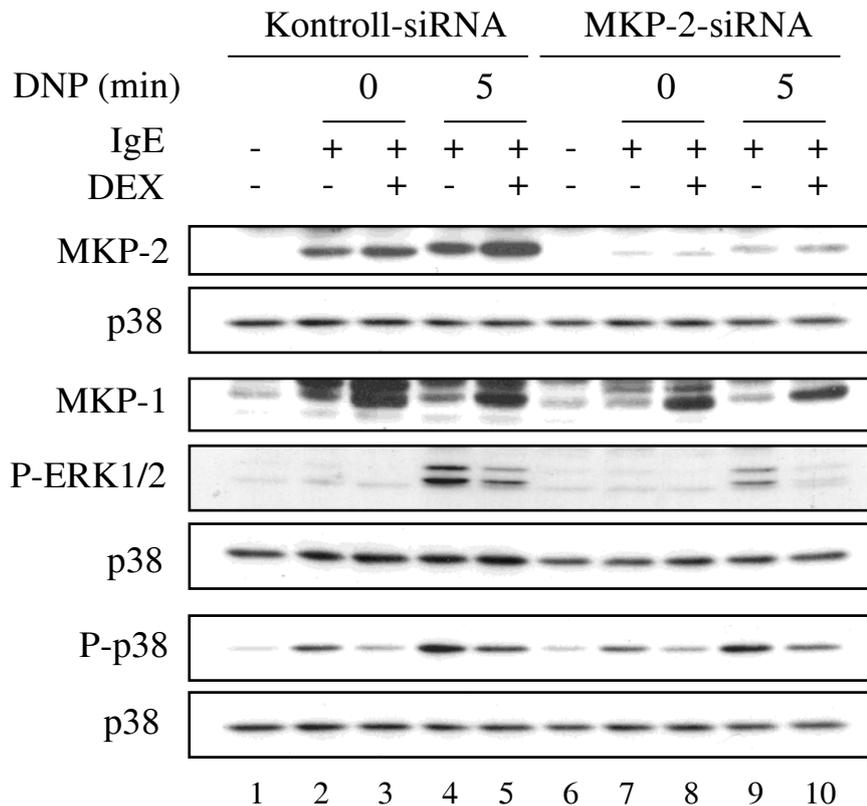


Abb.4.13 Effekt von Dexamethason auf die p38 MAP Kinase- und ERK1/2-Phosphorylierung in MKP-2-siRNA transfizierten BMMC. Je 4×10^6 BMMC wurden mit 1 μ M Kontroll- oder MKP-2-siRNA mittels Elektroporation transfiziert. 20 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 4 Stunden mit Dexamethason (100 nM, DEX) oder dem Vehikel Ethanol (0,01%) behandelt und für die letzten 2 Stunden der Behandlung in Gegenwart von anti-DNP IgE (1 μ g/ml) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 5 min mit DNP-BSA (500 ng/ml) stimuliert und geerntet. Die Gesamtzell-Lysate wurden präpariert und mittels Western blot-Verfahren analysiert, wobei phospho-ERK1/2-, phospho-p38 MAPK-, MKP-1-, MKP-2- und ein p38 MAPK Antikörper als Kontrolle verwendet wurden.

Dieses Ergebnis demonstriert, dass die Glukokortikoid-abhängige negative Regulation der ERK1/2- und p38 MAP Kinase-Phosphorylierung unter MKP-2-reduzierten Bedingungen stattfindet. Folglich ist die Induktion von MKP-2 nicht ausreichend, um die Hemmung der ERK1/2-Phosphorylierung durch Dexamethason zu vermitteln. Darüber hinaus ist MKP-2 nicht in der Lage, eine Repression der p38 MAP Kinase-Phosphorylierung hervorzurufen.

4.7 Die Wirkung von Dexamethason auf die Expression von pro-inflammatorischen Genen in MKP-1 Knockout- und MKP-2 Knockdown-BMMC

Nachdem gezeigt wurde, dass eine relativ kurzfristige Dexamethason-Behandlung von MKP-1-defizienten BMMC keine Hemmung der IgE/Antigen-induzierten p38 MAP Kinase-Phosphorylierung herbeiführen konnte, wurde nun überprüft, ob die Glukokortikoid-abhängige Repression von einigen Entzündungsgenen in MKP-1 Knockout-BMMC beeinträchtigt ist. Dabei wurde der Effekt von Dexamethason auf die antigeninduzierte Erhöhung der mRNA-Menge der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6, der Matrixmetalloproteinase MMP13 (auch bekannt als Kollagenase 1) und des Chemokin (CXC) Liganden (Ccl)-2 (MCP-1) analysiert. Um herauszufinden, ob die MKP-2-Induktion möglicherweise an der negativen Regulation der Expression dieser Gene beteiligt ist, wurden auch Wildtyp- und MKP-1 Knockout-BMMC analysiert, deren MKP-2-Expression mittels siRNA herabgesetzt wurde.

Zu diesem Zweck wurden BMMC von Wildtyp- und MKP-1 Knockout-Mäusen mit Kontroll- oder MKP-2-siRNA transfiziert. Nach 20 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen für 4 Stunden mit Dexamethason behandelt und mit anti-DNP IgE inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit DNP stimuliert und geerntet. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und im quantitativen Real time-PCR-Verfahren mit Oligonukleotid-Primern für TNF- α , IL-6, Ccl-2 und MMP13 analysiert.

Die Auswertung der PCR-Analyse zeigt, dass die mRNA-Menge von TNF- α , IL-6 und Ccl2 in IgE/DNP-stimulierten Wildtyp-BMMC (WT) deutlich höher ist als in unstimulierten Zellen (Abb.4.14 A-C, Vgl. Spur 1 und 2). Vergleicht man die Glukokortikoid (DEX)- und Vehikel (EtOH)-behandelte Zellen, zeigt sich, dass die Behandlung der Zellen mit Dexamethason in einer Reduktion der mRNA-Menge dieser Gene resultierte (Abb.4.14 A-C, Vgl. EtOH und DEX der Spuren 1 und 2). Die IgE/DNP-abhängige Induktion der mRNAs sowie deren Repression durch Dexamethason ist in den MKP-1 Knockout-BMMC (KO) in gleichem Ausmaß erkennbar (Abb.4.14 A-C, Vgl. Spuren 3 und 4 mit 1 und 2). Ebenso hatte der Knockdown von MKP-2 sowohl in Wildtyp- als auch in MKP-1-defizienten BMMC

keine Auswirkung auf die Regulation der untersuchten mRNAs durch Dexamethason (Abb.4.14 A-C, Vgl. Spuren 5-8).

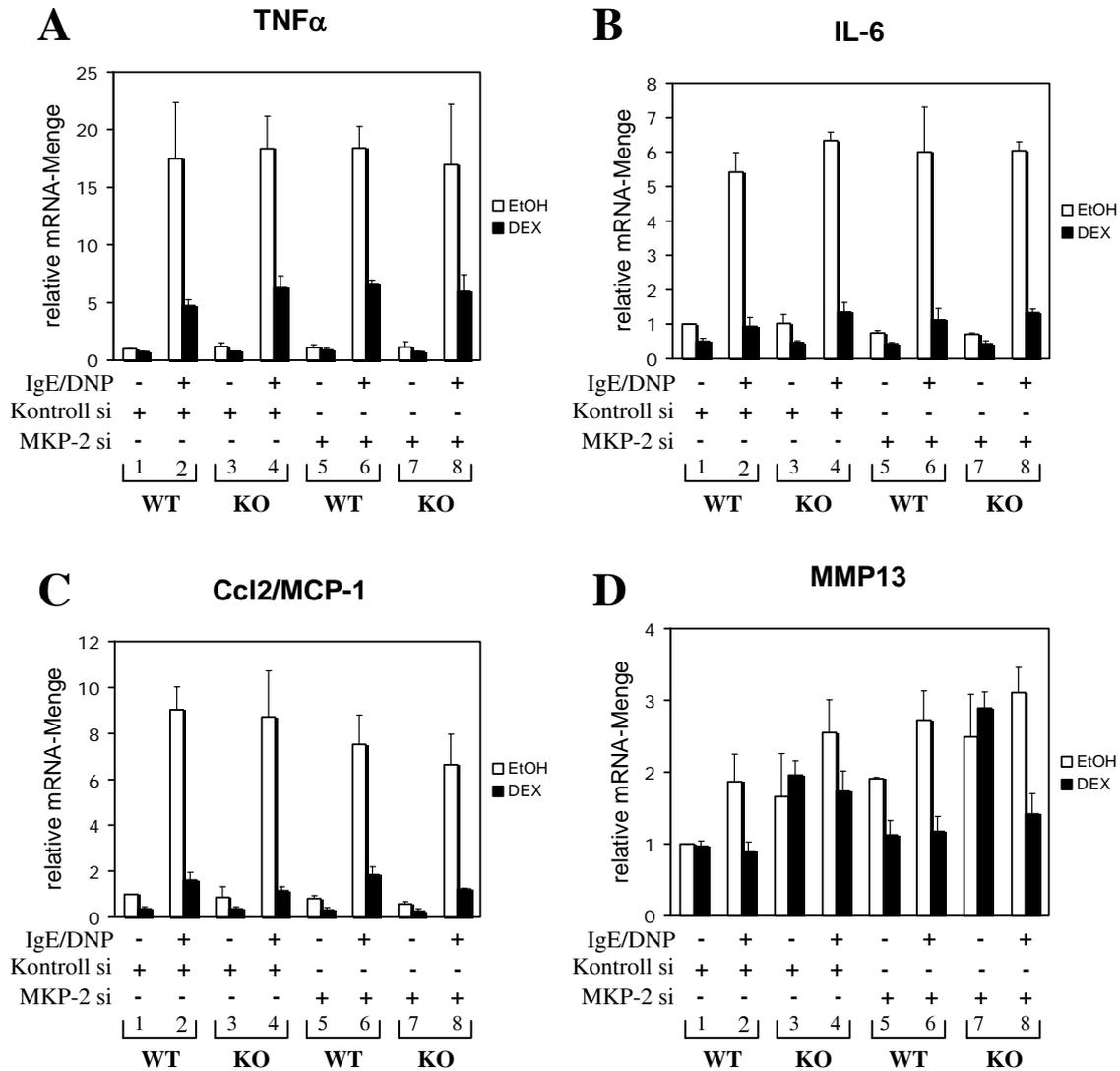


Abb.4.14 Effekt von Dexamethason auf die Expression pro-inflammatorischer Gene in BMBC von Wildtyp- und MKP-1 Knockout-Mäusen, die mit MKP-2-siRNA transfiziert wurden. Je 6×10^6 BMBC wurden mit Kontroll- oder MKP-2-siRNA (si) transfiziert. 20 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 4 Stunden mit Dexamethason (100 nM, DEX) oder dem Lösungsmittel Ethanol (0,01%, EtOH) behandelt und für die letzten 2 Stunden der Behandlung in Gegenwart von anti-DNP IgE (1 μ g/ml, IgE) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 30 min mit DNP-HSA (500 ng/ml, DNP) inkubiert und geerntet. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und mittels Real time-PCR analysiert, wobei Primer für TNF- α , IL-6, Ccl2 (MCP-1), MMP13 verwendet wurden. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei Experimenten.

Ein ähnliches Regulationsmuster weist die mRNA-Menge von MMP13 auf (Abb.4.14 C), wobei die Inkubation der Zellen mit IgE und DNP nur zu einer relativ schwachen

Zunahme der mRNA-Menge führte (Abb.4.14 C, Vgl. Spuren 1 und 2). Die Dexamethason-Behandlung resultierte auch hier in allen IgE/DNP-stimulierten Zellen in einer Herabsetzung der MMP13-mRNA (Abb.4.14 C, Vgl. Spuren 2, 4, 6 und 8).

Die Ergebnisse dieser Expressionsanalyse verdeutlichen, dass die Induktion von MKP-1 nicht ausreicht, um die inhibitorische Wirkung von Dexamethason auf die mRNA-Menge der untersuchten Gene zu vermitteln. Ebenso kann die MKP-2-Induktion nicht der Grund für die Reduktion der mRNA-Menge dieser Entzündungsgene durch Dexamethason sein.

4.8 Die antigeninduzierte systemische anaphylaktische Reaktion in MKP-1 Knockout-Mäusen wird durch Dexamethason gehemmt

Die Stimulierung von BMDC mit IgE und DNP resultiert nicht nur in einer verstärkten Expression von pro-inflammatorischen Genen, sondern auch in einer schnellen Freisetzung von sogenannten Entzündungsmediatoren, wie Histamin, Eikosanoiden und proteolytischen Enzymen (Tanaka et al, 2005). Diese Entzündungsmediatoren wirken im Organismus auf die glatte Muskulatur vasodilatatorisch und erhöhen die Gefäßpermeabilität. Bei einer systemischen Exposition gegenüber einem Antigen, gegen das bereits IgE-Antikörper gebildet wurden, kommt es daher aufgrund der Mediatorfreisetzung zu einem raschen Abfall des Blutdrucks, der zusammen mit der hohen Durchlässigkeit der Gefäßwände bis zum Tode führen kann. Diese anaphylaktische Reaktion kann durch Behandlung mit Glukokortikoiden gehemmt werden.

Um herauszufinden, ob die Glukokortikoid-abhängige Induktion von MKP-1 in Mastzellen bei der Hemmung einer DNP-induzierten systemischen anaphylaktischen Reaktion beteiligt ist, wurde eine passive systemische Anaphylaxie mittels anti-DNP IgE und DNP in Dexamethason-behandelten MKP-1 Knockout-Mäusen induziert. Der Abfall der Körpertemperatur diente dabei als Parameter für die allergische Reaktion.

Wildtyp- und MKP-1 Knockout-Mäuse wurden zunächst mit IgE vorbehandelt. Nach einer Inkubationszeit von 21 Stunden bekamen die Mäuse entweder Dexamethason oder nur das Lösungsmittel PBS durch intraperitoneale Injektion verabreicht. Nach

weiteren 3 Stunden wurde die Körpertemperatur der Tiere rektal mit einem Thermometer gemessen. Anschließend wurde entweder DNP oder ebenfalls PBS als Kontrolle intravenös zugeführt. Sofort nach der DNP- bzw. PBS-Gabe wurde dann die Temperatur alle 5 min über einen Zeitraum von 1 Stunde gemessen und notiert.

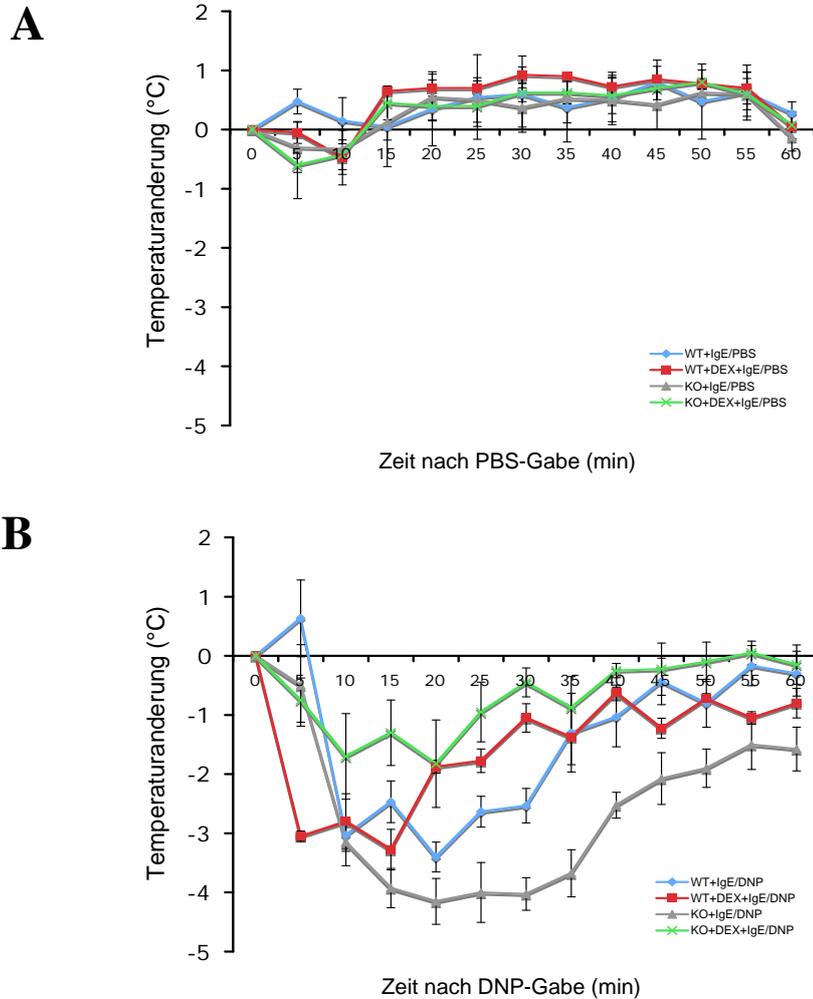


Abb.4.15 In MKP-1 Knockout-Mäusen wird die passive systemische anaphylaktische Reaktion durch die Gegenwart von Dexamethason gehemmt. Wildtyp (WT)- und MKP-1 Knockout (KO)-Mäusen wurden pro 20 g Körpergewicht (KG) 100 µl einer anti-DNP IgE-Lösung (0,2 mg/ml PBS; IgE) in die Bauchhöhle injiziert. Nach ca. 21 Stunden bekamen die Mäuse 100 µl Dexamethason (wasserlöslich; 0,2 mg/ml PBS; DEX) oder 100 µl des Lösungsmittels PBS pro 20 g KG ebenfalls per intraperitoneale Injektion verabreicht. 3 Stunden später wurde die Körpertemperatur der Mäuse rektal mit einem Veterinär-Fieberthermometer gemessen. Anschließend wurden 200 µl PBS (A) oder 200 µg DNP-HSA (in 200 µl PBS gelöst; DNP) (B) intravenös injiziert und die Temperatur wurde in 5-Minuten-Intervallen gemessen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von 3 oder 4 Mäusen ± Standardfehler des Mittelwertes.

Das Ergebnis dieses Experiments ergab zunächst, dass die DNP-Injektion bei allen Tieren innerhalb weniger Minuten eine schnelle Abnahme der Körpertemperatur hervorrief, die mit zunehmender Zeit wieder schwächer wurde (Abb 4.15 B) Die Gabe des Vehikels PBS verursachte erwartungsgemäß keine wesentliche Veränderung der Ausgangstemperatur (Abb.4.15 A). Ein Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Temperaturveränderung bei Wildtyp (WT)- und MKP-1 Knockout (KO)-Mäusen verdeutlicht, dass die DNP-Gabe in den MKP-1-defizienten Tieren eine stärkere und länger anhaltende Reduktion der Temperatur auslöste (Abb.4.15 B, Vgl. blaue und graue Kurve). Bei den Wildtyp-Mäusen, die mit Dexamethason behandelt wurden, konnte die DNP-Injektion nur für eine relativ kurze Zeit eine deutliche Temperaturveränderung hervorrufen im Vergleich zu den Kontroll-Tieren, da sich Körpertemperatur nach 15 min wieder schnell der Ausgangstemperatur annäherte (Abb.4.15 B, Vgl. blaue und rote Kurve). Die Dexamethason-behandelten MKP-1 Knockout-Mäuse zeigten eine insgesamt schwächere Reduktion der Körpertemperatur als unbehandelte MKP-1 Knockout-Mäuse, wobei sich die Werte ebenfalls wieder relativ schnell der Ausgangstemperatur annäherten (Abb.4.15 B, Vgl. graue und grüne Kurve).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Phosphatase MKP-1 an der negativen Regulation einer antigeninduzierten allergischen Reaktion beteiligt ist, aber dennoch nicht ausreicht, um die suppressive Wirkung des Glukokortkoids auf diese Entzündungsreaktion zu vermitteln.

5. Diskussion

Mastzellen spielen eine wichtige Schlüsselrolle bei der spezifischen, antigenvermittelten Immunantwort und bei der Entstehung von akuten, unspezifischen Entzündungsreaktionen (Wershil et al, 1988; Wedemeyer et al, 2000; Galli et al, 2005). Die immunologische Aktivierung von Mastzellen erfolgt durch Quervernetzung von IgE-gebundenen Fc ϵ RI-Rezeptoren durch spezifische Antigene und resultiert in der schnellen Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Degranulation), der Produktion von Arachidonsäure-Metaboliten und der Aktivierung der Expression von pro-inflammatorischen Genen (Metcalf et al, 1997). Während einige der verstärkt exprimierten Zytokine und Chemokine zur Rekrutierung von Leukozyten beitragen (Wershil et al, 1991; Biedermann et al, 2000), resultiert die Mediatorfreisetzung in den charakteristischen Symptomen der frühen Phase der Überempfindlichkeitsreaktion, wie sie z.B. bei einer anaphylaktischen Reaktion beobachtet werden (Kemp und Lockey, 2002).

Befunde früherer Studien mit Mastzellen demonstrieren, dass die Mediatorfreisetzung und die Expression von einigen Zytokingenen durch die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ERK1/2 und p38 MAPK verstärkt werden (Gibbs et al, 2002; Kimata et al, 2000; Kassel und Cato, 2002; Hirasawa et al, 2000; Masuda et al, 2002). Glukokortikoide hemmen die Phosphorylierung von ERK1/2 und p38 MAPK (Kassel et al, 2002; Jeong et al, 2003) und die antigeninduzierte Degranulation und Zytokin-Synthese (Daeron et al, 1982; Eklund et al, 1997; Sewell et al, 1998). Die Fähigkeit von Glukokortikoiden, die Phosphorylierung und somit Aktivität dieser MAP Kinasen zu hemmen, könnte daher ein wichtiger Mechanismus sein, durch den Glukokortikoide die IgE-vermittelten Funktionen von Mastzellen reprimieren. Das Wirkungsprinzip der Glukokortikoid-abhängigen Repression der ERK1/2- und p38 MAP-Kinase-Phosphorylierung in Mastzellen ist jedoch noch nicht hinreichend bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden primäre murine Mastzellen (*bone marrow derived mouse mast cells*, BMMC) als Modellsystem verwendet, um die Mechanismen der Glukokortikoid-abhängigen Hemmung der p38 MAP Kinase- und ERK1/2-

Phosphorylierung und deren Bedeutung für die supprimierte Wirkung der Glukokortikoide auf die Funktionen von Mastzellen zu studieren.

Die Behandlung von BMMC mit dem synthetischen Glukokortikoid Dexamethason resultierte in einer Hemmung der antigenabhängigen Phosphorylierung von ERK1/2 und der p38 MAP Kinase. Die Repression der ERK1/2-Phosphorylierung war dabei nach relativ kurzen Dexamethason-Behandlungen (4-8 Stunden) nur schwach und erst mit zunehmender Inkubationszeit stärker (12-16 Stunden) ausgeprägt. Die Behandlung der Zellen mit Dexamethason für 4 Stunden reichte aus, um eine maximale Hemmung der p38 MAP Kinase-Phosphorylierung herbeizuführen. Dieser Unterschied in der Wirkungskinetik der Glukokortikoid-vermittelten Hemmung der p38 MAP Kinase- und ERK1/2-Phosphorylierung wurde auch in anderen Zelltypen beobachtet (Kassel et al, 2001; Lasa et al, 2002; Jeong et al, 2003; Abraham et al, 2006) und deutet daraufhin, dass die negative Regulation der Aktivität dieser Kinasen durch Dexamethason auf unterschiedlichen Wirkungsmechanismen basiert.

5.1 Die positive Regulation von Tyrosinphosphatase-Genen in Dexamethason-behandelten Mastzellen

Die Glukokortikoid-abhängige Hemmung der p38 MAPK-Phosphorylierung in humanen Cervix-Karzinomzellen (HeLa Zellen; Lasa et al, 2001 und 2002) sowie die Repression der ERK1/2-Aktivität in der Dexamethason-behandelten Ratten-Mastzell-Linie RBL-2H3 (Kassel et al, 2001) ist sensitiv gegenüber dem Tyrosinphosphatase-Hemmer Natriumorthovanadat und dem Translationshemmer Cycloheximid. Dies beweist, dass sowohl die Aktivität einer Proteintyrosinphosphatase (PTP) als auch eine *de novo* Proteinsynthese für die Glukokortikoid-abhängige Repression dieser MAP Kinasen benötigt werden. Die Kultivierung von BMMC in Gegenwart von Dexamethason induzierte die Expression der PTP PEP und der MAP Kinase-Phosphatase (MKP)-1 und MKP-2 auf mRNA- sowie Protein-Ebene.

MKP-1 und MKP-2 (auch bekannt als DUSP1 und DUSP4) gehören der Proteinfamilie dual spezifischer Phosphatasen (DUSP) an (Theodosiou und Ashworth, 2002). Die Behandlung der Mastzellen mit Dexamethason hatte keinen signifikanten Effekt auf die mRNA-Menge von MKP-3 (DUSP6). Dies stimmt mit den Ergebnissen

von früheren Studien unserer Arbeitsgruppe überein (Kassel et al, 2001). Ebenso konnte keine Glukokortikoid-abhängige Induktion der Phosphatasen MKP-4 (DUSP9), MKP-5 (DUSP10) und VHR (DUSP3) festgestellt werden. Lediglich die mRNA-Menge von PAC-1 (DUSP2) wurde in BMMC in Gegenwart von Dexamethason ebenfalls erhöht (nicht gezeigte Ergebnisse). Da die kürzliche Charakterisierung von BMMC von PAC-1 Knockout-Mäusen zeigte, dass PAC-1 an der negativen Regulation von JNK1/2 und nicht von ERK1/2 und p38 MAPK beteiligt ist (Jeffrey et al, 2006), wurde diese Phosphatase als potentieller Kandidat für die Vermittlung der ERK1/2- und p38 MAP Kinase-Hemmung durch Glukokortikoide zunächst ausgeschlossen.

Die Analyse der verschiedenen Phosphatasen ergab somit, dass Glukokortikoide nur bestimmte Phosphatase-Gene der DUSP-Familie in BMMC positiv regulieren.

Die Induktion von MKP-1 durch Glukokortikoide wurde in verschiedenen Zelltypen, wie z.B. RBL-2H3 (Kassel et al, 2001), HeLa (Lasa et al, 2002), peritoneale Mastzellen der Ratte (Jeong et al, 2002) und murine primäre Makrophagen (*bone marrow derived macrophages*, BMMs; Abraham et al, 2006), nachgewiesen. In RBL-2H3 Zellen resultiert sie aus der Glukokortikoidrezeptor (GR)-vermittelten Aktivierung der MKP-1-Promotoraktivität und einem verminderten proteasomalen Abbau des MKP-1-Proteins (Kassel et al, 2001). Über eine Glukokortikoid-abhängige Induktion der Phosphatase MKP-2 in Mastzellen wurde bislang nicht berichtet. Interessanterweise induzierte die Behandlung von neonatalen Cardiomyozyten mit Retinsäure, dem Liganden nukleärer Retinsäurerezeptoren (RAR), ebenfalls die Expression von MKP-1 und MKP-2, aber nicht von MKP-3 (Palm-Leis et al, 2004). GR und RAR gehören beide der Familie Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktoren an (Mangelsdorf et al, 1995). Darüber hinaus kann die Retinsäure ebenfalls entzündungshemmende Wirkungen entfalten (Ney et al, 1987). Es wäre daher sinnvoll, zu untersuchen, ob die positive Regulation der MKP-2-Expression und die Induktion von MKP-1 durch Glukokortikoide und Retinsäure auf einem ähnlichen Mechanismus beruhen.

Der Befund, dass die Expression der Nichtrezeptor-Proteintyrosinphosphatase PEP durch Glukokortikoide in BMMC induziert wird, ist eine weitere neue Entdeckung. Der Anstieg der PEP-mRNA-Menge in Dexamethason-behandelten BMMC resultiert

ebenfalls aus einer Glukokortikoid-abhängigen Erhöhung der Promotoraktivität des PEP-Gens. Die Funktion von PEP in Mastzellen wurde bislang nicht untersucht. In Effektor/Gedächtnis-T-Zellen von PEP-defizienten Mäusen wurde jedoch eine erhöhte T-Zell-Rezeptor-abhängige Aktivität von MAP Kinasen nachgewiesen werden (Hasegawa et al, 2004), woraufhin diese Tyrosinphosphatase als ein weiterer Kandidat für die Hemmung der antigeninduzierten Phosphorylierung von ERK1/2 und p38 MAPK in BMMC in Betracht gezogen wurde.

5.2 Die Induktion von MKP-1 als Grundlage für die Glukokortikoid-abhängige Hemmung der p38 MAP Kinase-Phosphorylierung

In dieser Arbeit ist es mir gelungen, der dual spezifischen Phosphatase MKP-1 eine essentielle Rolle bei der Glukokortikoid-abhängigen Repression der p38 MAP Kinase-Phosphorylierung in IgE/Antigen-stimulierten Mastzellen nachzuweisen.

In MKP-1-defizienten BMMC war Dexamethason nicht mehr in der Lage, die p38 MAP Kinase-Phosphorylierung zu inhibieren, wobei die Hemmung der ERK1/2-Aktivität durch Dexamethason noch stattfand. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung von PEP-defizienten BMMC mit Dexamethason zu einer Repression der antigeninduzierten p38 MAP Kinase- und ERK1/2-Phosphorylierung. Der Einfluss der MKP-2-Induktion bei der negativen Regulation dieser MAP Kinasen wurde ebenfalls untersucht. Da es keinen Zugang zu der existierenden MKP-2 Knockout-Mauslinie gab, um MKP-2-defiziente Mastzellen analysieren zu können, wurde die MKP-2-Expression in BMMC mittels siRNA reduziert. Die Analyse von Kontroll- und MKP-2-siRNA transfizierten BMMC ergab, dass Dexamethason die antigeninduzierte Phosphorylierung von ERK1/2 und der p38 MAP Kinase auch unter MKP-2-herabgesetzten Bedingungen reprimieren konnte.

Diese Befunde zeigen somit, dass die MKP-1-Induktion für die negative Regulation der p38 MAP Kinase-Aktivität in IgE/antigen-behandelten BMMC durch Glukokortikoide unabdingbar ist, wohingegen PEP und MKP-2 für die negative Regulation dieser MAP Kinasen durch Dexamethason entbehrlich sind. Darüber hinaus konnte Dexamethason die ERK1/2-Phosphorylierung in BMMC auch in Abwesenheit von MKP-1 hemmen. Dieser Befund konnte folglich die in

Dexamethason-behandelten RBL-2H3 Zellen beobachtete MKP-1-abhängige Repression der ERK1/2-Phosphorylierung nicht bestätigen (Kassel et al, 2001). Diese Diskrepanz könnte auf Spezies- oder Zelltyp-spezifischen Unterschieden zwischen murinen primären Mastzellen und der Ratten Mastzell-Linie beruhen. Ebenso könnte der Tumorcharakter der RBL-2H3 Zellen die natürliche IgE-Rezeptor- oder Glukokortikoid-abhängige Regulation der Zellen verändert haben.

In Lipopolysaccharid (LPS)-stimulierten Makrophagen von MKP-1 Knockout-Mäusen konnte ebenfalls keine Dexamethason-abhängige Hemmung der p38 MAP Kinase-Aktivität festgestellt werden (Abraham et al, 2006) Dies zeigt, dass es sich bei der MKP-1-Induktion um keinen Mastzell- oder Signalweg-spezifischen, sondern womöglich um einen allgemeinen Mechanismus handelt, durch den Glukokortikoide die p38 MAP Kinase-Phosphorylierung inhibieren.

Überraschend war, dass die Hemmung der p38 MAPK-Phosphorylierung in MKP-1-defizienten BMMC nur bei einer relativ kurzfristigen Dexamethason-Behandlung (4 und 8 Stunden) aufgehoben war. Eine länger anhaltende Kultivierung in Gegenwart von Dexamethason (12 Stunden) führte in MKP-1 Knockout-BMMC ebenfalls zu einer Repression der p38 MAP Kinase-Aktivität. Folglich müssen noch ein oder mehrere späte, MKP-1-unabhängige Glukokortikoid-Effekte existieren, die zur negativen Regulation der p38 MAP Kinase-Phosphorylierung in Mastzellen beitragen.

5.3 Glukokortikoid-abhängige Regulation der Oberflächenexpression des hoch affinen IgE-Rezeptors FcεRI

Eine längerfristige Kultivierung von BMMC (16 Stunden) in Gegenwart von Dexamethason führte zu einer Herabsetzung der Oberflächenexpression des IgE-Rezeptors, während eine kürzere Behandlung (8 Stunden) keine Auswirkung auf die FcεRI-Expression hatte. Diese Beobachtungen stimmen mit Ergebnissen anderer Studien überein und wurden neben BMMC auch bei weiteren Mastzelltypen festgestellt (Benhamou et al, 1986; Yamaguchi et al, 2001). Da die Anzahl an IgE-Rezeptoren in der Zellmembran mit der Stärke der antigen-vermittelten Mastzellantwort korreliert (Yano et al, 1997; Yamaguchi et al, 1999 und 2001), ist vorstellbar, dass eine Glukokortikoid-abhängige Abnahme der FcεRI-

Oberflächenexpression zur Hemmung der IgE/Antigen-vermittelten ERK1/2- und p38 MAP Kinase-Phosphorylierung nach längerfristigen Dexamethason-Behandlungen beiträgt. Ebenso könnte die Tatsache, dass die länger anhaltende Kultivierung von BMDC (12 Stunden) mit Dexamethason allein die IgE/Antigen-induzierte und nicht die SCF- oder TPA-stimulierte Phosphorylierung von p38 MAPK und ERK1/2 hemmen konnte, ein Anzeichen für die Beteiligung des IgE-Rezeptors bei der späten Regulation dieser Kinasen durch Glukokortikoide sein.

Ein Hinweis für die Bedeutung der FcεRI-Oberflächenexpression für IgE-vermittelte allergische Reaktionen *in vivo* stammt von klinischen Studien zur Therapie von Asthma mit Hilfe eines blockierenden anti-IgE Antikörpers. Die intravenöse Gabe dieses Antikörpers reduzierte den IgE-Spiegel im Blut (Corne et al, 1997) und verminderte die allergische Reaktion als Antwort auf die inhalierten Allergene (Fahy et al, 1997; Milgrom et al, 1999). Basophile Granulozyten von Asthma-Patienten, die sich der Behandlung mit dem anti-IgE Antikörper unterzogen hatten, wiesen eine herabgesetzte FcεRI-Oberflächenexpression auf (MacGlashan et al, 1997). Dies zeigt, dass eine reduzierte IgE-Rezeptor-Expression mit einer niedrigeren IgE-vermittelten allergischen Reaktion einhergeht. Darüber hinaus zeigen FcεRI-defiziente Mäusen keine Symptome einer IgE/Antigen-induzierten anaphylaktische Reaktion, obwohl die Entwicklung und Proliferation ihrer Mastzellen normal ist (Dombrowicz et al, 1993; Hiraoka et al, 1999). Dies beweist, dass der Verlust von IgE-Rezeptor-Molekülen *in vivo* durch keinen alternativen Mechanismus ersetzt werden kann, der IgE-vermittelte allergische Prozesse initiieren könnte.

5.4 Dexamethason hemmt die Expression der FcεRIβ-Untereinheit in BMDC auf Proteinebene

Da eine Reduktion der IgE-Rezeptor-Expression durch Dexamethason für die Hemmung der MAP Kinase-Signaltransduktionswege und Mediatorfreisetzung in hormonbehandelten Mastzellen mitverantwortlich sein könnte, wurde der Mechanismus der Glukokortikoid-abhängigen Regulation der FcεRI-Expression analysiert.

Die Behandlung von BMMC mit Dexamethason hatte keinen Einfluss auf die mRNA-Menge der einzelnen Rezeptoruntereinheiten, führte jedoch zu einer Reduktion der Protein-Menge der β -Untereinheit des IgE-Rezeptors reduziert. Die negative Regulation der Fc ϵ RI β -Kette könnte aus mehreren Gründen für die Reduktion der IgE-Rezeptor-Moleküle in der Zellmembran verantwortlich sein. Zum einen fungiert die β -Untereinheit als Chaperon für den Transport des Fc ϵ RI-Komplexes zur Zelloberfläche (Donnadieu et al, 2000). Die Assoziation der α - und der β -Untereinheiten erfolgt bereits im endoplasmatischen Retikulum (ER) direkt nach der Translation, wobei das α -Untereinheit in unreifer Form vorliegt und erst durch zusätzliche Glykosylierungen im ER und Golgi Apparat in eine stabile Konformation überführt wird. Diese Modifikationen (Reifung der α -Untereinheit), sowie die Stabilität des $\alpha\beta\gamma_2$ -Komplexes und dessen Translokation zur Membran sind von der Interaktion der α - mit der β -Kette abhängig (Donnadieu et al, 2000). Demzufolge könnte eine Dexamethason-abhängige Reduktion der β -Proteinmenge die Reifung der α -Kette, deren Stabilität und den Transport des Tetramers zur Zellmembran beeinträchtigen.

Ein alternativer oder zusätzlicher Mechanismus der Regulation der IgE-Rezeptor-Expression durch Dexamethason könnte auch ein verstärkter Abbau von membranständigen Rezeptorkomplexen sein. Die Fc ϵ RI-Moleküle an der Zelloberfläche unterliegen einem fortlaufenden Wechsel aus Abbau und Erneuerung durch neu synthetisierte Rezeptoreinheiten (Kinet, 1999). Die Bindung von IgE-Molekülen erhöht die Anzahl an Fc ϵ RI-Rezeptoren an der Oberfläche (Yamaguchi et al, 1997). Man vermutet, dass dies nicht auf eine gesteigerte Synthese oder den verstärkten Transport von Fc ϵ RI-Komplexen zur Membran zurückzuführen ist, sondern auf einen geringeren Abbau des Rezeptors basiert und in dessen Akkumulation resultiert (Kubo et al, 2001). Es ist denkbar, dass Glukokortikoide genau den gegenteiligen Effekt haben und die Fc ϵ RI-Internalisierung fördern.

Durch Behandlung von BMMC mit verschiedenen Proteasomeninhibitoren konnte ich zeigen, dass die Dexamethason-induzierte Reduktion der Fc ϵ RI β -Untereinheit die Aktivität des Proteasom-abhängigen Proteinabbauweges benötigt. Die β -Kette wird nach IgE-Rezeptor-Quervernetzung ubiquitinyliert und verstärkt abgebaut (Paolini

und Kinet, 1993; Paolini et al, 2002). Da es sich bei der Ubiquitylierung um eine Modifikation handelt, die Proteine für den Abbau durch das 26S Proteasom markiert (Pickart, 2000), wäre es interessant zu überprüfen, ob Dexamethason die Ubiquitylierung dieser Rezeptoruntereinheit induziert.

Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die Kultivierung von Mastzellen in Gegenwart eines Proteasomeninhibitors zu einer länger anhaltenden Aktivierung des IgE-Rezeptors und zu einer Verstärkung der Antigen-abhängigen Freisetzung von Entzündungsmediatoren führt (Paolini et al, 2002). Demzufolge könnte die Proteasomen-abhängige Reduktion der FcεRIβ-Untereinheit in Dexamethason-behandelten BMMC ein Mechanismus sein, durch den Glukokortikoide, die IgE-Rezeptor-Signaltransduktion und somit auch die Aktivierung von ERK1/2 und der p38 MAP Kinase reprimieren.

Die Dexamethason-abhängige Reduktion der β-Kette in BMMC konnte durch Behandlung der Zellen mit einem Proteinsynthesehemmer verhindert werden. Dies zeigt, dass eine Glukokortikoid-induzierte Neusynthese eines oder mehrerer Proteine benötigt wird, um die Menge der FcεRIβ-Untereinheit herabzusetzen. In Ratten-Muskelzellen, in denen Dexamethason den Ubiquitin-Proteasomen-Proteinabbauweg unter katabolen Bedingungen, wie z.B. einer Sepsis, stimuliert (Tiao et al, 1996; Wing und Goldberg, 1993; Isozaki et al, 1996), wurde eine Glukokortikoid-abhängige Induktion der Expression von verschiedenen Proteasomenuntereinheiten sowie Ubiquitin nachgewiesen (Price et al, 1992; Du et al, 2000). Es wäre daher denkbar, dass die Behandlung von BMMC mit Dexamethason die Synthese einer Komponente des Proteasomweges induziert und diese zu einem verstärkten Abbau der FcεRIβ-Untereinheit führt. Dabei könnte es sich auch eine Ubiquitin-Ligase handeln. Ubiquitin-Ligasen der Cbl-Familie sind am Signal-induzierten Abbau zahlreicher Transmembranrezeptoren beteiligt (Thien und Langdon, 2005). Die in hämatopoietischen Zellen exprimierten Mitglieder dieser Familie, c-Cbl und Cbl-b, wurden bereits als negative Regulatoren des FcεRI-Signalweges beschrieben (Paolini et al, 2002; Kyo et al, 2003; Qu et al, 2004), wobei c-Cbl als E3-Ubiquitin-Ligase der FcεRIβ-Untereinheit identifiziert wurde. c-Cbl-defiziente BMMC zeigten eine erhöhte FcεRI-abhängige Phosphorylierung von ERK1/2 (Zhang et al, 2004), während eine Überexpression von Cbl-b in Mastzellen eine Hemmung der ERK1/2-

Phosphorylierung herbeiführte (Qu et al, 2004). Diese beiden Ubiquitin-Ligasen könnten daher als Kandidaten für die Vermittlung der negativen Regulation der FcεRI-Expression durch Dexamethason in Frage kommen.

Die Identifizierung von Faktoren, die an der negativen Regulation der FcεRIβ-Untereinheit durch Glukokortikoide beteiligt sind, ist von großer Wichtigkeit. Mit dieser Kenntnis könnte geklärt werden, welche Bedeutung die Hemmung der IgE-Rezeptor-Expression für die Repression von antigenvermittelten Mastzellfunktionen und somit für die entzündungshemmenden und anti-allergischen Wirkungen der Glukokortikoide hat.

5.5 Die Bedeutung der MKP-1-Induktion für die Glukokortikoid-abhängige Repression von Entzündungsgenen

Im letzten Teil dieser Promotionsarbeit wurde untersucht, welche Rolle MKP-1 für die Fähigkeit von Dexamethason hat, IgE/Antigen-abhängige Effektorfunktionen von Mastzellen zu reprimieren. Dabei wurde zunächst der Einfluss des Glukokortikoids auf die antigeninduzierte Expression des Chemokins Ccl2 (MCP-1), der Zytokine IL-6 und TNF-α, und der Matrixmetalloprotease (MMP) Kollagenase 3 (MMP13) in MKP-1-defizienten BMMC untersucht.

Die Analyse von MKP-1 Knockout- und Wildtyp-BMMC ergab, dass die antigeninduzierte Erhöhung der mRNA-Menge aller untersuchten Gene in Gegenwart von Dexamethason in beiden Genotypen nahezu gleich gehemmt wurde. Lediglich die Repression der MMP13-Induktion durch Dexamethason war in den MKP-1-defizienten BMMC etwas schwächer ausgeprägt. Dieses Ergebnis war unerwartet, da verschiedene Studien von einer Beteiligung der p38 MAP-Kinase-Aktivität an der Regulation der IL-6-, TNF-α- und Ccl2-Expression in Mastzellen berichten (Kim et al, 2005; Song et al, 1999; Teshima et al, 2000; Zhang et al, 1997). Die Kollagenase 3, ein in den pathologischen Prozessen der rheumatoiden Arthritis involviertes proteolytisches Enzym (Deguchi et al, 2005), wurde in Chondrozyten, Fibroblasten und Keratinozyten ebenfalls als ein p38 MAP Kinase-reguliertes Gen identifiziert (Mengshol et al, 2000; Johansson et al, 2000; Ravanti et al, 1999). Der Einfluss des Glukokortikoids auf die Expression dieser Gene in BMMC wurde nach einer 4-stündigen Behandlung der Zellen mit Dexamethason analysiert. Unter diesen

Bedingungen war Dexamethason nicht mehr in der Lage, die p38 MAP Kinase-Phosphorylierung in MKP-1-defizienten BMMC herabzusetzen. Würde es sich bei dieser MKP-1-abhängigen Hemmung der p38 MAP Kinase-Phosphorylierung um den einzigen Wirkungsmechanismus handeln, durch den Glukokortikoide p38 MAP Kinase-regulierte Zielgene reprimieren, müsste die negative Regulation dieser Gene durch Dexamethason in den MKP-1-defizienten BMMC beeinträchtigt sein. Folglich müssen noch weitere Glukokortikoid-Effekte existieren, die eine Repression dieser Gene hervorrufen können.

Die Hemmung der Aktivität von anderen MAP Kinasen durch Dexamethason könnte ein Mechanismus sein, der zur Repression der Entzündungsgene beiträgt. Die Regulation der TNF- α -Transkription in Mastzellen hängt z.B. nicht nur von der p38 MAP Kinase-Phosphorylierung ab, sondern benötigt auch die Aktivität von ERK1/2 und JNK1/2 (Zhang et al, 1997; Okabe et al, 2000; Azzolina et al, 2002). Die JNK1/2-Phosphorylierung ist in Dexamethason-behandelten Mastzellen ebenfalls nach wenigen Stunden reduziert (Kassel und Cato, 2002). Die Repression der TNF- α -mRNA-Induktion in BMMC könnte daher auf einer gehemmten JNK1/2-Aktivität basieren. Ebenso könnte die Herabsetzung der ERK1/2-Phosphorylierung durch Dexamethason zur Reduktion der TNF- α -mRNA-Menge beitragen. Dieser Hormoneffekt war jedoch nach 4 Stunden Glukokortikoid-Behandlung in der Regel nur schwach ausgeprägt und kann somit wahrscheinlich nicht die einzige Ursache für die negative Regulation der TNF- α -Expression durch Dexamethason sein.

Glukokortikoide besitzen die Fähigkeit, die transkriptionelle Aktivität der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B durch Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dem GR zu inhibieren (Herrlich et al, 2001). Die Expression von TNF- α (Zagariya et al, 1998), IL-6 (Liebermann und Baltimore, 1990) und MMP13 (Liacini et al, 2003) wird durch die Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren induziert. Die Hemmung der IgE/Antigen-abhängigen Induktion dieser Gene in BMMC könnte somit auch das Ergebnis der antagonistischen Modulation der Aktivität von AP-1 oder NF- κ B durch den GR sein.

Kürzlich wurde eine Studie veröffentlicht, die den Einfluss von Dexamethason auf die Expression von Zytokin- und Chemokin-Genen in Lipopolysaccharid (LPS)-

stimulierten Makrophagen von MKP-1 Knockout-Mäusen analysierte (Abraham et al, 2006). Die LPS-induzierte Zunahme der mRNA-Menge einiger Gene, darunter auch IL-6 und TNF- α , wurde in MKP-1-defizienten-Macrophagen in Gegenwart des Glukokortikoids ebenfalls gehemmt. Die Induktion einiger anderer Gene, wie z.B. IL-1 α und IL-1 β , konnte hingegen nicht mehr durch Dexamethason reprimiert werden. Dies zeigt, dass in LPS-stimulierten Makrophagen MKP-1 für die Glukokortikoid-abhängige Regulation von bestimmten Entzündungsgenen benötigt wird. Die Gemeinsamkeit, dass die Induktion der IL-6- und TNF- α -mRNA-Menge in Mastzellen und Makrophagen in Abwesenheit von MKP-1 durch Dexamethason reprimiert werden kann, könnte ein Hinweis dafür sein, dass auch in Mastzellen andere Zytokine und Chemokine in einer MKP-1-abhängigen Weise durch Glukokortikoide reguliert werden könnten. Es wäre daher sinnvoll, den Effekt von Dexamethason auf weitere Entzündungsgene in MKP-1-defizienten BMMC zu analysieren. Darüber hinaus induziert eine LPS-Behandlung auch in Mastzellen die Expression von pro-inflammatorischen Genen (Marshall et al, 2003). Um feststellen zu können, ob die MKP-1-abhängige Repression von Entzündungsgenen spezifisch ist für die Glukokortikoid-Wirkung auf LPS-induzierte Prozesse und die Hemmung der antigeninduzierten Zellantwort keiner MKP-1-Induktion bedarf, ist es daher notwendig, den Effekt von Dexamethason auf LPS-regulierte Gene auch in Mastzellen zu untersuchen.

5.6 Die Fähigkeit von Glukokortikoiden, die IgE/Antigen-induzierte anaphylaktische Reaktion zu reprimieren, benötigt keine MKP-1-Induktion

BMMC sezernieren unmittelbar nach der Antigen-vermittelten Kreuzvernetzung von IgE-gebundenen Fc ϵ RI-Molekülen prä-formierte, in Granula gespeicherte Entzündungsmediatoren, wie zB. Histamin (Tanaka et al, 2005). Diese Substanzen vermitteln die typischen Symptome der Allergie vom Soforttyp, wie sie bei einer anaphylaktischen Reaktion in Erscheinung treten. Um feststellen zu können, ob die MKP-1-Induktion an der Hemmung von Mediator-abhängigen Entzündungsprozessen durch Glukokortikoide beteiligt ist, wurde die Fähigkeit von Dexamethason

untersucht, eine antigeninduzierte passive anaphylaktische Reaktion in MKP-1 Knockout-Mäusen zu unterdrücken.

In dieser Studie, erzeugte eine systemische Behandlung der Tiere mit IgE und Antigen in MKP-1-defizienten Mäusen eine deutlich stärkere anaphylaktische Reaktion als in den Wildtyp-Mäusen. Dies ist ein Indiz für die Beteiligung von MKP-1 bei der negativen Regulation der Entzündungsreaktion und ist im Einklang mit den Befunden anderer Studien. Im Maus-Modell für rheumatoide Arthritis, der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA), zeigten MKP-1 Knockout-Mäuse deutlich weiter fortgeschrittene Krankheitssymptome als die Wildtyp-Geschwistertiere (Salojin et al, 2006). Ebenso haben sich MKP-1-defiziente Mäuse als sehr viel empfindlicher gegenüber einer mit dem Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) induzierten Sepsis gezeigt (Hammer et al, 2006; Zhao et al, 2006; Salojin et al, 2006; Chi et al, 2006). MKP-1 ist somit ein essentieller negativer Modulator von Entzündungsreaktionen und der Immunantwort.

Die Analyse der Dexamethason-behandelten Tiere ergab jedoch, dass sich die entzündungshemmende und anti-allergische Wirkung von Dexamethason in MKP-1-defizienten Mäusen trotz des Fehlens von MKP-1 entfalten konnte. Dieser Befund zeigt eindeutig, dass die Induktion von MKP-1 nicht ausreicht, um die Wirkung des Glukokortikoids auf eine antigeninduzierte systemische anaphylaktische Reaktion zu vermitteln. Interessanterweise lies sich eine Zymosan-induzierte Entzündung, an deren Entstehung auch Mastzellen beteiligt sind (Kolaczowska et al, 2001), in MKP-1 Knockout-Mäusen nicht mit Dexamethason inhibieren (Abraham et al, 2006). Folglich scheint MKP-1 bei einigen Glukokortikoid-Wirkungen eine wichtige Rolle zu spielen, während andere entzündungshemmende Eigenschaften der Glukokortikoide auf zusätzlichen Mechanismen basieren müssen. Eine Analyse der MKP-1 Knockout-Mäuse in weiteren Modellen für allergisch entzündliche Erkrankungen könnte Aufschluss darüber geben, inwieweit die Induktion von MKP-1 bei der Vermittlung der inhibitorischen Wirkungen der Glukokortikoide auf das Immunsystem beteiligt ist.

Die Befunde dieser Arbeit lieferten bereits Hinweise dafür, dass nur einige der supprimierenden Effekte von Glukokortikoiden auf die Eigenschaften von Entzündungszellen durch die Phosphatase MKP-1 vermittelt werden (zusammengefasst in Abb.5). Es wurde gezeigt, dass die antigeninduzierte

Phosphorylierung von ERK1/2, sowie die Induktion von einigen pro-inflammatorischen Genen unabhängig von MKP-1 durch Glukokortikoide gehemmt werden. Selbst die negative Regulation der p38 MAPK-Aktivität wird nur für eine bestimmte Zeit nach der Hormongabe allein durch die Induktion von MKP-1 vermittelt. Nach längerfristigen Glukokortikoid-Behandlungen kommt es auch in Abwesenheit von MKP-1 zu einer Herabsetzung der p38 MAP Kinase-Phosphorylierung in Dexamethason-behandelten Mastzellen. Unter diesen Bedingungen reduziert Dexamethason die Menge der β -Untereinheit des hoch affinen IgE-Rezeptors Fc ϵ RI, was mit einer herabgesetzten Oberflächenexpression der gesamten Fc ϵ RI-Proteins korreliert. Zusammen mit den Ergebnissen des Anaphylaxie-Modell zeigen diese Daten, dass noch weitere Prozesse an der negativen Regulation der Mastzellantwort durch Glukokortikoide beteiligt sein müssen.

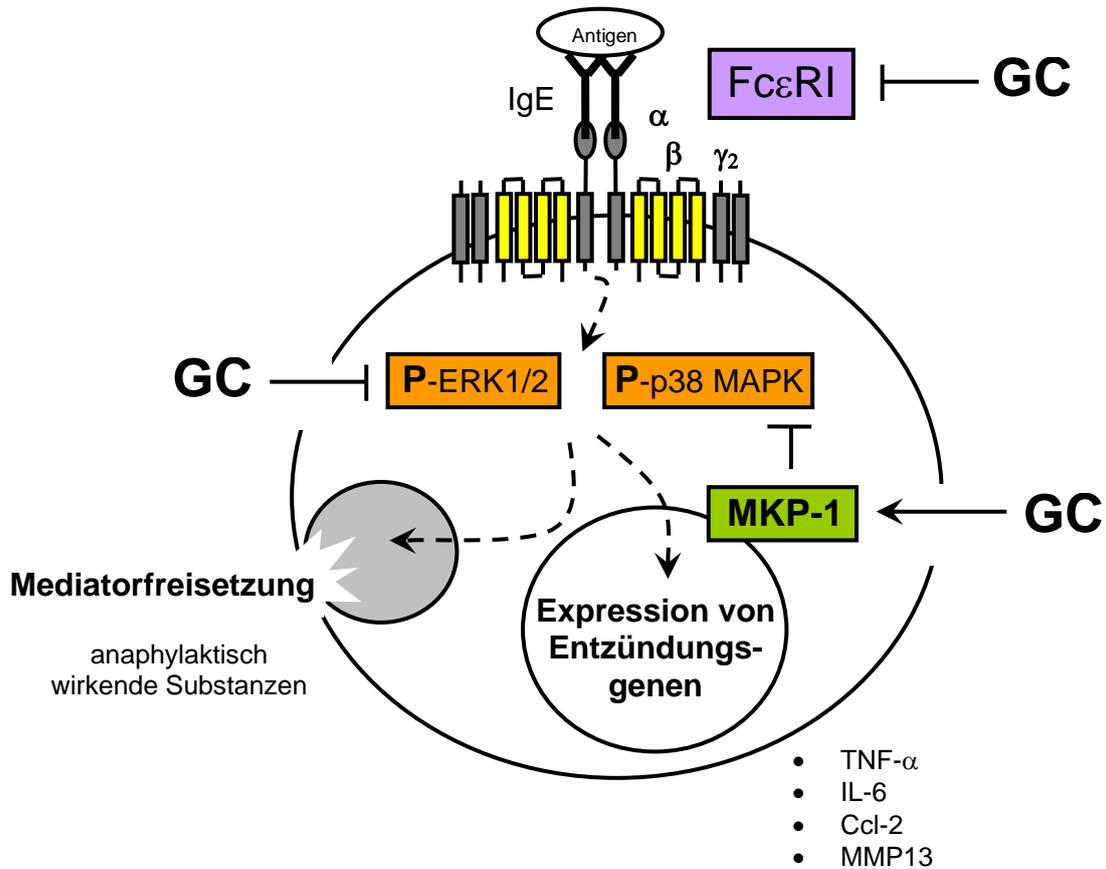


Abb.5 MKP-1-abhängige und -unabhängige Wirkungen von Glukokortikoiden auf IgE/Antigen-vermittelte Prozesse in Mastzellen. Glukokortikoide (GC) hemmen die antigeninduzierte Phosphorylierung der mitogen aktivierten Proteinkinasen ERK1/2 und p38 MAPK. Die negative Regulation der p38 MAPK-Aktivität wird durch die GC-induzierte Expression der Phosphatase MKP-1 vermittelt, wobei jedoch nach einer längeranhaltenden GC-Behandlung noch andere Effekte für die Hemmung der p38 MAPK-Phosphorylierung durch GC verantwortlich sind. Ein später Effekt von GC, der zur Hemmung von IgE-abhängigen Prozessen beitragen könnte, ist die negative Regulation der Expression des hoch affinen IgE-Rezeptors FcεRI. Darüber hinaus werden die FcεRI-abhängige Phosphorylierung von ERK1/2, die Induktion der mRNA der pro-inflammatorischen Gene TNF- α , IL-6, Ccl-2 und MMP13, sowie die antigeninduzierte anaphylaktische Reaktion durch einen MKP-1-unabhängigen Wirkungsmechanismus durch GC gehemmt.

6. Referenzen

Abraham SM, Lawrence T, Kleiman A, Warden P, Medghalchi M, Tuckermann J, Saklatvala J, Clark AR. Antiinflammatory effects of dexamethasone are partly dependent on induction of dual specificity phosphatase 1. *J Exp Med.* 2006 Aug 7;203(8):1883-9. Epub 2006 Jul 31.

Alessi DR, Smythe C, Keyse SM. The human CL100 gene encodes a Tyr/Thr-protein phosphatase which potently and specifically inactivates MAP kinase and suppresses its activation by oncogenic ras in *Xenopus* oocyte extracts. *Oncogene.* 1993 Jul;8(7):2015-20.

Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999 Oct;31(10):1037-51

Auernhammer CJ, Melmed S. Interleukin-11 stimulates proopiomelanocortin gene expression and adrenocorticotropin secretion in corticotroph cells: evidence for a redundant cytokine network in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology.* 1999 Apr;140(4):1559-66.

Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science.* 1995 Oct 13;270(5234):286-90.

Azzolina A, Guarneri P, Lampiasi N. Involvement of p38 and JNK MAPKs pathways in Substance P-induced production of TNF-alpha by peritoneal mast cells. *Cytokine.* 2002 Apr 21;18(2):72-80.

Baxter JD, Rousseau GG. Glucocorticoid hormone action: an overview. *Monogr Endocrinol.* 1979;12:1-24.

Beato M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell.* 1989 Feb 10;56(3):335-44.

Belvisi MG. Regulation of inflammatory cell function by corticosteroids. *Proc Am Thorac Soc.* 2004;1(3):207-14.

Benhamou M, Ninio E, Salem P, Hieblot C, Bessou G, Pitton C, Liu FT, Mencia-Huerta JM. Decrease in IgE Fc receptor expression on mouse bone marrow-derived mast cells and inhibition of paf-acether formation and of beta-hexosaminidase release by dexamethasone. *J Immunol.* 1986 Feb 15;136(4):1385-92.

Berenstein EH, Garcia-Gil M, Siraganian RP. Dexamethasone inhibits receptor-activated phosphoinositide breakdown in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *J Immunol.* 1987 Mar 15;138(6):1914-8.

Besmer P, Manova K, Duttlinger R, Huang EJ, Packer A, Gyssler C, Bachvarova RF. The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Dev Suppl.* 1993;:125-37.

Biedermann T, Kneilling M, Mailhammer R, Maier K, Sander CA, Kollias G, Kunkel SL, Hultner L, Rocken M. Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *J Exp Med.* 2000 Nov 20;192(10):1441-52.

Biering H, Knappe G, Gerl H, Lochs H. Prevalence of diabetes in acromegaly and Cushing syndrome. *Acta Med Austriaca*. 2000;27(1):27-31. German.

Bingham CO 3rd, Austen KF. Mast-cell responses in the development of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Feb;105(2 Pt 2):S527-34.

Blank U, Ra C, Miller L, White K, Metzger H, Kinet JP. Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. *Nature*. 1989 Jan 12;337(6203):187-9.

Bradding P, Holgate ST. Immunopathology and human mast cell cytokines. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1999 Jul;31(2):119-33.

Breuner CW, Orchinik M. Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J Endocrinol*. 2002 Oct;175(1):99-112.

Broide DH, Metcalfe DD, Wasserman SI. Functional and biochemical characterization of rat bone marrow derived mast cells. *J Immunol*. 1988 Dec 15;141(12):4298-305.

Bruna A, Nicolas M, Munoz A, Kyriakis JM, Caelles C. Glucocorticoid receptor-JNK interaction mediates inhibition of the JNK pathway by glucocorticoids. *EMBO J*. 2003 Nov 17;22(22):6035-44.

Caelles C, Gonzalez-Sancho JM, Munoz A. Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes Dev*. 1997 Dec 15;11(24):3351-64.

Cato & Wade, 1996. A.C. Cato and E. Wade, Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Bioessays* **18** (1996), pp. 371–378.

Cato AC, Ponta H, Herrlich P. Regulation of gene expression by steroid hormones. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1992;43:1-36.

Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001 Mar 1;410(6824):37-40.

Chi H, Barry SP, Roth RJ, Wu JJ, Jones EA, Bennett AM, Flavell RA. Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 14;103(7):2274-9. Epub 2006 Feb 6.

Chiappara G, Gagliardo R, Siena A, Bonsignore MR, Bousquet J, Bonsignore G, Vignola AM. Airway remodelling in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2001 Feb;1(1):85-93.

Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med*. 1995 May 18;332(20):1351-62.

Chu Y, Solski PA, Khosravi-Far R, Der CJ, Kelly K. The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation. *J Biol Chem*. 1996 Mar 15;271(11):6497-501.

Clark AR, Lasa M. Crosstalk between glucocorticoids and mitogen-activated protein kinase signalling pathways. *Curr Opin Pharmacol*. 2003 Aug;3(4):404-11.

Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Schmid W, Aguzzi A, Schutz G. Molecular genetic analysis of glucocorticoid signaling during mouse development. *Steroids*. 1995 Jan;60(1):93-6.

Corne J, Djukanovic R, Thomas L, Warner J, Botta L, Grandordy B, Gygax D, Heusser C, Patalano F, Richardson W, Kilchherr E, Staehelin T, Davis F, Gordon W, Sun L, Liou R, Wang G, Chang TW, Holgate S. The effect of intravenous administration of a chimeric anti-IgE antibody on serum IgE levels in atopic subjects: efficacy, safety, and pharmacokinetics. *J Clin Invest*. 1997 Mar 1;99(5):879-87.

Daeron M, Sterk AR, Hirata F, Ishizaka T. Biochemical analysis of glucocorticoid-induced inhibition of IgE-mediated histamine release from mouse mast cells. *J Immunol*. 1982 Sep;129(3):1212-8.

Danesch U, Gloss B, Schmid W, Schutz G, Schule R, Renkawitz R. Glucocorticoid induction of the rat tryptophan oxygenase gene is mediated by two widely separated glucocorticoid-responsive elements. *EMBO J*. 1987 Mar;6(3):625-30.

Dastyh J, Metcalfe DD. Stem cell factor induces mast cell adhesion to fibronectin. *J Immunol*. 1994 Jan 1;152(1):213-9.

De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev*. 2003 Aug;24(4):488-522.

DeFranco DB, Csermely P. Steroid receptor and molecular chaperone encounters in the nucleus. *Sci STKE*. 2000 Jul 25;2000(42):PE1.

Deguchi JO, Aikawa E, Libby P, Vachon JR, Inada M, Krane SM, Whittaker P, Aikawa M. Matrix metalloproteinase-13/collagenase-3 deletion promotes collagen accumulation and organization in mouse atherosclerotic plaques. *Circulation*. 2005 Oct 25;112(17):2708-15. Epub 2005 Oct 17.

Denburg JA. Microenvironmental influences on inflammatory cell differentiation. *Allergy*. 1995;50(25 Suppl):25-8.

de Quervain DJ, Roozendaal B, McGaugh JL. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature*. 1998 Aug 20;394(6695):787-90.

Distelhorst CW. Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell Death Differ*. 2002 Jan;9(1):6-19.

Dittmar KD, Pratt WB. Folding of the glucocorticoid receptor by the reconstituted Hsp90-based chaperone machinery. The initial hsp90.p60.hsp70-dependent step is sufficient for creating the steroid binding conformation. *J Biol Chem*. 1997 May 16;272(20):13047-54.

Dombrowicz D, Flamand V, Brigman KK, Koller BH, Kinet JP. Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor alpha chain gene. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):969-76.

Dombrowicz D, Brini AT, Flamand V, Hicks E, Snouwaert JN, Kinet JP, Koller BH. Anaphylaxis mediated through a humanized high affinity IgE receptor. *J Immunol*. 1996 Aug 15;157(4):1645-51.

Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:55-72. Epub 2001 Oct 4.

Donnadieu E, Jouvin MH, Kinet JP. A second amplifier function for the allergy-associated Fc(epsilon)RI-beta subunit. *Immunity.* 2000 May;12(5):515-23.

Dorfman K, Carrasco D, Gruda M, Ryan C, Lira SA, Bravo R. Disruption of the erp/mkp-1 gene does not affect mouse development: normal MAP kinase activity in ERP/MKP-1-deficient fibroblasts. *Oncogene.* 1996 Sep 5;13(5):925-31.

Du J, Mitch WE, Wang X, Price SR. Glucocorticoids induce proteasome C3 subunit expression in L6 muscle cells by opposing the suppression of its transcription by NF-kappa B. *J Biol Chem.* 2000 Jun 30;275(26):19661-6.

Eklund KK, Humphries DE, Xia Z, Ghildyal N, Friend DS, Gross V, Stevens RL. Glucocorticoids inhibit the cytokine-induced proliferation of mast cells, the high affinity IgE receptor-mediated expression of TNF-alpha, and the IL-10-induced expression of chymases. *J Immunol.* 1997 May 1;158(9):4373-80.

Fahy JV, Fleming HE, Wong HH, Liu JT, Su JQ, Reimann J, Fick RB Jr, Boushey HA. The effect of an anti-IgE monoclonal antibody on the early- and late-phase responses to allergen inhalation in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Jun;155(6):1828-34.

Flanagan-Cato LM, Fluharty SJ. Emerging mechanisms of the behavioral effects of steroids. *Curr Opin Neurobiol.* 1997 Dec;7(6):844-8.

Fuertes G, Martin De Llano JJ, Villarroya A, Rivett AJ, Knecht E. Changes in the proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts produced by serum withdrawal, amino-acid deprivation and confluent conditions. *Biochem J.* 2003 Oct 1;375(Pt 1):75-86.

Galli SJ, Wershil BK, Costa JJ, Tsai M. For better or for worse: does stem cell factor importantly regulate mast cell function in pulmonary physiology and pathology? *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994 Dec;11(6):644-5.

Galli SJ, Maurer M, Lantz CS. Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 1999 Feb;11(1):53-9.

Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2005 Feb;6(2):135-42.

Gewert K, Hiller G, Sundler R. Effects of dexamethasone on mitogen-activated protein kinases in mouse macrophages: implications for the regulation of 85 kDa cytosolic phospholipase A(2). *Biochem Pharmacol.* 2000 Aug 15;60(4):545-51.

Gibbs BF, Plath KE, Wolff HH, Grabbe J. Regulation of mediator secretion in human basophils by p38 mitogen-activated protein kinase: phosphorylation is sensitive to the effects of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors and calcium mobilization. *J Leukoc Biol.* 2002 Aug;72(2):391-400.

Gordon JR, Galli SJ. Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)/cachectin by mouse mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. A mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF-alpha during IgE-dependent biological responses. *J Exp Med*. 1991 Jul 1;174(1):103-7.

Gomez G, Ramirez CD, Rivera J, Patel M, Norozian F, Wright HV, Kashyap MV, Barnstein BO, Fischer-Stenger K, Schwartz LB, Kepley CL, Ryan JJ. TGF-beta 1 inhibits mast cell Fc epsilon RI expression. *J Immunol*. 2005 May 15;174(10):5987-93.

Groom LA, Sneddon AA, Alessi DR, Dowd S, Keyse SM. Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase. *EMBO J*. 1996 Jul 15;15(14):3621-32.

Gonzalez MV, Jimenez B, Berciano MT, Gonzalez-Sancho JM, Caelles C, Lafarga M, Munoz A. Glucocorticoids antagonize AP-1 by inhibiting the Activation/phosphorylation of JNK without affecting its subcellular distribution. *J Cell Biol*. 2000 Sep 4;150(5):1199-208.

Grose R, Werner S, Kessler D, Tuckermann J, Huggel K, Durka S, Reichardt HM, Werner S. A role for endogenous glucocorticoids in wound repair. *EMBO Rep*. 2002 Jun;3(6):575-82. Epub 2002 May 24.

Guizani L, Perrin-Wolff M, Breard J, Binetruy B, Bertoglio J. Mechanisms in interleukin-2 protection against glucocorticoid-induced apoptosis: regulation of AP-1 and glucocorticoid receptor transcriptional activities. *J Interferon Cytokine Res*. 1996 Aug;16(8):601-9.

Gurish MF, Ghildyal N, McNeil HP, Austen KF, Gillis S, Stevens RL. Differential expression of secretory granule proteases in mouse mast cells exposed to interleukin 3 and c-kit ligand. *J Exp Med*. 1992 Apr 1;175(4):1003-12.

Haig DM, Huntley JF, MacKellar A, Newlands GF, Inglis L, Sangha R, Cohen D, Hapel A, Galli SJ, Miller HR. Effects of stem cell factor (kit-ligand) and interleukin-3 on the growth and serine proteinase expression of rat bone-marrow-derived or serosal mast cells. *Blood*. 1994 Jan 1;83(1):72-83.

Hammer M, Mages J, Dietrich H, Servatius A, Howells N, Cato AC, Lang R. Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) regulates a subset of LPS-induced genes and protects mice from lethal endotoxin shock. *J Exp Med*. 2006 Jan 23;203(1):15-20. Epub 2005 Dec 27.

Hart PH. Regulation of the inflammatory response in asthma by mast cell products. *Immunol Cell Biol*. 2001 Apr;79(2):149-53.

Hasegawa K, Martin F, Huang G, Tumas D, Diehl L, Chan AC. PEST domain-enriched tyrosine phosphatase (PEP) regulation of effector/memory T cells. *Science*. 2004 Jan 30;303(5658):685-9.

Heck S, Bender K, Kullmann M, Gottlicher M, Herrlich P, Cato AC. I kappaB alpha-independent downregulation of NF-kappaB activity by glucocorticoid receptor. *EMBO J*. 1997 Aug 1;16(15):4698-707.

Heinrich MC, Dooley DC, Freed AC, Band L, Hoatlin ME, Keeble WW, Peters ST, Silvey KV, Ey FS, Kabat D, et al. Constitutive expression of steel factor gene by human stromal cells. *Blood*. 1993 Aug 1;82(3):771-83.

Hench PS, Kendall E, Slocumb CH *et al.* The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone: Compound E) and the pituitary adrenocorticotropic hormone on rheumatoid arthritis. Preliminary report. Proc Staff Meet Mayo Clin 1949;24:181-97.

Herrlich P. Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1. Oncogene. 2001 Apr 30;20(19):2465-75.

Hilt W, Wolf DH. The ubiquitin-proteasome system: past, present and future. Cell Mol Life Sci. 2004 Jul;61(13):1545.

Hiraoka S, Furumoto Y, Koseki H, Takagaki Y, Taniguchi M, Okumura K, Ra C. Fc receptor beta subunit is required for full activation of mast cells through Fc receptor engagement. Int Immunol. 1999 Feb;11(2):199-207.

Hiragun T, Peng Z, Beaven MA. Dexamethasone up-regulates the inhibitory adaptor protein Dok-1 and suppresses downstream activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in antigen-stimulated RBL-2H3 mast cells. Mol Pharmacol. 2005 Mar;67(3):598-603.

Hiragun T, Peng Z, Beaven MA. Cutting edge: Dexamethasone negatively regulates Syk in mast cells by up-regulating SRC-like adaptor protein. J Immunol. 2006 Aug 15;177(4):2047-50.

Hirasawa N, Santini F, Beaven MA. Activation of the mitogen-activated protein kinase/cytosolic phospholipase A2 pathway in a rat mast cell line. Indications of different pathways for release of arachidonic acid and secretory granules. J Immunol. 1995 May 15;154(10):5391-402.

Hirasawa N, Sato Y, Fujita Y, Ohuchi K. Involvement of a phosphatidylinositol 3-kinase-p38 mitogen activated protein kinase pathway in antigen-induced IL-4 production in mast cells. Biochim Biophys Acta. 2000 Jan 3;1456(1):45-55.

Hirasawa N, Sato Y, Fujita Y, Mue S, Ohuchi K. Inhibition by dexamethasone of antigen-induced c-Jun N-terminal kinase activation in rat basophilic leukemia cells. J Immunol. 1998 Nov 1;161(9):4939-43.

Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. Nature. 1985 Dec 19-1986 Jan 1;318(6047):635-41.

Hundley TR, Prasad AR, Beaven MA. Elevated levels of cyclooxygenase-2 in antigen-stimulated mast cells is associated with minimal activation of p38 mitogen-activated protein kinase. J Immunol. 2001 Aug 1;167(3):1629-36.

Imai E, Miner JN, Mitchell JA, Yamamoto KR, Granner DK. Glucocorticoid receptor-cAMP response element-binding protein interaction and the response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids. J Biol Chem. 1993 Mar 15;268(8):5353-6.

Ishizaka T, Ishizaka K. Activation of mast cells for mediator release through IgE receptors. Prog Allergy. 1984;34:188-235.

Ishizaka T, Conrad DH, Schulman ES, Sterk AR, Ko CG, Ishizaka K. IgE-mediated triggering signals for mediator release from human mast cells and basophils. *Fed Proc.* 1984 Oct;43(13):2840-5.

Ishizaka T, Oshiba A, Sakata N, Terada N, Johnson GL, Gelfand EW. Aggregation of the FcepsilonRI on mast cells stimulates c-Jun amino-terminal kinase activity. A response inhibited by wortmannin. *J Biol Chem.* 1996 May 31;271(22):12762-6.

Ishizaka T, Terada N, Gerwins P, Hamelmann E, Oshiba A, Fanger GR, Johnson GL, Gelfand EW. Mast cell tumor necrosis factor alpha production is regulated by MEK kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jun 10;94(12):6358-63.

Ishizaka T, Chayama K, Takeda K, Hamelmann E, Terada N, Keller GM, Johnson GL, Gelfand EW. Mitogen-activated protein kinase activation through Fc epsilon receptor I and stem cell factor receptor is differentially regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and calcineurin in mouse bone marrow-derived mast cells. *J Immunol.* 1999 Feb 15;162(4):2087-94.

Isozaki U, Mitch WE, England BK, Price SR. Protein degradation and increased mRNAs encoding proteins of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in BC3H1 myocytes require an interaction between glucocorticoids and acidification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Mar 5;93(5):1967-71.

Jantzen HM, Strahle U, Gloss B, Stewart F, Schmid W, Boshart M, Miksicek R, Schutz G. Cooperativity of glucocorticoid response elements located far upstream of the tyrosine aminotransferase gene. *Cell.* 1987 Apr 10;49(1):29-38.

Jeffrey KL, Brummer T, Rolph MS, Liu SM, Callejas NA, Grumont RJ, Gillieron C, Mackay F, Grey S, Camps M, Rommel C, Gerondakis SD, Mackay CR. Positive regulation of immune cell function and inflammatory responses by phosphatase PAC-1. *Nat Immunol.* 2006 Mar;7(3):274-83. Epub 2006 Feb 12.

Jeong HJ, Na HJ, Hong SH, Kim HM. Inhibition of the stem cell factor-induced migration of mast cells by dexamethasone. *Endocrinology.* 2003 Sep;144(9):4080-6.

Johansson N, Ala-aho R, Uitto V, Grenman R, Fusenig NE, Lopez-Otin C, Kahari VM. Expression of collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) by transformed keratinocytes is dependent on the activity of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Cell Sci.* 2000 Jan;113 Pt 2:227-35.

Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato AC, Gebel S, Ponta H, Herrlich P. Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell.* 1990 Sep 21;62(6):1189-204.

Karin M, Herschman HR. Dexamethasone stimulation of metallothionein synthesis in HeLa cell cultures. *Science.* 1979 Apr 13;204(4389):176-7.

Kassel O, Cato AC. Mast cells as targets for glucocorticoids in the treatment of allergic disorders. *Ernst Schering Res Found Workshop.* 2002;(40):153-76.

Kassel O, Sancono A, Kratzschmar J, Kreft B, Stassen M, Cato AC. Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *EMBO J.* 2001 Dec 17;20(24):7108-16.

Kemp SF, Lockey RF. Anaphylaxis: a review of causes and mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* 2002 Sep;110(3):341-8.

Kim SH, Jun CD, Suk K, Choi BJ, Lim H, Park S, Lee SH, Shin HY, Kim DK, Shin TY. Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicol Sci.* 2006 May;91(1):123-31. Epub 2005 Dec 1.

Kimata M, Inagaki N, Kato T, Miura T, Serizawa I, Nagai H. Roles of mitogen-activated protein kinase pathways for mediator release from human cultured mast cells. *Biochem Pharmacol.* 2000 Aug 15;60(4):589-94.

Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:931-72.

Kirshenbaum AS, Goff JP, Kessler SW, Mican JM, Zsebo KM, Metcalfe DD. Effect of IL-3 and stem cell factor on the appearance of human basophils and mast cells from CD34+ pluripotent progenitor cells. *J Immunol.* 1992 Feb 1;148(3):772-7.

Kitamura Y, Kasugai T, Arizono N, Matsuda H. Development of mast cells and basophils: processes and regulation mechanisms. *Am J Med Sci.* 1993 Sep;306(3):185-91.

Kolaczowska E, Seljelid R, Plytycz B. Role of mast cells in zymosan-induced peritoneal inflammation in Balb/c and mast cell-deficient WBB6F1 mice. *J Leukoc Biol.* 2001 Jan;69(1):33-42.

Kruger PG. Mast cells and multiple sclerosis: a quantitative analysis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2001 Aug;27(4):275-80.

Kubo S, Matsuoka K, Taya C, Kitamura F, Takai T, Yonekawa H, Karasuyama H. Drastic up-regulation of Fc epsilon RI on mast cells is induced by IgE binding through stabilization and accumulation of Fc epsilon RI on the cell surface. *J Immunol.* 2001 Sep 15;167(6):3427-34.

Kyo S, Sada K, Qu X, Maeno K, Miah SM, Kawauchi-Kamata K, Yamamura H. Negative regulation of Lyn protein-tyrosine kinase by c-Cbl ubiquitin-protein ligase in Fc epsilon RI-mediated mast cell activation. *Genes Cells.* 2003 Oct;8(10):825-36.

Lantz CS, Huff TF. Differential responsiveness of purified mouse c-kit+ mast cells and their progenitors to IL-3 and stem cell factor. *J Immunol.* 1995 Oct 15;155(8):4024-9.

Lanza L, Scudeletti M, Puppo F, Bosco O, Peirano L, Filaci G, Fecarotta E, Vidali G, Indiveri F. Prednisone increases apoptosis in in vitro activated human peripheral blood T lymphocytes. *Clin Exp Immunol.* 1996 Mar;103(3):482-90.

Lasa M, Brook M, Saklatvala J, Clark AR. Dexamethasone destabilizes cyclooxygenase 2 mRNA by inhibiting mitogen-activated protein kinase p38. *Mol Cell Biol.* 2001 Feb;21(3):771-80.

Lasa M, Abraham SM, Boucheron C, Saklatvala J, Clark AR. Dexamethasone causes sustained expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 and phosphatase-mediated inhibition of MAPK p38. *Mol Cell Biol.* 2002 Nov;22(22):7802-11.

Lee DH, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* 1998 Oct;8(10):397-403.

Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Huang W, Dehnade F, Ahmad M, Zafarullah M. Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes. *Exp Cell Res.* 2003 Aug 1;288(1):208-17.

Libermann TA, Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol.* 1990 May;10(5):2327-34.

Lukert BP, Raisz LG. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis and management. *Ann Intern Med.* 1990 Mar 1;112(5):352-64.

MacGlashan DW Jr, Bochner BS, Adelman DC, Jardieu PM, Togias A, McKenzie-White J, Sterbinsky SA, Hamilton RG, Lichtenstein LM. Down-regulation of Fc(epsilon)RI expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody. *J Immunol.* 1997 Feb 1;158(3):1438-45.

Maezawa Y, Nakajima H, Kumano K, Kubo S, Karasuyama H, Iwamoto I. Role of IgE in Th2 cell-mediated allergic airway inflammation. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003 Jun;131 Suppl 1:2-6.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 1995 Dec 15;83(6):835-9.

Marshall JS, McCurdy JD, Olynych T. Toll-like receptor-mediated activation of mast cells: implications for allergic disease? *Int Arch Allergy Immunol.* 2003 Oct;132(2):87-97.

Maruotti N, Crivellato E, Cantatore FP, Vacca A, Ribatti D. Mast cells in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2006 May 31.

Masuda A, Yoshikai Y, Aiba K, Matsuguchi T. Th2 cytokine production from mast cells is directly induced by lipopolysaccharide and distinctly regulated by c-Jun N-terminal kinase and p38 pathways. *J Immunol.* 2002 Oct 1;169(7):3801-10.

Matsuoka K, Taya C, Kubo S, Toyama-Sorimachi N, Kitamura F, Ra C, Yonekawa H, Karasuyama H. Establishment of antigen-specific IgE transgenic mice to study pathological and immunobiological roles of IgE in vivo. *Int Immunol.* 1999 Jun;11(6):987-94.

Meng L, Mohan R, Kwok BH, Elofsson M, Sin N, Crews CM. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Aug 31;96(18):10403-8.

Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum.* 2000 Apr;43(4):801-11.

Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev.* 1997 Oct;77(4):1033-79.

Milgrom H, Fick RB Jr, Su JQ, Reimann JD, Bush RK, Watrous ML, Metzger WJ. Treatment of allergic asthma with monoclonal anti-IgE antibody. rhuMab-E25 Study Group. *N Engl J Med.* 1999 Dec 23;341(26):1966-73.

Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev.* 1984 Winter;5(1):25-44.

Nenan S, Boichot E, Lagente V, Bertrand CP. Macrophage elastase (MMP-12): a pro-inflammatory mediator? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005 Mar;100 Suppl 1:167-72. Epub 2005 Jun 14.

Ney UM, Ball IJ, Hill RP, Westmacott D, Bloxham DP., Anti-inflammatory effects of synthetic retinoids may be related to their immunomodulatory action. *Dermatologica.* 1987;175 Suppl 1:93-9.

Okabe T, Hide M, Koro O, Yamamoto S. Substance P induces tumor necrosis factor-alpha release from human skin via mitogen-activated protein kinase. *Eur J Pharmacol.* 2000 Jun 16;398(2):309-15.

Oliveira SH, Lukacs NW. Stem cell factor and IgE-stimulated murine mast cells produce chemokines (CCL2, CCL17, CCL22) and express chemokine receptors. *Inflamm Res.* 2001 Mar;50(3):168-74.

Palm-Leis A, Singh US, Herbelin BS, Olsovsky GD, Baker KM, Pan J. Mitogen-activated protein kinases and mitogen-activated protein kinase phosphatases mediate the inhibitory effects of all-trans retinoic acid on the hypertrophic growth of cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2004 Dec 24;279(52):54905-17. Epub 2004 Oct 18.

Paolini R, Kinet JP. Cell surface control of the multiubiquitination and deubiquitination of high-affinity immunoglobulin E receptors. *EMBO J.* 1993 Feb;12(2):779-86.

Paolini R, Molfetta R, Beitz LO, Zhang J, Scharenberg AM, Piccoli M, Frati L, Siraganian R, Santoni A. Activation of Syk tyrosine kinase is required for c-Cbl-mediated ubiquitination of Fc epsilon RI and Syk in RBL cells. *J Biol Chem.* 2002 Oct 4;277(40):36940-7. Epub 2002 Jul 26.

Pickart CM. Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci.* 2000 Nov;25(11):544-8.

Pillay CS, Elliott E, Dennison C. Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem J.* 2002 May 1;363(Pt 3):417-29.

Plaut M, Pierce JH, Watson CJ, Hanley-Hyde J, Nordan RP, Paul WE. Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. *Nature.* 1989 May 4;339(6219):64-7.

Price SR, Bailey JL, Wang X, Jurkovitz C, England BK, Ding X, Phillips LS, Mitch WE. Muscle wasting in insulinopenic rats results from activation of the ATP-dependent, ubiquitin-proteasome proteolytic pathway by a mechanism including gene transcription. *J Clin Invest.* 1996 Oct 15;98(8):1703-8.

Pype JL, Dupont LJ, Menten P, Van Coillie E, Opdenakker G, Van Damme J, Chung KF, Demedts MG, Verleden GM. Expression of monocyte chemotactic protein (MCP)-1, MCP-2, and MCP-3 by human airway smooth-muscle cells. Modulation by corticosteroids and T-helper 2 cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 Oct;21(4):528-36.

Qu X, Sada K, Kyo S, Maeno K, Miah SM, Yamamura H. Negative regulation of FcεRI-mediated mast cell activation by a ubiquitin-protein ligase Cbl-b. *Blood*. 2004 Mar 1;103(5):1779-86. Epub 2003 Nov 6.

Ra C, Jouvin MH, Blank U, Kinet JP. A macrophage Fc gamma receptor and the mast cell receptor for IgE share an identical subunit. *Nature*. 1989 Oct 26;341(6244):752-4.

Ravanti L, Heino J, Lopez-Otin C, Kahari VM. Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 1999 Jan 22;274(4):2446-55.

Ravetch JV, Kinet JP. Fc receptors. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:457-92.

Razin E, Cordon-Cardo A, Minick CR, Good RA. Studies on the exocytosis of cultured mast cells derived from mouse bone marrow. *Exp Hematol*. 1982 Jul;10(6):524-32.

Razin E, Mencia-Huerta JM, Stevens RL, Lewis RA, Liu FT, Corey E, Austen KF. IgE-mediated release of leukotriene C4, chondroitin sulfate E proteoglycan, beta-hexosaminidase, and histamine from cultured bone marrow-derived mouse mast cells. *J Exp Med*. 1983 Jan 1;157(1):189-201.

Richards RI, Heguy A, Karin M. Structural and functional analysis of the human metallothionein-1A gene: differential induction by metal ions and glucocorticoids. *Cell*. 1984 May;37(1):263-72.

Rider LG, Hirasawa N, Santini F, Beaven MA. Activation of the mitogen-activated protein kinase cascade is suppressed by low concentrations of dexamethasone in mast cells. *J Immunol*. 1996 Sep 15;157(6):2374-80.

Rottem M, Goff JP, Albert JP, Metcalfe DD. The effects of stem cell factor on the ultrastructure of Fc epsilon RI+ cells developing in IL-3-dependent murine bone marrow-derived cell cultures. *J Immunol*. 1993 Nov 1;151(9):4950-63.

Reichardt HM, Schutz G. Glucocorticoid signalling--multiple variations of a common theme. *Mol Cell Endocrinol*. 1998 Nov 25;146(1-2):1-6.

Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, Gass P, Schmid W, Herrlich P, Angel P, Schutz G. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell*. 1998 May 15;93(4):531-41.

Reichardt HM, Tuckermann JP, Gottlicher M, Vujic M, Weih F, Angel P, Herrlich P, Schutz G. Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *EMBO J*. 2001 Dec 17;20(24):7168-73.

Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*. 1994 Sep 9;78(5):761-71.

Salojin KV, Owusu IB, Millerchip KA, Potter M, Platt KA, Oravec T. Essential role of MAPK phosphatase-1 in the negative control of innate immune responses. *J Immunol*. 2006 Feb 1;176(3):1899-9.

Seglen PO. Inhibitors of lysosomal function. *Methods Enzymol*. 1983;96:737-64.

Schacke (a) H, Hennekes H, Schottelius A, Jaroch S, Lehmann M, Schmees N, Rehwinkel H, Asadullah K. SEGRAs: a novel class of anti-inflammatory compounds. *Ernst Schering Res Found Workshop*. 2002;(40):357-7.

Schacke (b) H, Docke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther*. 2002 Oct;96(1):23-43.

Schneider H, Cohen-Dayag A, Pecht I. Tyrosine phosphorylation of phospholipase C gamma 1 couples the Fc epsilon receptor mediated signal to mast cells secretion. *Int Immunol*. 1992 Apr;4(4):447-53.

Schneikert J, Hubner S, Martin E, Cato AC. A nuclear action of the eukaryotic cochaperone RAP46 in downregulation of glucocorticoid receptor activity. *J Cell Biol*. 1999 Sep 6;146(5):929-40.

Sewell WA, Scurr LL, Orphanides H, Kinder S, Ludowyke RI. Induction of interleukin-4 and interleukin-5 expression in mast cells is inhibited by glucocorticoids. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1998 Jan;5(1):18-23.

Stassen M, Klein M, Becker M, Bopp T, Neudorfl C, Richter C, Heib V, Klein-Hessling S, Serfling E, Schild H, Schmitt E. p38 MAP kinase drives the expression of mast cell-derived IL-9 via activation of the transcription factor GATA-1. *Mol Immunol*. 2006 Apr 29

Stevens RL, Austen KF. Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. *Immunol Today*. 1989 Nov;10(11):381-6.

Sundstrom M, Alfredsson J, Olsson N, Nilsson G. Stem cell factor-induced migration of mast cells requires p38 mitogen-activated protein kinase activity. *Exp Cell Res*. 2001 Jul 1;267(1):144-51.

Song JS, Haleem-Smith H, Arudchandran R, Gomez J, Scott PM, Mill JF, Tan TH, Rivera J. Tyrosine phosphorylation of Vav stimulates IL-6 production in mast cells by a Rac/c-Jun N-terminal kinase-dependent pathway. *J Immunol*. 1999 Jul 15;163(2):802-10.

Stassen M, Valeva A, Walev I, Schmitt E. Activation of mast cells by streptolysin O and lipopolysaccharide. *Methods Mol Biol*. 2006;315:393-403.

Sun H, Charles CH, Lau LF, Tonks NK. MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell*. 1993 Nov 5;75(3):487-93.

Swantek JL, Cobb MH, Geppert TD. Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. *Mol Cell Biol*. 1997 Nov;17(11):6274-82.

Tanaka S, Mikura S, Hashimoto E, Sugimoto Y, Ichikawa A. Ca²⁺ influx-mediated histamine synthesis and IL-6 release in mast cells activated by monomeric IgE. *Eur J Immunol*. 2005 Feb;35(2):460-8.

Taylor ML, Metcalfe DD. Mast cells in allergy and host defense. *Allergy Asthma Proc*. 2001 May-Jun;22(3):115-9.

Teshima R, Onose J, Okunuki H, Sawada J. Effect of Ca(2+) ATPase inhibitors on MCP-1 release from bone marrow-derived mast cells and the involvement of p38 MAP kinase activation. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000 Jan;121(1):34-43.

Theodosiou A, Ashworth A. MAP kinase phosphatases. *Genome Biol.* 2002 Jun 26;3(7):REVIEWS3009. Epub 2002 Jun 26.

Thien CB, Langdon WY. c-Cbl and Cbl-b ubiquitin ligases: substrate diversity and the negative regulation of signalling responses. *Biochem J.* 2005 Oct 15;391(Pt 2):153-66.

Tiao G, Fagan J, Roegner V, Lieberman M, Wang JJ, Fischer JE, Hasselgren PO. Energy-ubiquitin-dependent muscle proteolysis during sepsis in rats is regulated by glucocorticoids. *J Clin Invest.* 1996 Jan 15;97(2):339-48.

Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schutz G. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet.* 1999 Sep;23(1):99-103.

Tsuji K, Lyman SD, Sudo T, Clark SC, Ogawa M. Enhancement of murine hematopoiesis by synergistic interactions between steel factor (ligand for c-kit), interleukin-11, and other early acting factors in culture. *Blood.* 1992 Jun 1;79(11):2855-60.

Tsuji K, Zsebo KM, Ogawa M. Enhancement of murine blast cell colony formation in culture by recombinant rat stem cell factor, ligand for c-kit. *Blood.* 1991 Sep 1;78(5):1223-9.

Turner H, Kinet JP. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilon RI. *Nature.* 1999 Nov 25;402(6760 Suppl):B24-30.

Valent P, Escribano L, Parwaresch RM, Schemmel V, Schwartz LB, Sotlar K, Sperr WR, Horny HP. Recent advances in mastocytosis research. Summary of the Vienna Mastocytosis Meeting 1998. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999 Sep;120(1):1-7.

Valledor AF, Ricote M. Nuclear receptor signaling in macrophages. *Biochem Pharmacol.* 2004 Jan 15;67(2):201-12.

Vermeulen L, De Wilde G, Van Damme P, Vanden Berghe W, Haegeman G. Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *EMBO J.* 2003 Mar 17;22(6):1313-24.

Wang Y, Thorlacius H. Mast cell-derived tumor necrosis factor-alpha mediates macrophage inflammatory protein-2-induced recruitment of neutrophils in mice. *Br J Pharmacol.* 2005 Aug;145(8):1062-8.

Wedemeyer J, Tsai M, Galli SJ. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr Opin Immunol.* 2000 Dec;12(6):624-31.

Welker P, Grabbe J, Gibbs B, Zuberbier T, Henz BM. Human mast cells produce and differentially express both soluble and membrane-bound stem cell factor. *Scand J Immunol.* 1999 May;49(5):495-500.

Wershil BK, Murakami T, Galli SJ. Mast cell-dependent amplification of an immunologically nonspecific inflammatory response. Mast cells are required for the full expression of cutaneous acute inflammation induced by phorbol 12-myristate 13-acetate. *J Immunol.* 1988 Apr 1;140(7):2356-60.

Wershil BK, Wang ZS, Gordon JR, Galli SJ. Recruitment of neutrophils during IgE-dependent cutaneous late phase reactions in the mouse is mast cell-dependent. Partial inhibition of the reaction with antiserum against tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest.* 1991 Feb;87(2):446-53.

Wing SS, Goldberg AL. Glucocorticoids activate the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting. *Am J Physiol.* 1993 Apr;264(4 Pt 1):E668-76.

Wodnar-Filipowicz A, Heusser CH, Moroni C. Production of the haemopoietic growth factors GM-CSF and interleukin-3 by mast cells in response to IgE receptor-mediated activation. *Nature.* 1989 May 11;339(6220):150-2.

Wu J, Katrekar A, Honigberg LA, Smith AM, Conn MT, Tang J, Jeffery D, Mortara K, Sampang J, Williams SR, Buggy J, Clark JM. Identification of substrates of human protein-tyrosine phosphatase PTPN22. *J Biol Chem.* 2006 Apr 21;281(16):11002-10. Epub 2006 Feb 6.

Yamaguchi M, Hirai K, Nakajima K, Ohtoshi T, Takaishi T, Ohta K, Morita Y, Ito K. Dexamethasone inhibits basophil migration. *Allergy.* 1994 May;49(5):371-5.

Yamaguchi M, Lantz CS, Oettgen HC, Katona IM, Fleming T, Miyajima I, Kinet JP, Galli SJ. IgE enhances mouse mast cell Fc(epsilon)RI expression in vitro and in vivo: evidence for a novel amplification mechanism in IgE-dependent reactions. *J Exp Med.* 1997 Feb 17;185(4):663-72.

Yamaguchi M, Hirai K, Komiya A, Miyamasu M, Furumoto Y, Teshima R, Ohta K, Morita Y, Galli SJ, Ra C, Yamamoto K. Regulation of mouse mast cell surface Fc epsilon RI expression by dexamethasone. *Int Immunol.* 2001 Jul;13(7):843-51.

Yano K, Yamaguchi M, de Mora F, Lantz CS, Butterfield JH, Costa JJ, Galli SJ. Production of macrophage inflammatory protein-1alpha by human mast cells: increased anti-IgE-dependent secretion after IgE-dependent enhancement of mast cell IgE-binding ability. *Lab Invest.* 1997 Aug;77(2):185-93.

Zagariya A, Mungre S, Lovis R, Birrer M, Ness S, Thimmapaya B, Pope R. Tumor necrosis factor alpha gene regulation: enhancement of C/EBPbeta-induced activation by c-Jun. *Mol Cell Biol.* 1998 May;18(5):2815-24.

Zhang C, Baumgartner RA, Yamada K, Beaven MA. Mitogen-activated protein (MAP) kinase regulates production of tumor necrosis factor-alpha and release of arachidonic acid in mast cells. Indications of communication between p38 and p42 MAP kinases. *J Biol Chem.* 1997 May 16;272(20):13397-402.

Zhang XW, Thorlacius H. Dexamethasone inhibits arteriolar leukocyte rolling and adhesion induced by tumor necrosis factor-alpha in vivo. *Inflamm Res.* 2000 Mar;49(3):95-7.

Zhang J, Chiang YJ, Hodes RJ, Siraganian RP. Inactivation of c-Cbl or Cbl-b differentially affects signaling from the high affinity IgE receptor. *J Immunol.* 2004 Aug 1;173(3):1811-8.

Zhao Q, Wang X, Nelin LD, Yao Y, Matta R, Manson ME, Baliga RS, Meng X, Smith CV, Bauer JA, Chang CH, Liu Y. MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock. *J Exp Med.* 2006 Jan 23;203(1):131-40.

7. Abkürzungen

A	Adenin
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AP-1	Aktivator Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BMMC	Bone marrow-derived mouse mast cells
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
C	Cytosin
Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
cDNA	complementary DNA
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNP	Dinitrophenyl-HSA
dTNP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetracetat
ERK	Extracellular regulated kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FcεRI	Hoch affiner Rezeptor für IgE
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
G	Guanin
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GR	Glukokortikoidrezeptor
GRE	Glucocorticoid response element
GTP	Guanosintriphosphat
h	hour
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HRP	Horseradish peroxidase
HSA	Human serum albumin
Hsp	Heat shock protein
IgE	Immunoglobuline E
IL-	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
l	Liter
LB	Luria Bertani
Luc	Luciferase
JNK	Jun-N-terminal kinase
KO	Knockout
m	Milli
M	Molar
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase

Abkürzungen

MCP	Monocyte chemoattractant protein
min	Minute
MMP	Matrixmetalloproteinase
MMTV	Mouse mammary tumor virus
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
μ	Micro
n	Nano
nGRE	Negative glucocorticoid response element
NP-40	Nonidet P-40
OD	Optische Dichte
p	Pico
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SCF	Stem cell factor
Sek	Sekunde
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
T	Thymin
TAE	Tri/Acetat/EDTA Elektrophoresepuffer
TBE	Tris/Borsäure/EDTA Elektrophoresepuffer
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TNF	Tumor necrosis factor
TPA	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
U	Umdrehung
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp