



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**  
**Medizinische Fakultät Mannheim**  
**Dissertations-Kurzfassung**

**Proteomische DIGE-Analyse und massenspektrometrische  
Identifizierung Nickel-regulierter Proteine in humanen Monozyten**

Autor: Annika Jakob  
Institut / Klinik: Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. H.-J. Thierse

Obwohl in den industrialisierten Ländern bereits ca. 10-20% der Bevölkerung gegen ein oder mehrere Allergen(e) sensibilisiert sind, sind deren molekulare Ursachen bisher nur unzureichend geklärt. Aktuelle Studien verweisen auf eine weiter ansteigende Inzidenzrate allergischer Erkrankungen, wobei die T-Zell-vermittelte humane Nickelallergie (Typ IV-Reaktion) – mit einer Prävalenz von 17-21% - die häufigste Kontaktallergie darstellt. Da Ni-spezifische T-Zellen durch spezifische T-Zellepitope, die von antigenpräsentierenden Zellen (APC) präsentiert werden, aktiviert werden, kommt den dendritischen Zellen (DC) als professionellen APC und ihren Vorläuferzellen, den Monozyten eine zentrale funktionelle Bedeutung zu. Dabei werden die Allergene oder Haptene (< 500 Dalton) sowohl während der initialen Sensibilisierungsphase den naiven T-Zellen in den lokalen Lymphknoten präsentiert, als auch während der Effektorphase in der Haut den rezirkulierten Gedächtnis-T-Zellen präsentiert, und können dort die Allergie-typische Hautreaktion auslösen. Eine veränderte Immunantwort durch diese Zellen oder ein Verlust derselben hätte für die Allergen-spezifische Immunantwort weitreichende krankheitsmodulierende Konsequenzen. Interessanterweise hatten Voruntersuchungen aus dem Labor Weltzien/Thierse am MPI für Immunbiologie in Freiburg wiederholt gezeigt (unpublizierte Daten), dass Monozyten sehr spezifisch auf Nickelionen zu reagieren vermögen.

Aus diesem Grund sollten in der vorliegenden Arbeit moderne proteomische Techniken wie die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) und die quantitative DIGE-Technik gekoppelt mit der Delta2D-Analyse und Massenspektrometrie (MS) eingesetzt werden, um aufklären zu helfen, welche Proteine und Pathways durch Nickelionen in humanen Monozyten reguliert werden können. Dazu wurden Monozyten mittels MACS-Technologie aus Buffy-PBMC isoliert und mit unterschiedlichen Nickelsulfat-Konzentrationen stimuliert. Vier Spender wurden zur DIGE-Discovery-Analyse der Proteinregulation ausgewählt. Im Mittel wurden auf den 2D-Gelen  $532 \pm 146$  Proteinspots detektiert, wovon im Schnitt auf den einzelnen Gelen knapp 31% signifikant reguliert waren. Insgesamt konnten in der vorliegenden experimentellen Arbeit erstmals 56 signifikant durch Nickelionen regulierte Species/Spots ( $>1.5$  und  $>0,6$ ) nach verschiedenen Stringenzkriterien kategorisiert und 36 von diesen zur weiteren Analyse der MALDI-TOF-Massenspektrometrie zugeführt werden, von welchen 14 final (bzw. 22) final identifiziert werden konnten (entsprechend einer Identifikationsquote von knapp 39% (61%)).

Die Ergebnisse zeigten eine reproduzierbare Spenderindividualität und mit sehr stringenter experimenteller Cut-Off zeigten nur drei Proteine eine signifikante Regulation über alle getesteten Spender hinweg: 1. Das Bullöse Pemphigoid Antigen 1, welches nach Ni-Stimulation signifikant herunterreguliert wurde. Überraschenderweise wurde dieses Protein hier erstmalig den Monozyten zugeordnet und sollte in Folgestudien näher validiert werden. 2. War bei allen Spendern das humane Serumalbumin nach Ni-Zugabe erhöht, welches nach einigen Studien auch zytoprotektiv bzw. antiapoptotisch wirken kann. 3. Zeigte das mitochondriale Stress-70 Protein eine signifikante Ni-abhängige Regulation. Hier ist bemerkenswert, dass Mitglieder der HSP-70 Proteinfamilie bereits als Ni-regulierte Proteine beschrieben wurden und eine weitere Studie darauf hinweist, dass Nickelallergiker möglicherweise auch erhöhte Anti-HSP-70 Antikörper in ihrem Blut aufweisen können. Zukünftige Arbeiten sollten zunächst die hier präsentierten proteomischen Daten Ni-regulierter Proteine in humanen Monozyten mit komplementären Techniken wie Western Blotting oder ELISA bestätigen. Weiterhin sollte die funktionelle Bedeutung der Ni-spezifischen Proteinregulationen in Bezug auf die primären Beobachtungen (Ni-spezifische, apoptotische Effekte auf Monozyten) untersucht werden und weitere Erklärungsansätze gefunden werden, warum Monozyten so spezifisch auf Nickelionen reagieren.